

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1993

Thèse n° 315

**ACTIVITES LIPOXYGENASIQUES DES MONOCYTES  
HUMAINS**

**THESE  
POUR LE  
DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mai 1993

par

**Marie-Laure BEYSSEN**

Née le 22 Mars 1968 à Brive (Corrèze)

***Examineurs de la thèse***

Monsieur BENEYTOUT - Professeur.....- Président  
Monsieur RIGAUD - Professeur.....- Juge  
Madame COOK-MOREAU - Maître de conférences.....- Juge  
Monsieur CHABLE - Docteur en pharmacie.....- Juge

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**

- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)  
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

### PERSONNEL ENSEIGNANT

#### \* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

**A ma famille.**

**A mes amis.**

A la mémoire de mon grand père Jean Lachaux.  
En témoignage de ma toute profonde affection.

A la mémoire  
de mes grands parents André et Paulette Beyssen et  
de mon grand oncle Clément Leygonie.

A Monsieur Beneytout,  
Professeur des universités de biochimie.

Au cours de nos études, nous avons pu apprécier votre enseignement théorique et pratique de qualité.

L'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse est pour nous l'occasion de vous exprimer notre gratitude et notre profond respect.

A Monsieur Rigaud,  
Professeur des université de biochimie.

Nous avons été très sensible à l'accueil que vous nous avez toujours réservé au sein de votre laboratoire.

Nous tenons à vous remercier d'accepter de siéger dans ce jury de thèse et à vous assurer de notre profonde admiration et reconnaissance.

A Madame Cook-Moreau,  
Maître de conférences en immunologie.

Notre profonde gratitude d'avoir bien voulu être notre maître de thèse.

Vos conseils avisés, votre aide et votre disponibilité constante nous ont permis de réaliser ce travail. Soyez en remerciée.

A Monsieur Chable,  
Docteur d'état en pharmacie.

Nous vous remercions chaleureusement d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Veillez trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance pour la très bonne et utile expérience de travail faite en votre officine.

A Monsieur le Professeur Breton,

Nous vous exprimons tous nos remerciements pour la bienveillance avec laquelle vous nous avez accueilli dans votre service et pour la grande disponibilité dont vous avez fait preuve à notre égard.

A Madame H. Chable,

Mes profonds remerciements pour votre aide précieuse, vos conseils avisés et votre dévouement.

A tout le laboratoire de biochimie médecine,

Mes profonds remerciements pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée et pour la gentillesse avec laquelle vous m'avez permis de m'intégrer totalement à votre équipe.

A Noro,

Mes sincères remerciements.



A

74 : **IV** : Témoin positif (ADNc-5 lipoxygénase et amorces de l'ADNc de la 5 lipoxygénase).

**V** : Echantillon (ADNc de monocytes humains et amorces de l'ADNc de la 5 lipoxygénase).

75 : **A2** : Témoin de la PCR (ADNc -5 lipoxygénase et amorces de l'ADNc de la 5 lipoxygénase)

## PLAN

### INTRODUCTION

### PREMIERE PARTIE : NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES

#### **METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE CHEZ LES MAMMIFERES**

##### **A- ACTIVITE CYCLOOXYGENASIQUE**

###### **I- Les cyclooxygénases : structure, activité**

###### **II- Les métabolites issus de la voie des cyclooxygénases**

###### **II.1- Nomenclature et structure des prostaglandines**

###### **II.2- Devenir de PGH<sub>2</sub>**

###### **II.2.1- Synthèse et catabolisme des prostaglandines classiques : PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> et PGD<sub>2</sub>**

###### **II.2.2- Synthèse et catabolisme de la prostacycline et du thromboxane**

##### **B- ACTIVITE LIPOXYGENASIQUE**

###### **I- Les lipoxygénases**

###### **I.1- Mécanisme réactionnel**

###### **I.2- Régulation des réactions lipoxygénasiques**

###### **I.3- Régiospécificité de la réaction lipoxygénasique**

###### **I.4- Nomenclature des lipoxygénases**

###### **I.5- Les lipoxygénases de mammifères**

###### **I.5.1- La 12 lipoxygénase**

###### **I.5.2- La 15 lipoxygénase**

###### **I.5.3- La 5 lipoxygénase**

###### **I.5.4- Homologie structurale entre lipoxygénases humaines**

###### **II- Les métabolites issus de la voie des lipoxygénases**

###### **II.1- Voie de la 12 lipoxygénase**

###### **II.2- Voie de la 15 lipoxygénase**

###### **II.3- Voie de la 5 lipoxygénase**

###### **II.3.1- Nomenclature des leucotriènes**

###### **II.3.2- Métabolites de l'acide arachidonique : voie des leucotriènes**

###### **II.3.3- Métabolisme des leucotriènes**

###### **II.4- Autres voies lipoxygénasiques**

##### **C- ACTIVITE MONOOXYGENASIQUE**

- I- Le cytochrome P450
- II- La voie des époxygénases

## D- ACTIVITE DES PHOSPHOLIPASES

### I- Généralités

### II- Les phospholipases

#### II.1- Les phospholipases A<sub>1</sub>

#### II.2- Les phospholipases D

#### II.3- Les phospholipases C

#### II.4- Les phospholipases A<sub>2</sub>

##### II.4.1- Distribution cellulaire et rôle des PLA<sub>2</sub>

##### II.4.2- Mécanisme réactionnel des PLA<sub>2</sub>

##### II.4.3- Régulation de l'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub>

###### a) *Les activateurs*

###### b) *Les inhibiteurs*

##### II.4.4- Voie de synthèse du PAF-acéther

### III- Substrat des lipoxygénases, des cyclooxygénases et des époxygénases

#### III.1- Origine et synthèse des substrats

#### III.2- Stockage de l'acide arachidonique dans les cellules

##### III.2.1- Les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques

##### III.2.2- Les phospholipides membranaires

## EICOSANOIDES ET CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEÉES

### A- CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEÉES : MONOCYTE-MACROPHAGE

#### I- Origine et devenir des monocytes

##### I.1- La monocytopoïèse

##### I.2- Les monocytes circulants

##### I.3- Les macrophages

##### I.4- L'activation des macrophages

##### I.5- Physiopathologie de l'inflammation

###### I.5.1- La phase vasculaire

###### I.5.2- La phase plasmatique

###### I.5.3- La phase cellulaire

###### I.5.4- Evolution des réactions inflammatoires

###### a) *L'inflammation aiguë*

###### b) *L'inflammation chronique*

###### I.5.5- Les médiateurs de l'inflammation

###### a) *Les médiateurs cellulaires*

###### b) *Les médiateurs vasculaires*

## **II- Critères de différenciation des cellules phagocytaires mononucléées**

- II.1- Etude morphologique
  - II.1.1- Les monocytes
  - II.1.2- Les macrophages
- II.2- Propriétés cytochimiques
- II.3- Les marqueurs de surface
  - II.3.1- L'influence de facteurs environnants
  - II.3.2- Critères de différenciation

## **III- Propriétés et activités fonctionnelles des phagocytes mononucléés**

- III.1- Cellules phagocytaires
- III.2- Cellules bactéricides
- III.3- Cellules auxiliaires
- III.4- Cellules cytotoxiques
- III.5- Cellules sécrétrices

## **B- PRODUCTION D'EICOSANOIDES PAR LES CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEES HUMAINES**

### **I- Facteurs influençant l'interprétation des résultats**

- I.1- Technique de séparation cellulaire
  - I.1.1- Prélèvements
  - I.1.2- Séparations cellulaires
- I.2- Culture
- I.3- Degré de purification
- I.4- Hétérogénéité des populations
- I.5- Influence des métabolites

### **II- Production d'eicosanoïdes par les monocytes stimulés et non stimulés**

- II.1- Agents stimulants
  - II.1.1- Acide arachidonique
  - II.1.2- Ionophore calcique A 23187
  - II.1.3- Esters de phorbol
  - II.1.4- Peptides formyl-méthionylés
  - II.1.5- Agents divers
- II.2- Voie de la cyclooxygénase
- II.3- Voie de la lipoxygénase
  - II.3.1- Métabolisme général
  - II.3.2- Métabolisme sous stimulus augmentant la concentration de  $Ca^{++}$  intracellulaire associé à des étapes d'adhérence
  - II.3.3- Métabolisme en présence d'ester de phorbol
  - II.3.4- Métabolisme en présence d'acide arachidonique exogène
  - II.3.5- Incidence des interactions cellulaires sur le métabolisme 5-lipoxygénasique des monocytes
    - a) *interaction monocyte-plaquette*

- b) interaction monocyte-lymphocyte*
- II.3.6- Métabolisme en présence d'interleukine 4
  - a) Interleukine 4*
    - Action sur les cellules T
    - Action sur les cellules B
    - Contrôle de l'hématopoïèse
    - Action sur les monocytes et les macrophages humains
  - b) stimulation des monocytes humains par diverses cytokines*

## **C- PROPRIETES DES EICOSANOIDES ET DE LEURS METABOLITES**

### **I- Mécanisme d'action des prostaglandines et des leucotriènes**

I.1- Récepteurs des prostaglandines

I.2- Récepteurs des leucotriènes

### **II- Activités biologiques des eicosanoïdes**

II.1- Prostaglandines et thromboxane A<sub>2</sub>

II.1.1- Système cardiovasculaire

II.1.2- Fonction plaquettaire

II.1.3- Fonction rénale

II.1.4- Système respiratoire

II.1.5- Système gastrointestinal

II.1.6- Système reproducteur

II.1.7- Inflammation

II.1.8- Fièvre et infection

II.1.9- Immunité

II.2- Leucotriènes

II.2.1- Système pulmonaire

II.2.2- Système cardiaque

II.2.3- Inflammation

II.2.4-Immunité

*a)Prolifération des lymphocytes*

*b)Activité cytotoxique*

*c)Production de cytokines*

II.3- Acides hydroxy- et hydroperoxy- eicosatétraénoïques

II.3.1- Synthèse des eicosanoïdes

II.3.2- Libération d'histamine

II.3.3- Peau et psoriasis

II.3.4- Inflammation

II.3.5-Immunité

II.4- Lipoxines, hépoxilines et acides époxyeicosatriénoïques

II.4.1- Lipoxines

II.4.2- Hépoxilines

## II.4.3- Acides époxyeicosatriénoïques

**SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE****MATERIELS ET METHODES****A- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'OBTENTION DES MONOCYTES HUMAINS****I- Solutions et matériels**

- I.1- Tube de prélèvement
- I.2- Nycoprep <sup>TM</sup> 1,068
- I.3- Solution antiagrégante
- I.4- Solutions de lavages
  - I.4.1- Solution d'EDTA et de sérum de veau foetal
  - I.4.2- Solution saline de phosphate

**II- Méthodes**

- II.1- Principe de la procédure de séparation
- II.2- Procédure de séparation préconisée par les laboratoires commercialisant le Nycoprep 1.068
- II.3- Mise en application de la méthode de Pawlowsky
- II.4- Emploi de Diatube et de CATCH

**B- CARACTERISATION DES MONOCYTES ISOLEES****I- Numération cellulaire et viabilité****II-Identification****C- ETUDE ANALYTIQUE DES METABOLITES LIPOXYGENASIQUES****I- Appareillages et produits**

- I.1- Spectrophotométrie
- I.2- Chromatographie
  - I.2.1- HPLC
    - a) Appareillage
    - b) *Chromatographie de partage à polarité de phase inversée*
    - c) *Paramètres chromatographiques d'un soluté*
    - d) *Paramètres chromatographiques de la colonne*
  - I.2.2- CCM
    - a) *Solvant de migration*
    - b) *Dépot*
    - c) *Révélation*
- I.3. Carbone 14 et acide arachidonique 1-<sup>14</sup>C
  - I.3.1- Transformations radioactives
  - I.3.2- Cinétique des transformations radioactives

- a) *activité*
- b) *décroissance radioactive - Période*

#### I.3.3- Particule $\beta^-$

#### I.4- Détecteurs de rayonnement $\beta^-$

##### I.4.1- Dénombrement des rayonnements

- a) *Perte de comptage*
- b) *Statistique de comptage*
- c) *Bruit de fond*

##### I.4.2- Analyseur Linéaire LB-2832 Berthold

- a) *Principe et appareillage*
- b) *Précautions particulières*

##### I.4.3- Détecteur à scintillation

- a) *Principe et appareillage*
- b) *Phénomène d'affaiblissement des scintillations*

### II- Mise au point de l'étude analytique

#### II.1- Analyse spectrophotométrique

##### II.1.1- Spectre des leucotriènes et des HETEs

##### II.1.2- Spectre du standard interne : PGB<sub>2</sub>

##### II.1.3- Etude qualitative

#### II.2- CCM et TLC - analyseur linéaire

#### II.3- Incubation des monocytes

#### II.4- HPLC

##### II.2.1- Solution de standards

##### II.2.2- Gradient

#### II.5- Détecteur à scintillation

## D- EXTRACTION D'ARN TOTAUX ET RECHERCHE PAR PCR DE L'EXPRESSION AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL DE LA 5 LIPOXYGENASE

### I- Les acides nucléiques

### II- Extraction des ARN totaux

#### II.1- Principe

##### II.1.1-Préparation des ARN totaux

##### II.1.2- Extraction des ARN totaux

##### II.1.3- Précipitation et lavage des ARN totaux

##### II.1.4- Dosage des acides nucléiques et contrôle de qualité

#### a) *Dosage par spectrophotométrie*

##### b) *Electrophorèse*

##### c) *Révélation*

#### II.2- Protocole

##### II.2.1- Extraction des ARN totaux

##### II.2.2- Dosage des acides nucléiques

##### II.2.3- Electrophorèse

##### a) *Tampon d'électrophorèse*

- b) Minigel d'agarose à 0.8 %*
- c) Conditions d'électrophorèse*

### **III- La transcription réverse**

#### **III.1- Principe**

- III.1.1- Action de la transcriptase réverse
- III.1.2- Origine de la transcriptase réverse
- III.1.3- Utilisation de la transcriptase réverse

#### **III.2- Protocole**

- III.2.1- Amorçage
- III.2.2- Transcription réverse
- III.2.3- Traitement par la RNase H

### **IV- Réaction de polymérisation en chaîne**

#### **IV.1- Principe**

#### **IV.2- Protocole**

- IV.2.1- Préparation de l'amplification
- IV.2.2- Amplification
- IV.2.3- Vérification

- a) Principe du dot-blot*
- b) Extraction des produits amplifiés*
- c) Protocole du dot-blot*

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **A- OBTENTION DE MONOCYTES SANGUINS HUMAINS**

### **B- BIOLOGIE MOLECULAIRE**

- I- Analyse par spectrophotométrie et électrophorèse de l'extraction d'ARN totaux
- II- Mise en évidence de l'expression de la 5 lipoxygénase par PCR
- III- Vérification par dot-blot

### **C- ANALYSE EN HPLC DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES**

- I- Mise au point de la technique analytique
- II- Analyse d'échantillons incubés en présence d'AA froid
- III- Analyse de monocytes incubés en présence d'AA radiomarqué

## **CONCLUSION**

## INTRODUCTION

L'oxydation de l'acide arachidonique aboutit à la formation de composés actifs, les eicosanoïdes, synthétisés par la voie de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase. Ces eicosanoïdes, prostaglandines et leucotriènes, incluant le thromboxane, la prostacycline, les acides hydroxyeicosatétraénoïques, les lipoxines et les hépoxilines, sont impliqués dans de multiples phénomènes biologiques et font l'objet d'études approfondies sur leur capacité à modifier les réponses inflammatoire et immune.

Les cellules phagocytaires mononucléées et en particulier les monocytes stimulés par des étapes d'adhérence, les macrophages tissulaires résidents et les macrophages activés, synthétisent et libèrent de nombreux eicosanoïdes issus de l'activité catalytique de ces deux voies enzymatiques. Ces cellules tiennent une place prépondérante dans le développement de réactions inflammatoires et immunologiques. C'est pourquoi, l'étude des cyclooxygénases et des lipoxygénases des phagocytes mononucléés mobilisent de nombreux chercheurs dans le but de mieux comprendre leur implication dans les processus immunologiques.

En particulier, l'activité lipoxygénasique des cellules phagocytaires mononucléées humaines est assez mal définie et les résultats obtenus sont très souvent contradictoires. En fait, l'état de maturation de ces cellules et les stimulations auxquelles elles sont soumises sont à prendre en considération et sont susceptibles d'expliquer la diversité de ces résultats.

Le travail que nous proposons tente d'établir quelle est ou quelles sont les lipoxygénases exprimées par les monocytes humains du sang périphérique circulant, non stimulés par des étapes d'adhérence.

Dans une première partie nous présenterons une étude bibliographique concernant:

- d'une part la formation d'eicosanoïdes chez les mammifères par la voie de la cyclooxygénase, de la lipoxygénase et des époxygénases à partir de substrats bien définis;

- d'autre part l'étude spécifique des cellules phagocytaires mononucléées, les travaux réalisés sur le métabolisme cyclooxygénasique et lipoxygénasique de ces cellules et l'action des eicosanoïdes sur les monocytes, les macrophages ainsi que leurs diverses implications biologiques.

Dans une seconde partie nous exposerons les résultats obtenus par l'analyse des métabolites des monocytes humains en chromatographie liquide haute performance (HPLC) ainsi que ceux obtenus par polymérisation en chaîne d'ADN complémentaires (PCR). Nous discuterons alors des activités lipoxygénasiques exprimées par ces cellules sanguines et de leur capacité de transcription de l'ADN codant pour la 5 lipoxygénase en ARN messagers.

**PREMIERE PARTIE : NOTIONS**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE CHEZ LES MAMMIFERES

On appelle eicosanoïdes un vaste groupe de dérivés lipidiques insaturés à vingt atomes de carbone provenant essentiellement, chez les mammifères, du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique, mais aussi de l'acide dihomog- $\gamma$ -linoléique et de l'acide timnodonique.

### - Acide arachidonique (AA)

nomenclature chimique : acide eicosatétraène-cis-5,8,11,14-oïque

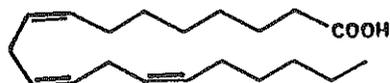
nomenclature biochimique : C 20 : 4 (n-6).



### - Acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (DGLA)

nomenclature chimique : acide eicosatriène-cis-8,11,14-oïque

nomenclature biochimique : C 20 : 3 (n-6)



### - Acide timnodonique (EPA)

nomenclature chimique: acide eicosapentaène-cis-5,8,11,14,17-oïque.

nomenclature biochimique : C 20 : 5 (n-3).



Trois systèmes enzymatiques peuvent agir sur ces acides gras polyinsaturés suivant un mécanisme enzymatique qui leur est propre. Ce sont les

cyclooxygénases, les lipoxygénases et les époxygénases à cytochrome P450 qui assurent la formation de composés distincts chimiquement et pharmacologiquement. Ces derniers peuvent être à leur tour métabolisés en d'autres produits bioactifs suivant de nouvelles voies enzymatiques.

Chez les mammifères soumis à un régime alimentaire équilibré, le substrat préférentiel des cyclooxygénases et des lipoxygénases animales est l'acide arachidonique. L'oxydation de cet acide gras est en partie contrôlée dans la majorité des cellules par l'action catalytique de phospholipases qui libèrent l'acide gras de glycérophospholipides membranaires.

## **A/ ACTIVITE CYCLOOXYGENASIQUE**

### **I- Les cyclooxygénases : structure, activité.**

L'activité cyclooxygénasique de la prostaglandine G/H synthétase catalyse la transformation d'acide gras polyinsaturés, le principal étant l'acide arachidonique, en prostaglandine G (PGG). Cette activité est associée à une activité peroxydasique de l'enzyme qui convertit la PGG (hydroperoxy-15-endoperoxyde-9,11) en PGH (analogue hydroxy-15) (Schéma 1). Cette dernière est le précurseur de nombreux métabolites biologiquement actifs: prostaglandines (PGs), thromboxane (Tx) et prostacycline (PGI<sub>2</sub>). Chez l'homme, deux gènes codant pour la prostaglandine G/H synthétase ont été caractérisés (DEWITT D.L. et coll., 1990) (KUJUBU D.A. et coll., 1991).

Dans sa forme native, ce complexe multienzymatique est un dimère de deux sous unités identiques, chaque monomère possède un atome de fer héminique et a un poids moléculaire (PM) de 65,6 KDa (SIGAL E., 1991). Les études menées par SMITH W.L. et coll.(1990) suggèrent que la présence d'un résidu tyrosine joue un rôle essentiel au niveau du site actif de cet enzyme. Composée de trois domaines (MERLIE J.P. et coll., 1988), la cyclooxygénase est transmembranaire :

- 1) un domaine extramembranaire porte l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale, les sites de glycosilation et un domaine "epidermal growth factor-like";
- 2) un domaine transmembranaire hydrophobe ;

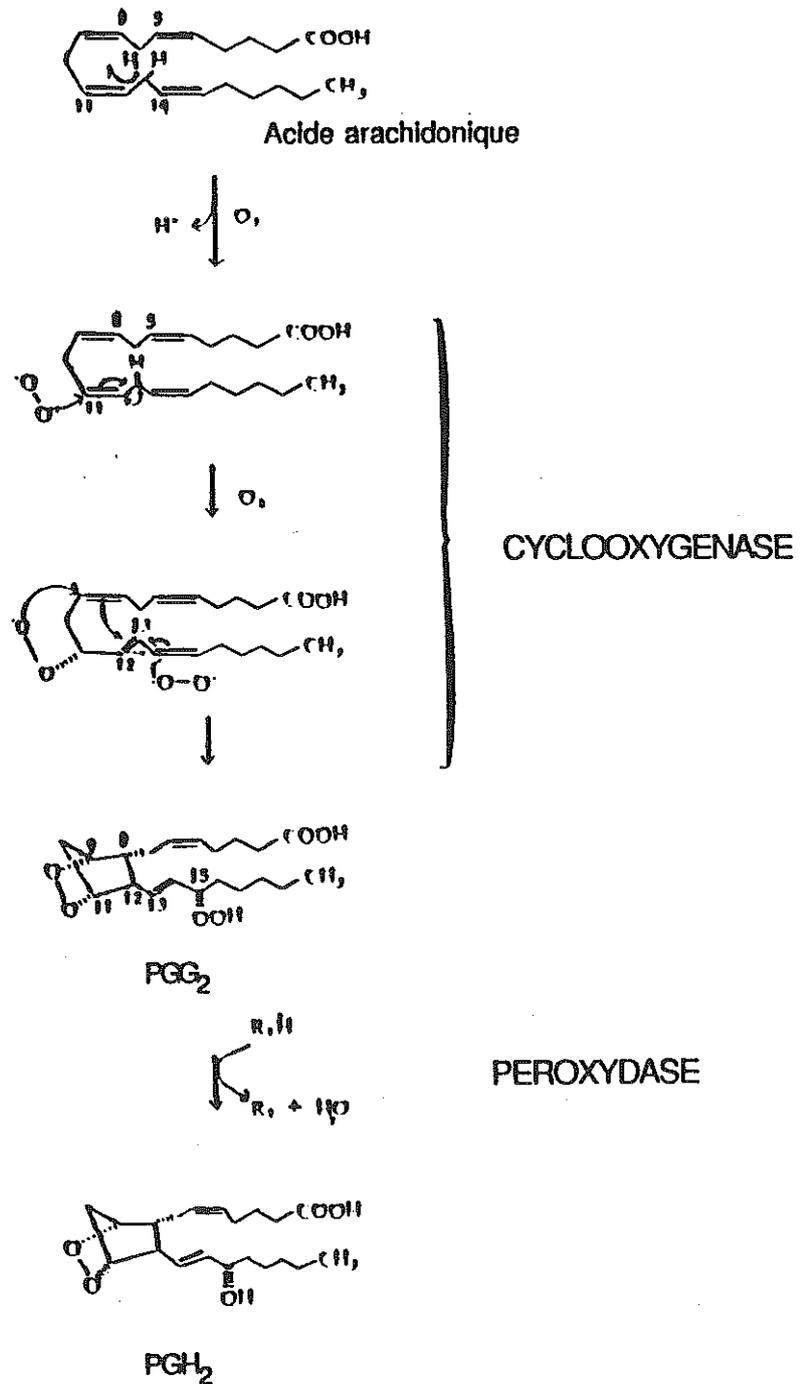


Schéma 1 : Synthèse de la PGH<sub>2</sub> par action successive des propriétés cyclooxygénasiques et peroxydasiques de la prostaglandine G/H synthétase, sur l'acide arachidonique.

3) un domaine intracytoplasmique porteur des activités enzymatiques. Cet enzyme est situé au niveau du réticulum endoplasmique et des membranes nucléaires.

Le mécanisme d'action des prostaglandines G/H synthétase est actuellement explicité comme suit : (schéma 2) (DIETZ R. et coll., 1988), (KARTHEIN R. et coll., 1988), (KULMACZ R.J. et coll., 1987)

1- un hydroperoxyde lipidique activateur R-OOH agit sur un groupement héminique de la PG G/H synthétase, [PPIX-Fe<sup>3+</sup>]. Cela aboutit à la formation d'un alcool, R-OH, et d'un composé feryl-oxo, [PPIX-Fe<sup>5+</sup>-O] Tyr ;

2- le résidu tyrosine de la chaîne est oxydé en cation radicalaire : [PPIX-Fe<sup>4+</sup>-O] Tyr<sup>•</sup> ;

3- le cation radicalaire réagit sur l'acide arachidonique entraînant la perte de l'hydrogène 13-proS de l'acide gras polyinsaturé conduisant à la formation d'un radical libre ;

4- suivent alors deux réactions d'oxygénation. L'addition d'un radical peroxy en C9-C11 entraîne l'isomérisation de la double liaison C11-C12 en C12-C13. La liaison C8-C12 est alors réalisée et un autre radical peroxy se fixe en C15 après migration de la liaison C12-C13 en C13-C14.

5- le cation radicalaire tyrosine et la PGG sont restitués.

6- la réaction hydroperoxydasique est responsable de la formation de composé feryl-oxo et de deux réductions successives génératrices d'électrons qui permettent de restituer l'enzyme sous sa forme native (DIETZ R. et coll., 1988) (KARTHEIN R. et coll., 1988). Lors de ces étapes, la PGG<sub>2</sub> est transformée en PGH<sub>2</sub> (PAGEL W.R. et coll., 1983).

De l'activité cyclooxygénasique sur l'acide arachidonique résulte la formation d'un radical sur le carbone 13. En l'absence d'endoperoxydation, des acides hydroxyeicosatétraénoïque en 11 et 15 peuvent être formés après migration du radical et oxygénation. Ces composés peuvent devenir les produits principaux de la réaction enzymatique dans certaines circonstances (HOLTZMAN M. J., 1991).

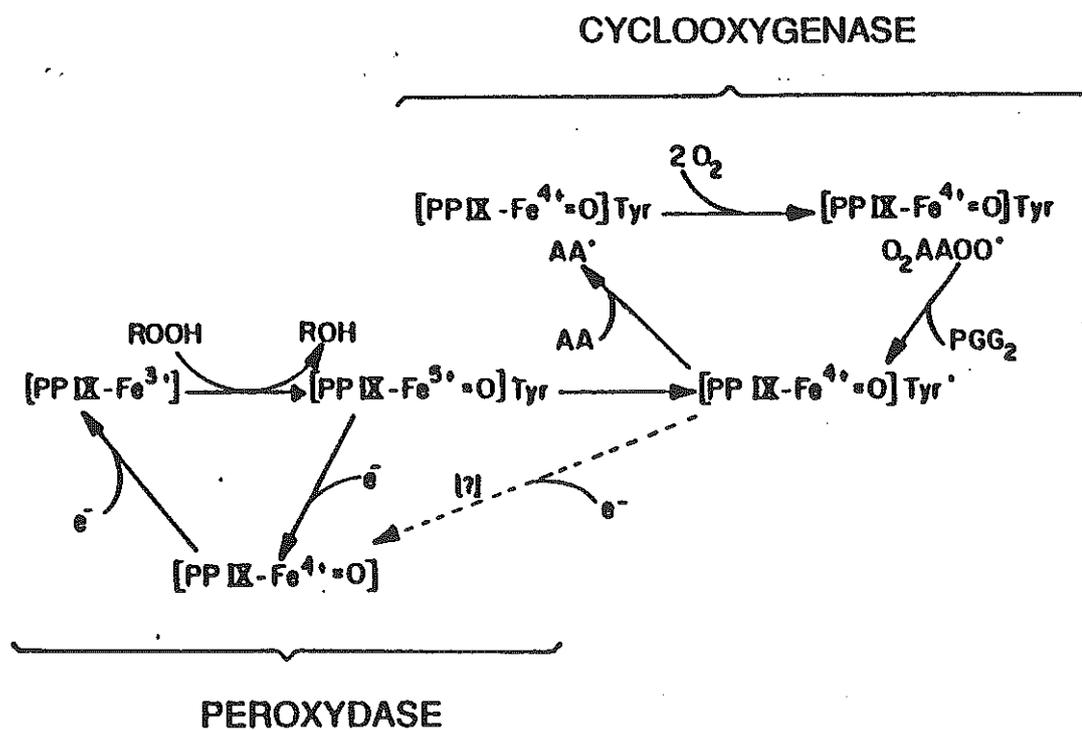


Schéma 2 : Mécanisme réactionnel de la prostaglandine G/H synthétase:  
 activités cyclooxygénasique et hydroperoxydasique.  
 ( SMITH W.L. et coll., 1990)

## II-Les métabolites issus de la voie de la cyclooxygénase.

### II.1- Nomenclature et structure des prostaglandines.

Les PGs sont des acides gras polyinsaturés à vingt atomes de carbone. Elles renferment un cycle cyclopentane fermé en C8-C12, deux chaînes latérales aliphatiques situées en trans, l'une carboxylique à sept carbones, l'autre hydrocarbonée à huit carbones, une double liaison trans-13, 14, une fonction  $\alpha$ -hydroxyle en C15 et une fonction oxygénée en C9.

Chimiquement, elles sont considérées comme des dérivés de l'acide prostanoïque, parent structural théorique (Figure 1).

Les premières substances appartenant à la famille des PGs ont été étudiées et extraites à partir du liquide séminal. On pensait alors qu'elles étaient sécrétées par la prostate, ce qui leur a valu le nom actuel de prostaglandines (VON EULER U.S., 1936).

La stéréochimie des PGs dépend du cyclopentane. Par convention, la chaîne latérale porteuse du carboxyle est trans ou  $\alpha$  et la chaîne latérale en C12 est cis ou  $\beta$ .

Les PGs sont divisées en classes caractérisées par une lettre qui indique la nature et la position des substituants sur le cyclopentane (Figure 2) (GRANSTROM E. et coll., 1987) : sur celui des PGs de type A, B, C, et J, sont greffés des  $\alpha$ - ou  $\beta$ -cétones insaturées ; sur celui des PGs de type D et E est greffé un  $\beta$ -hydroxycétone et sur les PGsF des 1,3-diols. L'annotation  $\alpha$  et  $\beta$  associée aux PGsF indique la position spatiale du groupement hydroxylé en C9. Seul l'isomère contenant deux hydroxyles en position  $\alpha$  est physiologique.

Selon le nombre de double liaisons présentes sur les chaînes aliphatiques, trois séries de prostaglandines sont définies (Figure 3) (GRANSTROM E. et coll., 1987) : les PGs de la série 1 dérivent de l'acide dihomo- $\gamma$ -linoléinique et n'ont qu'une double liaison trans en C13, C14 sur les chaînes aliphatiques ; les PGs de la série 2 proviennent du métabolisme de l'acide arachidonique et possèdent en plus de la liaison 13-14, une double liaison entre C5-C6 et celles de la série 3 issues du

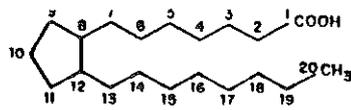


Figure 1 : Acide prostanoïque.

(GRANSTROM E. et coll., 1987)

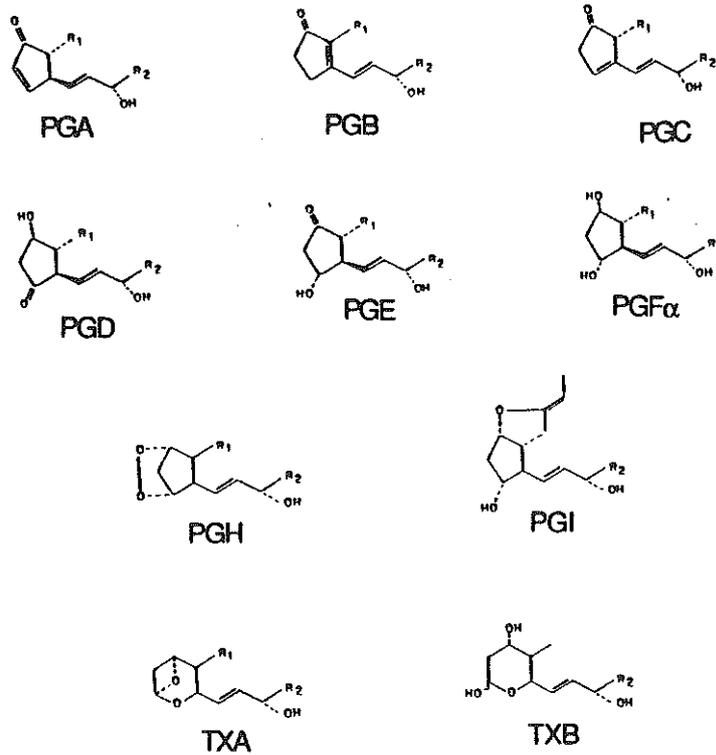


Figure 2 : Classes des prostaglandines.

(GRANSTROM E. et coll., 1987)

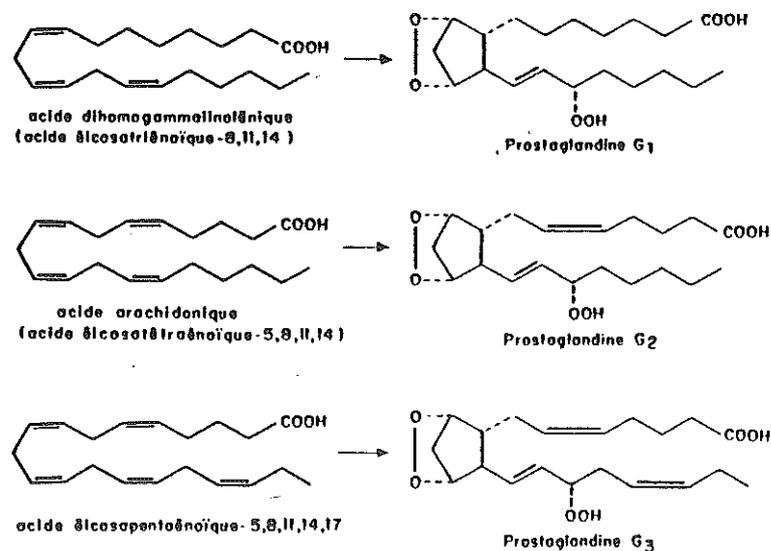


Figure 3 : Séries des prostaglandines.

(GRANSTROM E. et coll., 1987)

métabolisme de l'acide timnodonique ont une troisième double liaison en C17-C18.

Les endoperoxydes, PGG et PGH possèdent un pont endoperoxyde instable entre C9-C11 et un hydroperoxyde et un hydroxyde respectivement, greffé en C15 (GRANSTROM E. et coll., 1987).

La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) possède un pont oxygéné entre C6-C9. Le thromboxane  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) souvent apparenté aux PGs possède une structure instable bicyclique oxane-oxétane rapidement dégradé en  $\text{TxB}_2$  stable ne possédant plus qu'un cycle oxane et deux substituants hydroxylés en C9 et C11 (GRANSTROM E. et coll., 1987).

## II. 2- Devenir de la $\text{PGH}_2$ .

Les études rapportées dans la littérature sont essentiellement menées sur le métabolisme de l'acide arachidonique, les composés de la série 2 étant les plus synthétisés. Pour ces raisons, seules les PGs de cette série seront abordées. Toutefois, les réactions métaboliques apparaissent communes aux composés de chaque série et, dans certains cas, les métabolites des étapes sont identiques quelque soit leur origine; le principal d'entre eux est le 6-oxo- $\text{PGF}_1$ . Le clivage du cycle cyclopentane en C9 et C11 des  $\text{PGH}_2$  et  $\text{PGG}_2$  par oxydation conduit à la formation du dialdéhyde malonique et d'acide hydroxyheptadécatriénoïque.

### II.2-1 Synthèse et catabolisme des prostaglandines classiques : $\text{PGE}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$ et $\text{PGD}_2$ .

De nombreux enzymes permettent la synthèse de PGs et tous utilisent le glutathion réduit comme cofacteur ; ce sont tous des isomérases ou des réductases. La clearance métabolique des PGs actives dans la circulation sanguine est extrêmement rapide. En effet, l'hydroxyle porté en C15 est oxydé par une 15-hydroxy prostaglandine deshydrogénase, formant des 15-céto-PGs. La  $\Delta 13$ -réductase sature ensuite la double liaison C13-C14, conduisant à la formation de dihydroprostaglandines. La chaîne latérale de ces composés peut être raccourcie

par  $\beta$ -oxydation, tandis que le méthyl de l'autre chaîne peut être oxydé par  $\omega$ -oxydation ; ces remaniements conduisent à la formation de composés dinor ou tétranor. Les principales étapes sont schématisées aux figures 4 et 5 (GRANSTROM E. et coll., 1987).

## II.2-2 Synthèse et catabolisme de la prostacycline et du thromboxane.

Ces deux composés,  $\text{PGI}_2$  et  $\text{TxA}_2$ , sont synthétisés grâce à l'action catalytique respective de la prostacycline synthétase et de la thromboxane synthétase sur la  $\text{PGH}_2$ . ULLRICH V. et coll., (1990) préconisent la rupture homolytique de la liaison endoperoxyde. Le radical alkoxy formé est stabilisé en C11 lorsque la réaction est catalysée par la  $\text{PGI}_2$  synthétase et en C9 quand la thromboxane synthétase agit sur l'endoperoxyde. Cette stabilisation semble assurée par un groupement Fe(III)-thiolate.

Les composés actifs formés sont très instables et sont rapidement transformés en  $\text{TxB}_2$  pour le  $\text{TxA}_2$  et 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  pour le  $\text{PGI}_2$  par simple hydrolyse. Les principales voies de dégradation sont présentées aux figures 6 et 7 (GRANSTROM E. et coll., 1987).

## **B/ ACTIVITE LIPOXYGENASIQUE**

### **I- Les lipoxygénases.**

Les lipoxygénases se trouvent aussi bien dans le règne animal que végétal. Ce sont les lipoxygénases végétales qui furent les premières étudiées. Plus de soixante espèces végétales possèdent une activité de ce type (VICK B.A. et coll., 1987). Néanmoins, le rôle physiologique des enzymes végétales ainsi que celui des produits formés reste à préciser contrairement à leurs analogues animaux. La première activité lipoxygénasique animale a été mise en évidence par HAMBERG M. et coll. (1974) dans les plaquettes. Par la suite, ce type d'activité a largement été décrit dans de nombreux tissus, organes et cellules mammifères.

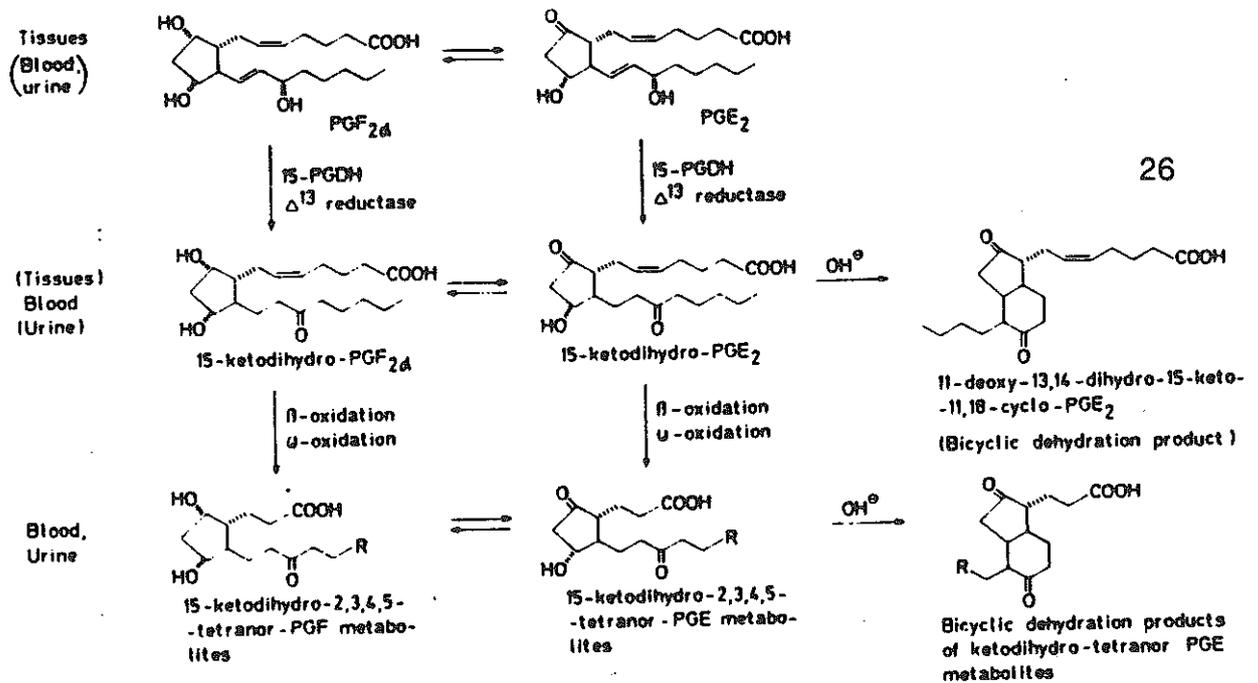


Figure 4 : Principales voies métaboliques de PGE<sub>2</sub> et de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .  
 (GRANSTROM E. et coll., 1987)

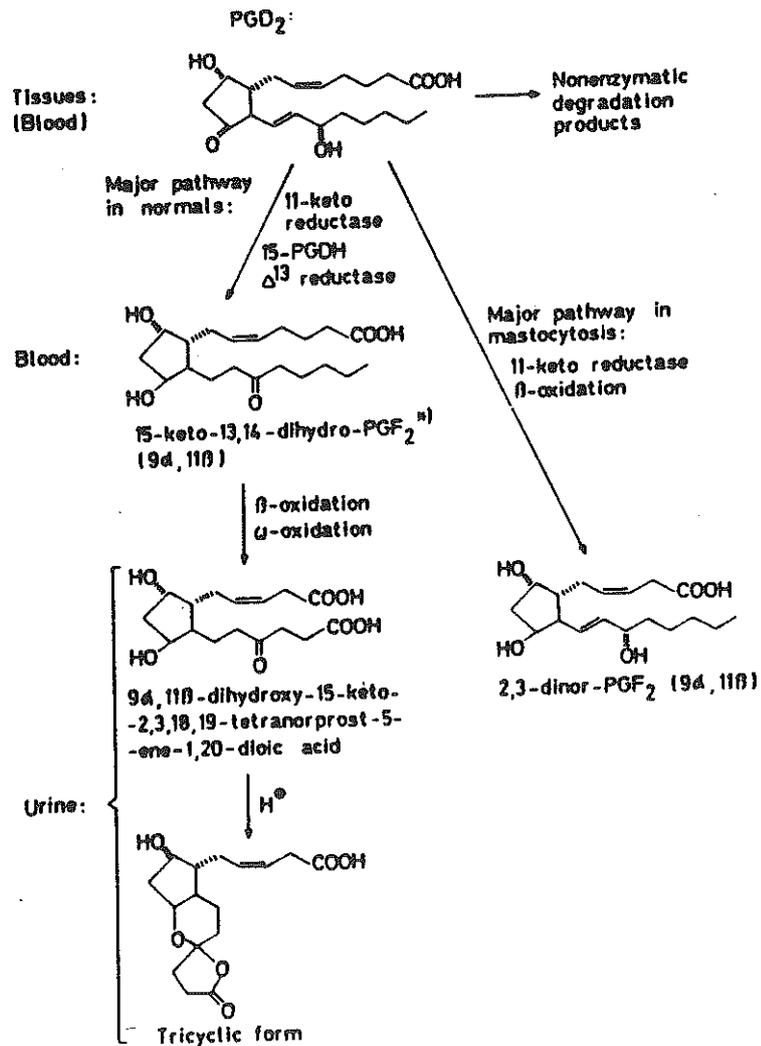


Figure 5 : Principales voies métaboliques de la PGD<sub>2</sub>.  
 (GRANSTROM E. et coll., 1987)

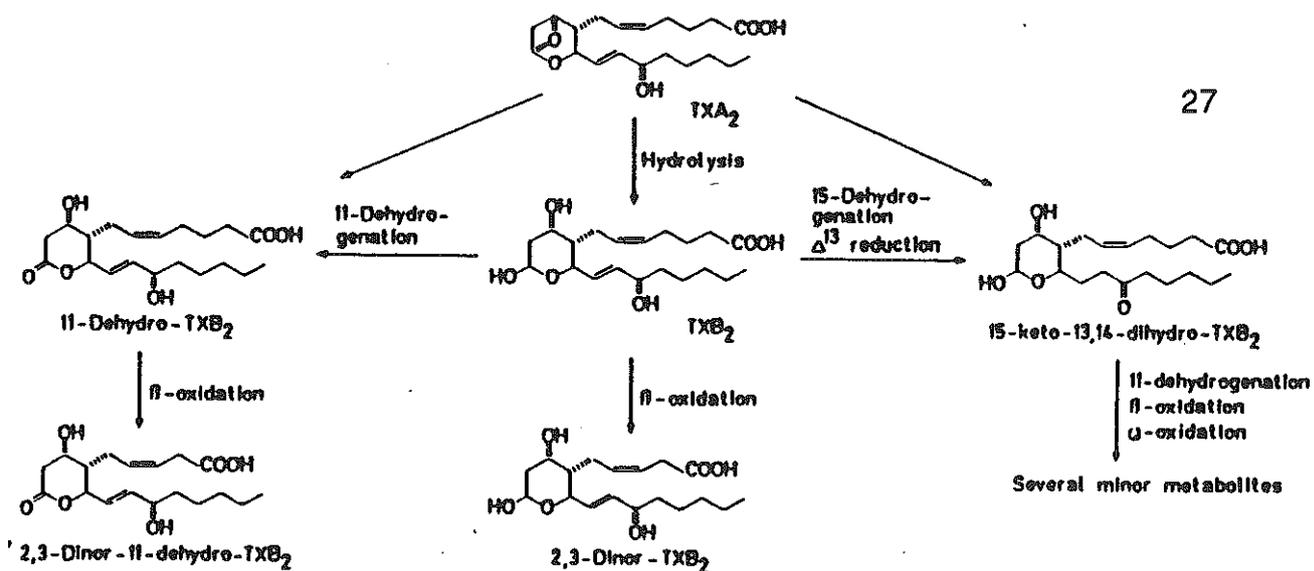


Figure 6 : Principales voies métaboliques du TxA<sub>2</sub>.  
(GRANSTROM E. et coll., 1987)

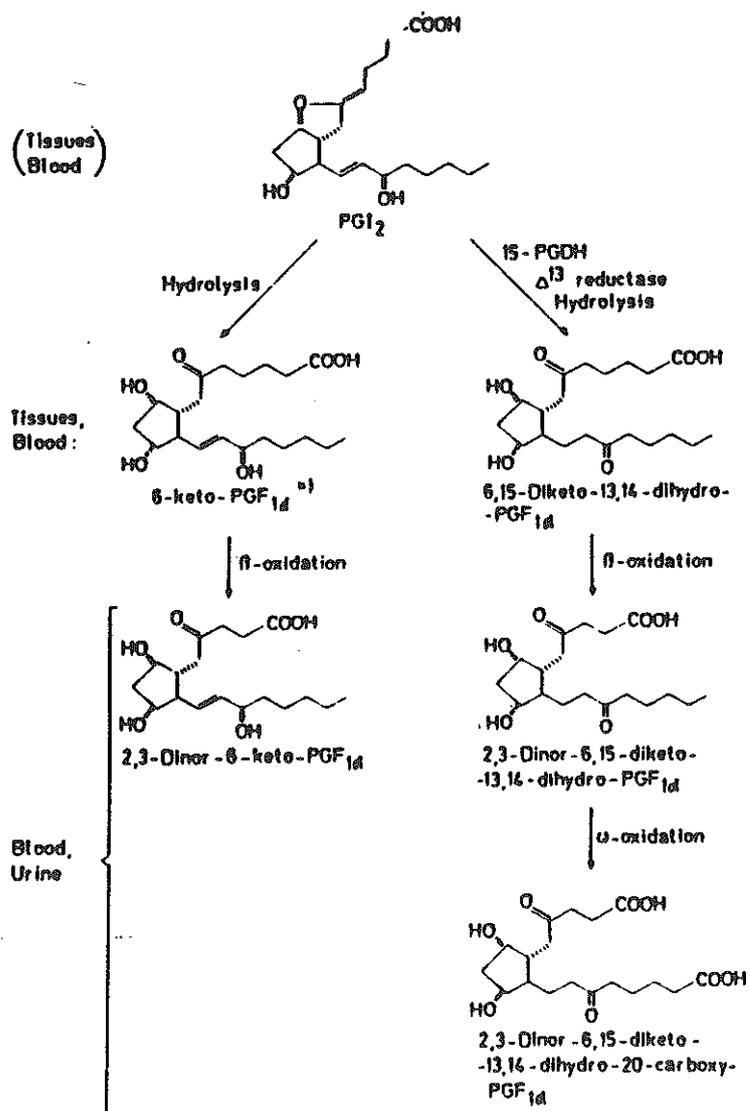


Figure 7 : Principales voies métaboliques de PGI<sub>2</sub>.  
(GRANSTROM E. et coll., 1987)

Comme les cyclooxygénases, les lipoxygénases sont des dioxygénases qui catalysent, en général, l'incorporation d'oxygène moléculaire dans des acides gras possédant au moins une structure cis, cis-1,4-pentadiène à une exception près : la lipoxygénase des réticulocytes peut oxyder des acides gras estérifiés, des phospholipides et parfois des membranes biologiques (KUHNS H. et coll., 1990b).

Chez les mammifères, trois lipoxygénases ont été mises en évidence : la 5, la 12 et la 15.

### I.1- Mécanisme réactionnel.

Les lipoxygénases contiennent un atome de fer non hémique qui semble indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme (PERCIVAL M.D., 1991). Le rôle du fer dans la lipoxygénase 1 de soja a été très étudié et la conversion du fer ferreux en ion ferrique est la résultante de l'activation de l'enzyme. Les travaux de NAVARATNAM S. et coll. (1988) et de DUNHAM W.R. et coll. (1990) précisent que ce fer est lié à six ligands dont probablement quatre histidines provenant de résidus imidazolés. NELSON M.J. et coll. (1991), d'après leurs travaux en résonance paramagnétique (RPM), suggèrent que le fer ferrique de l'enzyme est lié à une molécule d'eau ou à un hydroxyle.

Le rôle de cet atome de fer est très discuté. Ce fer passe des états ferreux (FeII) et ferrique (FeIII) tout au long de l'activité catalytique de l'enzyme. Deux mécanismes, basés essentiellement sur les études de la lipoxygénase de soja et du réticulocyte, sont proposés pour expliquer la participation du fer dans les réactions de dioxygénation (Figure 8):

a- l'enzyme FeIII enlève un atome d'hydrogène du substrat; il est alors réduit en enzyme FeII ; un proton et un radical pentadiényle sont alors libérés. Ce dernier réagit directement sur un oxygène moléculaire pour donner un radical peroxy qui capte un électron et un proton pour former un hydroperoxyde et restituer l'enzyme FeIII (NELSON M.J. et coll., 1991).

b- un autre mécanisme impliquant la formation de complexe intermédiaire fer-carbone est proposé ; COREY E.J. et coll., (1989) suggèrent

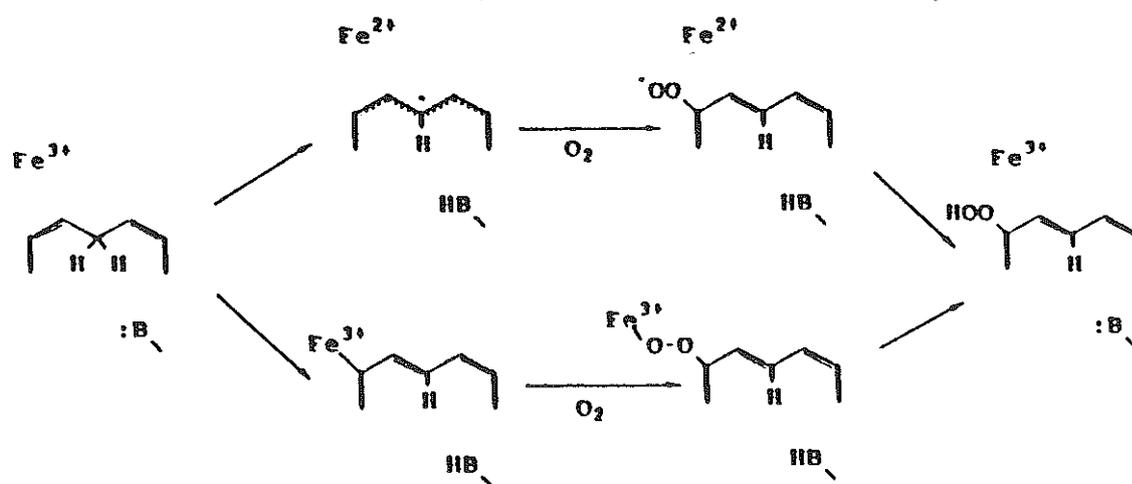


Figure 8 : Mécanisme d'hydroperoxydation par les lipoxygénases faisant intervenir l'atome de fer et l'accepteur d'hydrogène ( $\text{:B-}$ ).  
(NELSON M.J. et coll., 1991)

que la déprotonisation du substrat s'accompagne de la formation d'un complexe intermédiaire fer-alkyl et que l'insertion de l'oxygène se fait au niveau de la liaison carbone-fer, formant un complexe peroxyde ferrique. La RPM va à l'encontre de cette hypothèse (NELSON M.J. et coll., 1991).

La réaction enzymatique, à proprement parlé, est initiée par l'enlèvement stéréospécifique d'un atome d'hydrogène du groupe méthylène situé entre deux double liaisons cis (Figure 9) (HAMBERG M. et coll., 1974) (PANOSSIAN A. et coll., 1982). D'après NELSON M.J. et coll. (1991) l'élimination du proton est directement associée à la réduction à l'état ferreux de l'enzyme et à la formation d'un radical pentadiényl. Ce radical libre instable subit rapidement un réarrangement moléculaire caractérisé par la migration des électrons  $\Pi$  de la double liaison 4-5 ou 1-2 du motif pentadiène vers une double liaison 3-4 ou 2-3 à configuration trans. Le carbone électroniquement déficitaire est attaqué par une molécule d'oxygène introduite de façon antarafaciale par rapport à l'abstraction de l'hydrogène (HAMBERG M. et coll., 1980) (PANOSSIAN A. et coll., 1982).

Le produit de la réaction est un hydroperoxyde d'acide gras : hydroperoxyde-cis,trans-diène.

## I.2- Régulation des réactions lipoxygénasiques .

L'activation étant due en partie à l'oxydation directe du site actif de l'enzyme par des hydroperoxydes (SCHEWE T. et coll., 1986), une des caractéristiques de la réaction lipoxygénasique est l'existence d'une période de latence, correspondant au temps de formation d'une quantité suffisante de dérivés hydroperoxydes (SCHEWE T. et coll., 1986). Ce temps de latence est en effet supprimé par l'addition d'hydroperoxydes (DEGROOT J.J.M.C. et coll., 1975).

Les travaux de SCHEWE T. et coll. (1986) et de CASHMAN J.R. (1985) révèlent que de fortes concentrations de ces mêmes hydroperoxydes formés pendant la réaction de dioxygénation peuvent par contre inhiber les lipoxygénases. Le mécanisme d'auto inactivation serait similaire à celui observé pour l'acide-5,8,11,14-eicosatétrayénoïque, un analogue tétra-acétylé de l'acide arachidonique (KUHNS H. et coll., 1984). L'oxydation d'une méthionine

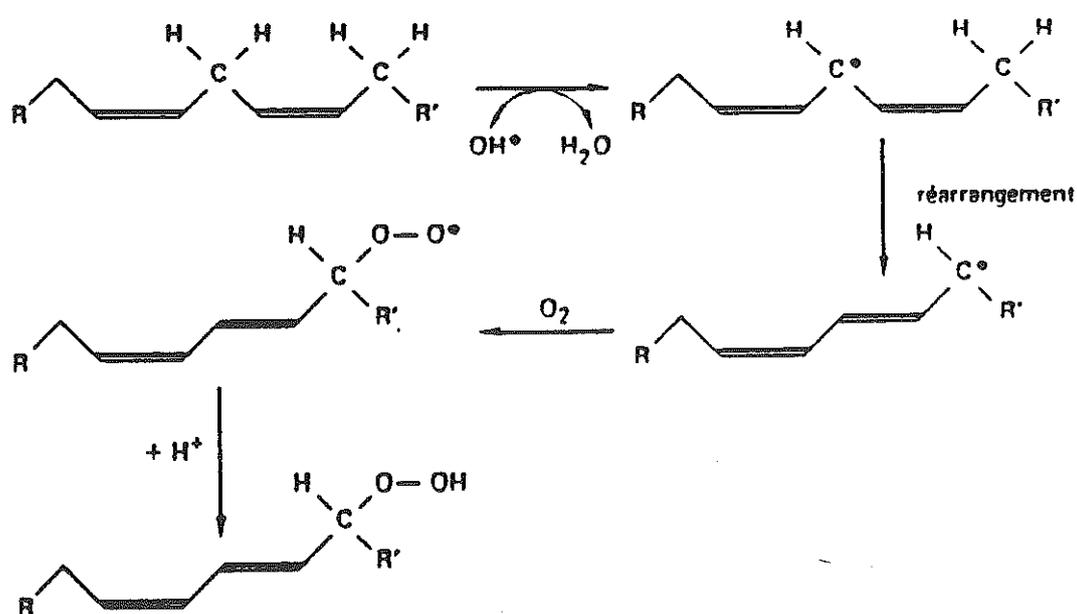


Figure 9 : Mécanisme radicalaire sur les acides gras polyinsaturés.

essentielle au site actif de l'enzyme et la formation d'une méthionine sulfoxyde serait responsable de l'inactivation des lipoxygénases. La sensibilité à ces inhibiteurs lors de phénomènes d'auto-inhibition dépend de la nature de l'enzyme, de la température et du pH du milieu réactionnel. L'action des acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HPETEs) est irréversible et celle des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) est réversible.

### I.3- Régiospécificité de la réaction lipoxygénasique.

Aucune structure tridimensionnelle des lipoxygénases n'a pu être définie. Toutefois, SLOANE D.L. et coll. (1991) ont mis en évidence des séquences polypeptidiques présentes dans les lipoxygénases semblant impliquées dans l'action catalytique spécifique de l'enzyme sur le substrat. De nombreuses similitudes existent entre les différentes lipoxygénases en particulier les 12 et 15 lipoxygénases. Pour identifier, le ou les facteurs responsables du positionnement du substrat par rapport au site actif des lipoxygénases, SLOANE D.L. et coll. (1991) ont substitué la méthionine (Met) 418 en valine (Val) sur la 15 lipoxygénase humaine. La nouvelle protéine possède des propriétés 12 et 15 lipoxygénasiques en proportions égales, mais aucune activité 5 lipoxygénasique. Le remplacement par d'autres acides aminés n'entraîne aucune modification de spécificité de position. SLOANE D.L. et coll. (1991) suggèrent que le remaniement spécifique Met 418 Val entraîne une modification de liaison du substrat au site actif. Ce remplacement se traduit par une réduction du volume de la chaîne de 17% (PONDER J.W. et coll., 1987).

La réaction lipoxygénasique dépend de la distance qui sépare le méthylène sur lequel s'exerce l'activité enzymatique et le méthyle terminal du substrat. KUHN H. et coll. (1990 a) ont montré que la lipoxygénase de soja réagit sur le méthylène en position n-8 (C13 de l'acide arachidonique) donnant des hydroperoxydes n-6 (15 HPETE de l'acide arachidonique). De même, ils ont montré que la lipoxygénase des réticulocytes agit de préférence sur le méthylène n-9 et, en accord avec les travaux de BRYANT R.W. et coll. (1982), qu'elle permet l'élimination d'un hydrogène en C10 ou C13 de l'acide arachidonique donnant des

12 et 15 HPETE en proportion 1:9.

KUHN H. et coll. (1990a) proposent un schéma expliquant la spécificité simple ou double de position des enzymes (Schéma 3) ; le substrat d'une lipoxygénase est dit optimal (A) lorsque le méthylène est positionné en face du site actif de l'enzyme; dans le cas contraire (B), lorsque l'accepteur d'hydrogène se situe entre deux groupements méthylènes l'abstraction de l'hydrogène peut se faire en deux positions différentes: on parle alors de double spécificité de position pour la lipoxygénase.

Le site actif des lipoxygénases n'a pas été identifié avec certitude; SHIBATA D. et coll. (1988) ont toutefois montré que l'acide aminé 418 est adjacent à la région contenant 5 histidines retrouvée dans toutes les lipoxygénases et à laquelle est attribué un rôle important dans la fixation du fer responsable en partie de l'activité catalytique des lipoxygénases. En voyant tous ces résultats, SLOANE D.L. et coll. (1991) proposent un modèle d'interaction substrat-enzyme (Figure 10): l'acide aminé 418 Met de la 15 lipoxygénase ou 419 Val de la 12 lipoxygénase, à caractère hydrophobe, agit vraisemblablement, ainsi que les acides aminés adjacents, avec l'extrémité méthyle terminale de l'acide gras. La fixation plus profonde du méthyle terminal déplace le site d'abstraction de l'hydrogène C13 au C10 de l'acide arachidonique et conduit à une 12 lipoxygénation plutôt qu'à une 15.

#### I. 4- Nomenclature des lipoxygénases.

Selon la nomenclature internationale, les lipoxygénases sont nommées linoléate: oxygénase oxydoréductase EC.1.13.11.12. Cette nomenclature apparaît insuffisante; les lipoxygénases représentent une vaste famille et en fonction de leur provenance (animal ou végétal), de l'espèce et de la localisation tissulaire ou cellulaire, ces enzymes agissent sur des substrats variés et spécifiques et synthétisent des produits réactionnels différents. Dans la pratique courante (SAMUELSSON B. et coll., 1987), les lipoxygénases sont différenciées les unes des autres par :

- l'identification de l'espèce d'origine animale ou végétale;

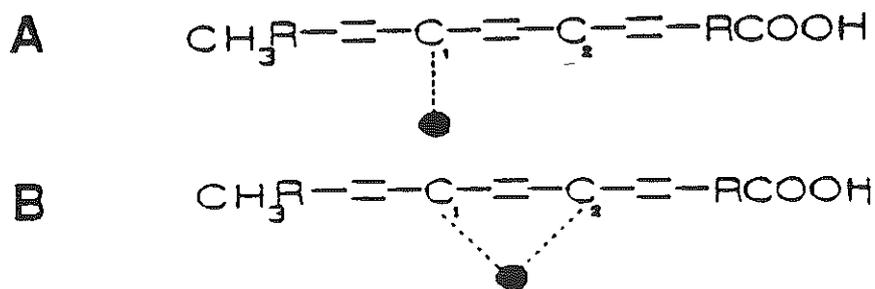
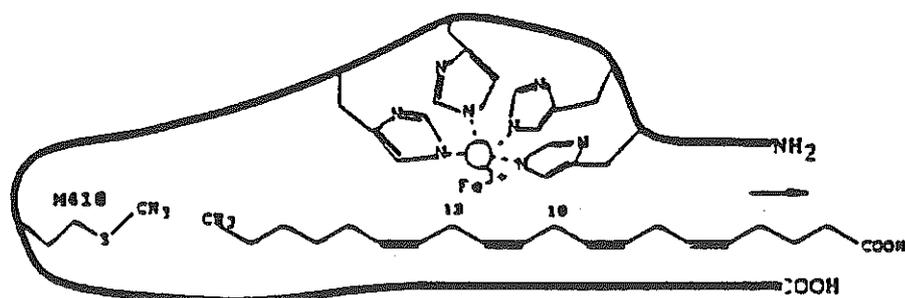


Schéma 3 : Spécificité de position simple (A) ou double (B).  
(KUHNS H. et coll., 1990a)

### 15-Lipoxygénase



### 12-Lipoxygénase

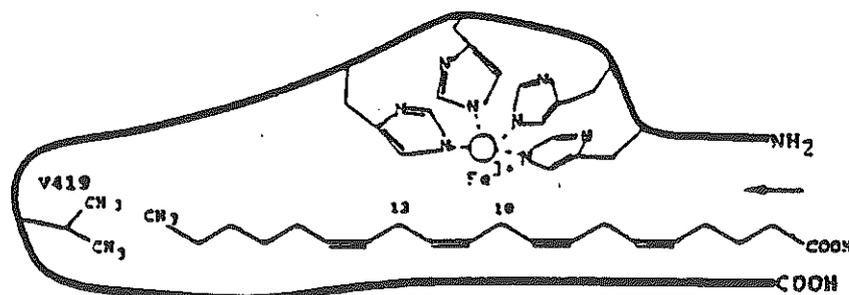


Figure 10 : Interaction acide arachidonique - lipoxygénase.  
(SLOANE D.L. et coll., 1991)

- la position de l'atome de carbone compté à partir de la fonction carboxylique de l'acide gras polyinsaturé sur lequel est réalisée la dioxygénation ;
- la nature du substrat.

KUHN H. et coll. (1986) proposent une nomenclature tenant compte de la spécificité, de la stéréospécificité de l'hydrogène extrait, ainsi que de celle de l'oxygène introduit et du type de la réaction catalysée. CHABLE-RABINOVITCH et coll. (1988) suggèrent d'adjoindre à la formule une des caractéristiques physiques spécifiques de l'enzyme (PHi, PH optimum ou PM).

### I.5- Les lipoxygénases de mammifères.

Chez les mammifères, six types d'activité lipoxygénasique ont été décrites ; sur l'acide arachidonique l'attaque exercée par les lipoxygénases peut s'effectuer sur le C7, le C10, ou le C13 et en fonction du point d'insertion de la molécule d'oxygène (déplacement du radical libre vers le COOH ou vers le CH<sub>3</sub> terminal de l'acide arachidonique) six hydroperoxydes peuvent être formés (Figure 11) :

- \* attaque en C7 : - 5 HPETE ou acide hydroperoxy-5- eicosatétrène-trans 6,cis 8, 11, 14- oïque ;
- 9 HPETE ou acide hydroperoxy-9-eicosatétrène- cis 5, 11, 14,trans 7-oïque;
- \* attaque en C10 : - 8 HPETE ou acide hydroperoxy-8- eicosatétrène-cis 5, 11, 14,trans 9-oïque;
- 12 HPETE ou acide hydroperoxy- 12- eicosatétrène-cis 5, 8, 14, trans 10-oïque;
- \* attaque en C13 : -11 HPETE ou acide hydroperoxy-11- eicosatétrène-cis 5, 8, 14, trans 12-oïque;
- 15 HPETE ou acide hydroperoxy- 15- eicosatétrène- cis 5, 8 11, trans 13-oïque.

Les 5, 12 et 15 lipoxygénases sont les seules lipoxygénases à avoir été isolées chez les mammifères et ont une importance qualitative et quantitative.

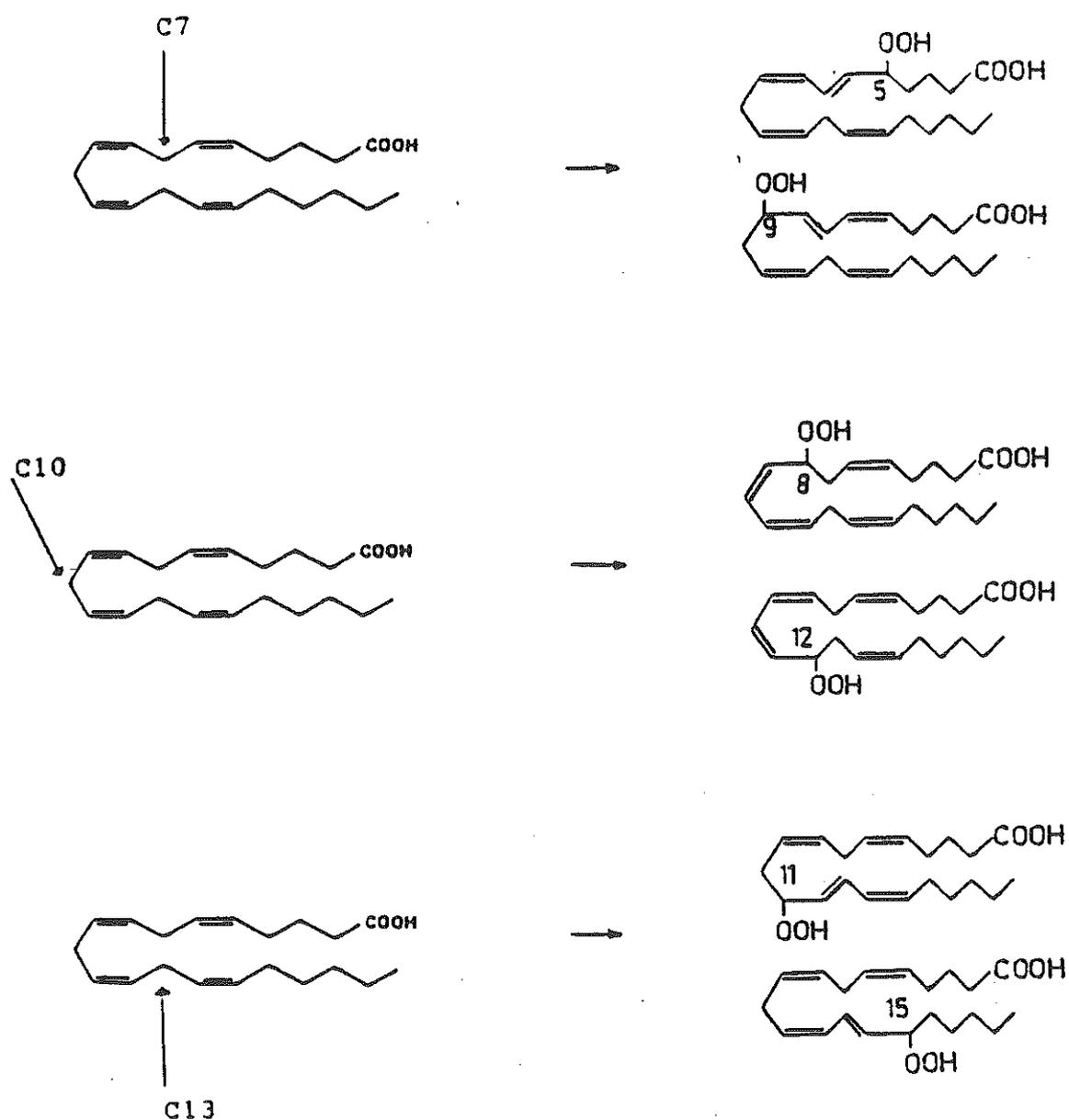


Figure 11 : Points d'attaque des lipoxygénases animales et points d'insertion possibles de l'oxygène moléculaire sur l'acide arachidonique.

### I.5.1- La 12 lipoxygénase.

C'est la première lipoxygénase découverte chez l'animal; son activité a été initialement décrite à partir de plaquettes humaines (HAMBERG M. et coll., 1974). Depuis, cette activité a été mise en évidence dans de nombreux tissus et cellules mammifères et l'enzyme lui même a pu être isolé et purifié dans de nombreuses espèces animales.

Chez l'homme, FUNK C.D. et coll. (1992) ont caractérisé deux gènes codant pour cet enzyme. L'activité 12 lipoxygénasique des plaquettes se situe au niveau de fractions cytosoliques et membranaires et la translocation de l'enzyme à la membrane est médiée par une augmentation de calcium intracellulaire chez le rat (BABA A. et coll., 1989).

La 12 lipoxygénase catalyse la transformation de l'acide arachidonique en 12 HPETE et exerce une activité leucotriène A<sub>4</sub> synthétase (WALSTRA P. et coll., 1987) (YAMAMOTO S. et coll., 1987).

Elle est activée par le 12 HPETE mais pas par le 12 HETE (SIEGEL M.I. et coll., 1979). Les endoperoxydes formés par la voie de la cyclooxygénase active aussi la 12 lipoxygénase plaquettaire (HAMBERG M. et coll., 1974). Par contre 15 HPETE et 15 HETE l'inhibent (VANDERHOEK J.Y. et coll., 1980a).

### I.5.2- La 15 lipoxygénase.

Présent dans de nombreux tissus et cellules mammifères, cet enzyme a été très étudié à partir des polynucléaires éosinophiles humains. La 15 lipoxygénase est marquée dans son ensemble par un caractère hydrophile en accord avec sa localisation cytosolique (SIGAL E., 1991).

La 15 lipoxygénase convertit l'acide arachidonique en 15 HPETE et peut aussi catalyser l'oxygénation d'autres acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide linoléique, et des acides gras incorporés aux phospholipides (SOBERMAN R.J. et coll., 1985a). C'est la seule lipoxygénase capable de s'attaquer aux membranes biologiques (SCHEWE T. et coll., 1986).

L'état d'activation de cet enzyme n'est pas clairement défini. Il semblerait que pour métaboliser l'acide arachidonique certaines étapes d'activation soient nécessaires. Pour que les cellules de lymphome murin EL-L produisent du 15 HETE, il faut les stimuler par de l'acide arachidonique et soit du ionophore, soit de l'interleukine 1, soit une phytohémagglutinine, soit du phorbol myristate acétate (FARRAR W.L. et coll., 1985).

En fait, il semblerait que la 15 lipoxygénase soit soumise à des mécanismes de contrôle post-transcriptionnel: les réticulocytes immatures possèdent l'ARNm de la 15 lipoxygénase sans exprimer la protéine 15 lipoxygénase ; par contre, les réticulocytes matures contiennent l'ARNm et la protéine 15 lipoxygénase. Il semblerait qu'il existe une protéine régulatrice qui réprime la transduction de l'ARNm 15 lipoxygénase et, la synthèse de 15 lipoxygénase ne peut être réalisée qu'après un certain stade de différenciation cellulaire (SIGAL E., 1991). L'activité catalytique de la 15 lipoxygénase sur les acides gras polyinsaturés des membranes biologiques (mitochondriale et plasmique) apparaît comme un élément indispensable pour la maturation des hématies (KUHN H. et coll. 1990 b).

De même l'expression de l'ARNm de la 15 lipoxygénase dans les monocytes est, semble-t-il, réprimée (CONRAD D.J. et coll., 1992). Par contre, la 15 lipoxygénase est exprimée par les macrophages impliqués dans l'athérosclérose. L'induction de l'enzyme au niveau de l'ARNm 15 lipoxygénase chez les monocytes sanguins, est stimulée par l'interleukine 4 (IL-4) et est inhibée par l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) et l'hydrocortisone (CONRAD D.J. et coll., 1992). IL-4 et INF $\gamma$  apparaissent comme des régulateurs physiologiques de l'expression de la 15 lipoxygénase dans les monocytes humains (CONRAD D.J. et coll., 1992).

Les HETEs et en particulier les 5 et 15 HETEs sont des activateurs de la 15 lipoxygénase, (NICHOLS R.C. et coll., 1990). Cette activation s'accompagne de l'inhibition de la 5 lipoxygénase.

La 15 lipoxygénase peut aussi produire le 12 HPETE à partir de l'acide arachidonique, cette production est mineure comparée à celle de 15 HPETE (le rapport est de 1 : 9) (BRYANT R.W. et coll., 1982).

Sous l'action de la 15 lipoxygénase, l'acide dihomog $\gamma$ -linoléique et l'acide

eicosapentaénoïque sont transformés en leurs dérivés 15-hydroperoxy respectifs.

L'acide linoléique est un autre substrat important de la 15 lipoxygénase ; il est métabolisé en acide hydroperoxy-13-octadécadiène-9,11-oïque, 13 HPOD, majoritaire et en hydroperoxy-9-octadécadiène-10, 12-oïque, 9 HPOD.

### I.5.3- La 5 lipoxygénase .

Elle catalyse la formation de 5 HPETE à partir de l'acide arachidonique, étape initiale dans la synthèse des leucotriènes. La 5 lipoxygénase humaine code pour une protéine de 78 KDa (DIXON R.A.F. et coll., 1988). Elle possède une région riche en histidine qui par homologie avec les autres lipoxygénases est pour certains auteurs impliquée dans la liaison avec le fer non hémique. Toutefois, la mutation de deux des cinq histidines n'affecte pas l'activité enzymatique (FUNK C.D. et coll., 1989). Par contre, l'histidine 367, 372, 550 et la glutamine 376 contribuent à l'activité 5 lipoxygénasique (ISHII S. et coll., 1992).

L'inactivation de l'enzyme en aérobie entraîne une rapide libération de fer mais l'enzyme conserve, même inactivé, sa capacité de lier l'ATP suggérant aucune altération majeure dans sa structure tertiaire (PERCIVAL M.D., 1991). Pour exercer une activité maximale, cet enzyme a essentiellement besoin de  $Ca^{++}$  et d'ATP (ROUZER C.A. et coll., 1985). Dans les cellules au repos, les 5 lipoxygénases humaines apparaissent comme étant des enzymes cytosoliques présentant un domaine hydrophobe, site de fixation membranaire. Le traitement de PMN humains par du calcium ionophore A23187 est suivi de la translocation de l'enzyme du cytosol à un site membranaire. Cette translocation semble, elle aussi, jouer un rôle capital dans l'activation enzymatique (ROUZER C.A. et coll., 1988). Une protéine de 18 KDa, la FLAP ou "five lipoxygenase activating protein", a été isolée à partir des membranes des PMN humains. Cette protéine sert de récepteur pour un puissant inhibiteur de la synthèse des leucotriènes, le MK-886, qui inhibe l'association lipoxygénase-membrane. FORD-HUTCHINSON A.W. (1991a) suggèrent que la 5 lipoxygénase s'associe à cette protéine après sa translocation du cytosol à la membrane pour exercer son activité catalytique (Figure 12).

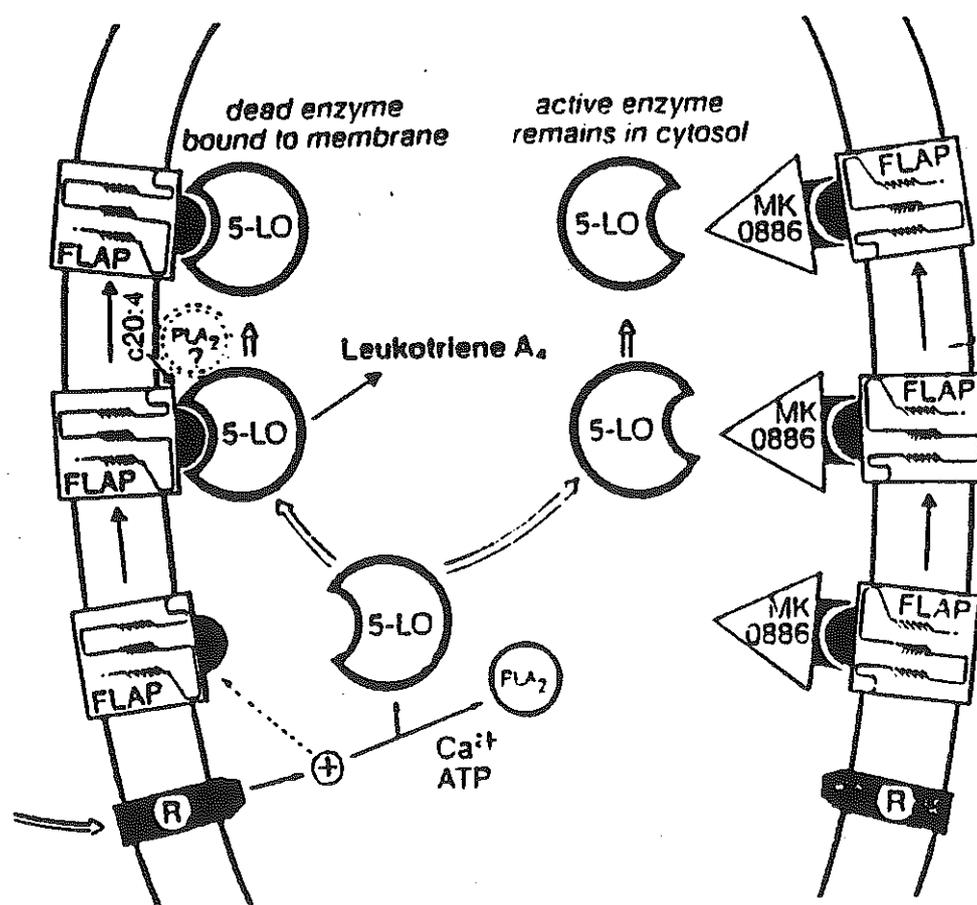


Figure 12 : Activation de la 5 lipoxygénase (5-LO) par la FLAP.  
(FORD-HUTCHINSON A.W., 1991 a)

D'autres facteurs influencent l'activité de la 5 lipoxygénase ; 12 HPETE libéré en grande partie par les plaquettes lors des réactions allergiques et inflammatoires, l'active alors que 12 HETE est inactif. 15 HPETE et 15 HETE inhibent de façon marquée l'activité enzymatique dans les leucocytes (CASHMAN J.R. et coll., 1988).

L'acide eicosatriénoïque et l'acide eicosapentaénoïque peuvent entrer en compétition avec l'acide arachidonique au niveau du site de fixation du substrat de la 5 lipoxygénase entraînant une diminution de synthèse d'eicosanoïdes issus de l'acide arachidonique.

PETERS-GOLDEN M. et coll. (1988) ont montré que des acides gras, notamment l'acide arachidonique, peuvent être à l'origine d'une déplétion en ATP dans les cellules diminuant par là même l'activité de la lipoxygénase.

En plus de la formation de 5 HPETE, la 5 lipoxygénase possède une activité LTA<sub>4</sub> synthétase (ROUZER C.A. et coll., 1986).

L'ADN complémentaire de l'enzyme humaine a été isolé et cloné à partir de placenta humain et de cellules HL 60 différenciées par le diméthylsulfoxyde (Figure 12 bis). Il code pour une protéine de PM 78000 et présente certaines homologies avec la séquence d'autres lipases (DIXON R.A.F. et coll., 1988).

#### I.5.4- Homologie structurale entre lipoxygénases humaines.

Les 5, 12 et 15 lipoxygénases humaines présentent dans leur structure primaire une similitude de séquence de 60% (SIGAL E., 1991). Le pourcentage d'identité est de 25% et de similitude de 45% avec la lipoxygénase 1 de soja (SIGAL E., 1991). La 12 lipoxygénase des leucocytes de porc et la 15 lipoxygénase des réticulocytes humains possèdent 86% d'identité et 93% de similitude. La différence de séquence entre ces deux enzymes se situe dans la régiospécificité de lipoxygénation (SIGAL E., 1991). La 12 lipoxygénase plaquettaire humaine est plus proche (65% d'identité) de la 15 lipoxygénase humaine que de la 5 (40% d'identité) mais distincte de la 12 lipoxygénase porcine. L'identité de séquence entre les 5 et 15 lipoxygénases humaines est de 40% (SIGAL E., 1991).

```

1 GGGCGCCGAG GCTCCCCGCC GCTCGCTGCT CCCCGGCCCC CGCCATGCCC TCCTACACGG
61 TCACCGTGGC CACTGGCAGC CAGTGGTTCG CCGGCAGTGA CGACTACATC TACCTCAGCC
121 TCGTGGGCTC GGCGGGCTGC AGCGAGAAGC ACCTGTGGA CAAAGCCCTC TACAAAGACT
181 TCGAGCGTGG CGCGGTGGAT TCATACGACG TGACTGTGGA CGAGGAACCTG GCGGAGATCC
241 AGCTGGTCAG AATCGAGAAG CGCAAGTACT GGCTGATGA CGACTGGTAC CTGAAGTACA
301 TCACGCTGAA GACGCCCCAC GGGGACTACA TCGAGTTCCT CTGCTACCGC TGGATCACCG
361 GCGATGTGCA GGTGTCTCTG AGGGATGGAC GCGCAAGTT GGCCCCGAGT GACCAAATTC
421 ACATTCTCAA GCAACACCGA CGTAAAGAAC TGGAAACACG GCMAAAACAA TATCGATGGA
481 TGGAGTGGAA CCCTGGCTTC CCCTTGAGCA TCGATGCCAA ATGCCACAA GATTTACCCC
541 GTGATATCCA GTTGTATAGT GAAAAAGGAG TGGACTTTGT TCTGAATTAC TCCAAAAGCA
601 TGGAGAACCT GTTCATCAAC CGCTTCATGC ACATGTTCCA GTCTTCTTGG AATGACTTCG
661 CCGACTTTGA GAAATCTTT GTCAAGATCA GCAACACTAT TTCTGAGCGG GTCATGAATC
721 ACTGGCAGGA AGACCTGATG TTTGGCTACC AGTTCCTGAA TGGCTGCAAC CCTGTGTGTA
781 TCCGGCGCTG CACAGAGCTG CCGGAGAACG TCCCAGTGAC CACGGAGATG GTAGAGTGCA
841 GCCTGGAGCG GCAGCTCAGC TTGGAGCAGG AGGTCCAGCA AGGGAACATT TTCATCGTGG
901 ACTTTGAGCT GCTGGATGGC ATCGATGCCA ACAAACAGA CCCCAGCACA CCCCAGTTC
961 TGGCCGCTCC CATCTGCTTG CTGATTAAGA ACCTGGCCAA CAAGATGTC CCCATGCCA
1021 TCCAGCTCAA CCAATCCCG GGAGATGAGA ACCCTATTTT CCTCCCTTCG GATGCAAAAT
1081 ACGACTGGCT TTTGGCCAAA ATCTGGGTGC GTTCCAGTGA CTCCACGTC CACCAGCCA
1141 TCACCCACCT TCTGCGAACA CATCTGGTGT CTGAGGTTT TGGCATTGCA ATGTAACGCC
1201 AGCTGCCTGC TGTGCACCCC ATTTTCAGC TGCTGGTGGC ACACGIGAGA TTCACCATG
1261 CAATCAACAC CAAGGCCCGT GAGCAGCTCA TCTGCGAGT TGGCCTCTT GACAAAGCCA
1321 ACGCCACAGG GGGCGGTGGG CACGTGCAGA TGGTGCAGAG GGCCATGAAG GACCTGACCT
1381 ATGCCTCCCT GTGCTTTCCT GAGGCCATCA AGGCCCGGG CATGGAGAGC AAAGAAGACA
1441 TCCCCTACTA CTTCTACCGG GACGACGGGC TCCGTGGTGT GGAAGCCAIC AGGACGTICA
1501 CGGCCGAGGT GGTAGACATC TACTACGAGG GCGACCAGGT GGTGGAGGAG GACCCGGAGC
1561 TGCAGGACTT CGTGAACGAT GTCTACGTGT ACGGCATGCG GGGCCGCAAG TCCTCAGGCT
1621 TCCCCAAGTC GGTCAAGAGC CCGGAGCAGC TGTCGGAGTA CCGTACCCTG GTGATCTCA
1681 CCGCCTCCGC CCAAGCACGC GCGGTCAACT TCGGCCAGTA CGACTGGTGC TCCTGGATCC
1741 CCAATGCGCC CCAACCATG CGAGCCCCGC CACCGACTGC CAAGGGCGTG GTGACCATG
1801 AGCAGATCGT GGACACGCTG CCCGACCGCG GCCGCTCCTG CTGGCATCTG GGTGCAGTGT
1861 GGGCGCTGAG CCAGTCCAG GAAACGAGC TGTTCCIGGG CATGTACCCA GAAGAGCATT
1921 TTATCGAGAA GCCTGTGAG GAAGCCATGG CCCGATTCCG CAAGAACCCT GAGGCCATTG
1981 TCAGCGTGAT TGCTGAGCGC AACAAAGAAGA AGCAGCTGCC ATATTACTAC TTGTCCCCAG
2041 ACCGGATTCC GAACAGTGTG GCCATCTGAG CACACTGCCA GTCTCACTGT GGGAAAGCCA
2101 GCTGCCCCAG CCAGATGGAC TCCAGCCTGC CTGGCAGGCT GTCTGGCCAG GCCTCTTGGC
2161 AGTCACATCT CTTCCTCCGA GGCCAGTACC TTTCCATTTA TTCTTTGATC TTCAGGGAAC
2221 TGCATAGATT GTATCAAGT GTAAACACCA TAGGGACCCA TTCTACACAG AGCAGGACTG
2281 CACAGGCGTC CTGTCCACAC CCAGCTCAGC ATTTCCACAC CAAGCAGCAA CAGCAATCA
2341 CGACCACTGA TAGATGTCTA TTCTTGTGG AGACATGGGA TGATTATTTT CTGTCTATT
2401 TGTGCTTAGT CCAATTCCTT GCACATAGTA GGTACCCAAT TCAATTACTA TTGAATGAAT
2461 TAAGAAATGG TTGCCATAAA AATAAATCAG TTCATTT

```

Figure 12 bis : Séquence de l'ARN messager de la 5 lipoxgénase.

(DIXON R.A. et coll., 1988)

## II- Les métabolites issus de la voie des lipoxygénases.

### II.1- Voie de la 12 lipoxygénase.

La 12 lipoxygénase catalyse la transformation d'acide arachidonique en 12 HPETE (HAMBERG M. et coll., 1974). La présence de cette activité 12 lipoxygénasique a été mise en évidence dans les neutrophiles, les muscles lisses vasculaires, l'endothélium vasculaire, les érythrocytes, les macrophages, les cellules glomérulaires, les kératinocytes, etc., et surtout les plaquettes.

Le 12 HPETE peut être réduit spontanément ou par une glutathion peroxydase en 12 HETE, acide hydroxy-12-eicosatétraénoïque. Ce dernier peut subir une  $\omega$ -oxydation conduisant à la formation de 12,20 diHETE.

Si la concentration en oxygène est faible, le 12 HPETE peut être converti en hépoxilines (EPETEs) (PACE-ASCIAK C.R. et coll., 1989) (Figure 13) : acide hydroxy-8-époxy-11,12-eicosatriène-5, 9, 14-oïque ou hépoxiline A<sub>3</sub> et acide hydroxy-10-époxy-11, 12-eicosatriène-5, 8, 14-oïque ou hépoxiline B<sub>3</sub>.

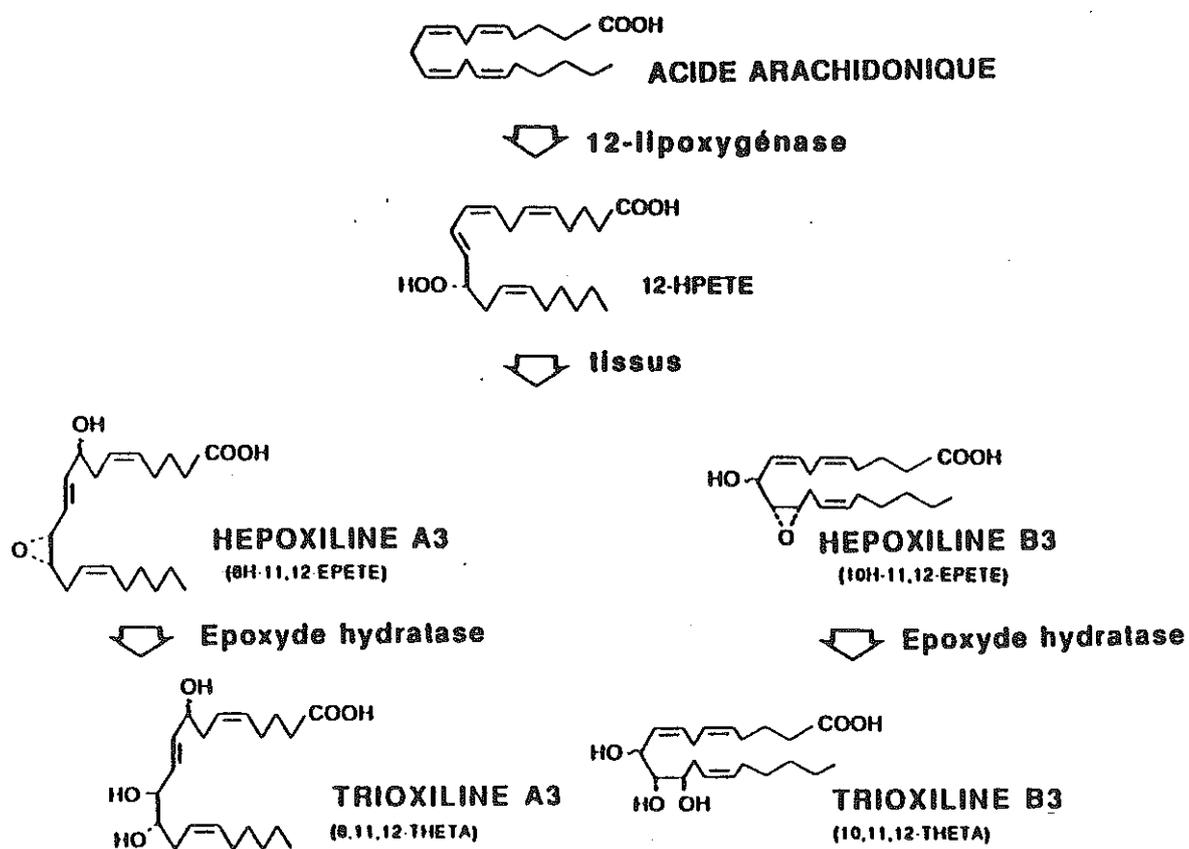
L'origine enzymatique de ces produits n'est pas certaine. Sous l'action d'une époxyde hydratase, HxA<sub>3</sub> instable est transformé en acide trihydroxy-8, 11, 12-eicosatriène-5, 9, 14-oïque ou trioxiline A<sub>3</sub> (THETE). HxB<sub>3</sub>, plus stable, peut suivre la même voie métabolique donnant l'acide trihydroxy-10, 11, 12-eicosatriène-5, 8, 14-oïque ou trioxiline B<sub>3</sub>.

L'acide dihomo- $\gamma$ -linoléique et l'acide eicosapentaénoïque sont transformés sous l'action de la 12 lipoxygénase en leurs dérivés 12 hydroperoxy respectifs.

### II.2- Voie de la 15 lipoxygénase.

La 15 lipoxygénase catalyse la transformation d'acide arachidonique en 15 HPETE. Celui ci peut être réduit en 15 HETE, ou suivre d'autres voies métaboliques conduisant à la formation de dérivés époxydes, dihydroxylés ou trihydroxylés (Schéma 4).

L'activité 15 lipoxygénasique a été mise en évidence dans les réticulocytes, les



**Figure 13: Transformation et catabolisme des hépoxilines.**  
 (PACE-ASCIK C.R. et coll., 1989)

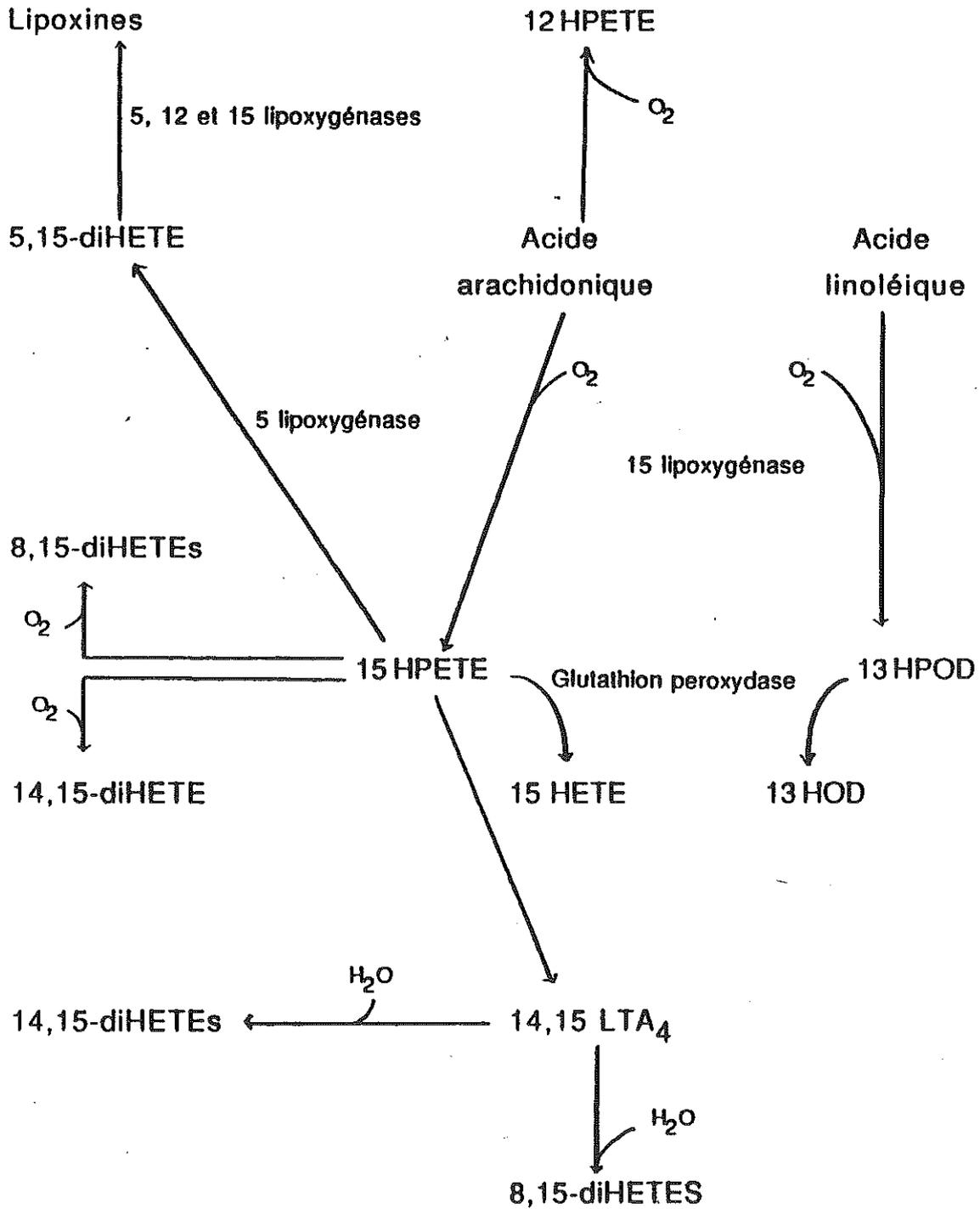


Schéma 4 : Voies métaboliques de l'acide arachidonique libre et de l'acide linoléique par la 15 lipoxygénase et devenir des métabolites produits soumis à l'action de diverses lipoxygénases. (FORD-HUTCHINSON A.W., 1991)

neutrophiles, les éosinophiles, les cellules épithéliales de la trachée et du poumon, etc.

Le 15 HPETE est à l'origine de la formation de lipoxines (Figure 14). Ce sont des dérivés trihydroxylés possédant quatre double liaisons conjuguées. Les deux principales lipoxines formées possédant une activité biologique sont des isomères: lipoxine A ou acide trihydroxy-5S, 6R, 15S- eicosatétraène-trans 7, 9, 13, cis 11-oïque et lipoxine B ou acide trihydroxy-5S, 14R, 15S-eicosatétraène-trans 6, 10, 12, cis 8-oïque (SAMUELSSON B. et coll., 1987). La voie de la biosynthèse de ces composés dépend du type de cellule et du substrat présent (SERHAN C.N. et coll. 1990).

La purification de lipoxines à partir de suspensions leucocytaires incubées avec du 15 H(P)ETE montre l'importance des 5 et 15 lipoxygénases dans ce processus métabolique (FITZSIMMONS B.J. et coll., 1985). La mise en jeu de ces deux enzymes est renforcée par les travaux d'EDENIUS C. et coll. (1990) qui ont mis en évidence la synthèse de lipoxines à partir de substrats endogènes en présence de granulocytes humains possédant une 5 lipoxygénase et de tissus respiratoires riches en activité 15 lipoxygénasique.

L'action conjointe de ces deux lipoxygénases donne aussi des acides 5, 15-dihydroxylés. Une autre voie métabolique est avancée par UEDA N. et coll. (1987). Ils suggèrent que la 12 lipoxygénase des PMNL du porc peut catalyser la synthèse de lipoxine à partir de 5, 15-diHPETE. L'abstraction d'un nouvel atome d'hydrogène sur 15 HPETE conduit à la formation des acides 8, 15- et 14, 15-dihydroxylés. La migration radicalaire et l'interaction avec le groupement 15 hydroperoxy adjacent peut aussi conduire à la formation de composés 14, 15 LTA<sub>4</sub>. L'hydrolyse non enzymatique de cet époxyde instable aboutit à la formation d'acides dihydroxy-8, 15-eicosatétraène-cis 5, trans 9, 11, 13 -oïques (MAAS R.L. et coll., 1981).

### II.3- Voie de la 5 lipoxygénase.

L'activité 5 lipoxygénasique a été mise en évidence dans les monocytes et macrophages, les polynucléaires, les mastocytes, etc. C'est la voie de synthèse des

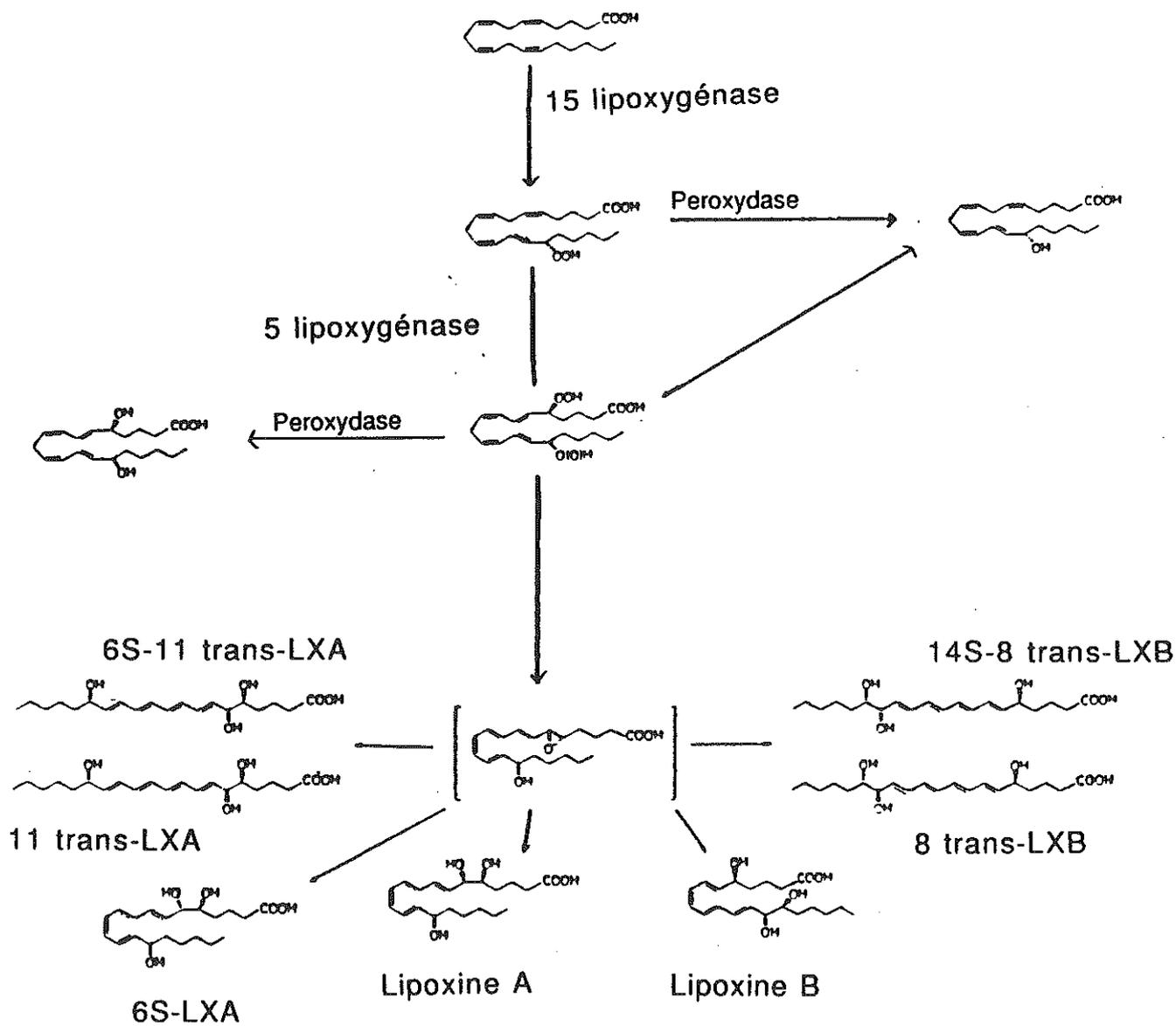


Figure 14 : Formation des lipoxines A et B et de leurs isomères.  
(SAMUELSSON B. et coll., 1987)

leucotriènes décrite pour la première fois par BORGEAT P. et SAMUELSSON B. (1979). Les leucotriènes ont initialement été identifiés dans les leucocytes, et se caractérisent par la présence d'un triène conjugué.

### II.3.1- Nomenclature des leucotriènes (Schéma 5) (SAMUELSSON B., 1983)

Les annotations alphabétiques indiquent la nature des substituants :

- LTA est un époxyde intermédiaire instable,
- LTB est un acide 5(S), 12(R)-dihydroxylés,
- LTC renferme un  $\gamma$ -glutamylcystéinylglycine greffé en C6,
- LTD renferme un cystéinylglycine en C6,
- LTE renferme un résidu cystéine en C6,
- LTF renferme un cystéinyl glutamate en C6.

La souscription 3, 4 et 5 indique le nombre de double liaisons présentent dans la molécule :

- 3, pour les métabolites de DGLA
- 4, pour ceux de l'AA,
- 5, pour ceux de EPA.

### II.3.2- Métabolites de l'acide arachidonique: voie des leucotriènes (Figure 15)

La 5 lipoxygénase catalyse la transformation de l'acide arachidonique en acide hydroperoxy-5-eicosatétraène-trans 6, cis 8, 11, 14-oïque (5 HPETE). Celui ci est rapidement métabolisé en acide hydroxy-5-eicosatétraène-trans 6, cis 8, 11, 14-oïque (5 HETE) ou en oxydo-5(S), 6(S)-eicosatétraène-trans 7, 9, cis 11, 14-oïque, LTA<sub>4</sub> (SAMUELSSON B. et coll., 1987).

5 HETE est formé spontanément ou grâce à l'action catalytique d'une glutathion peroxydase. Il peut être rapidement incorporé aux membranes lipidiques cellulaires.

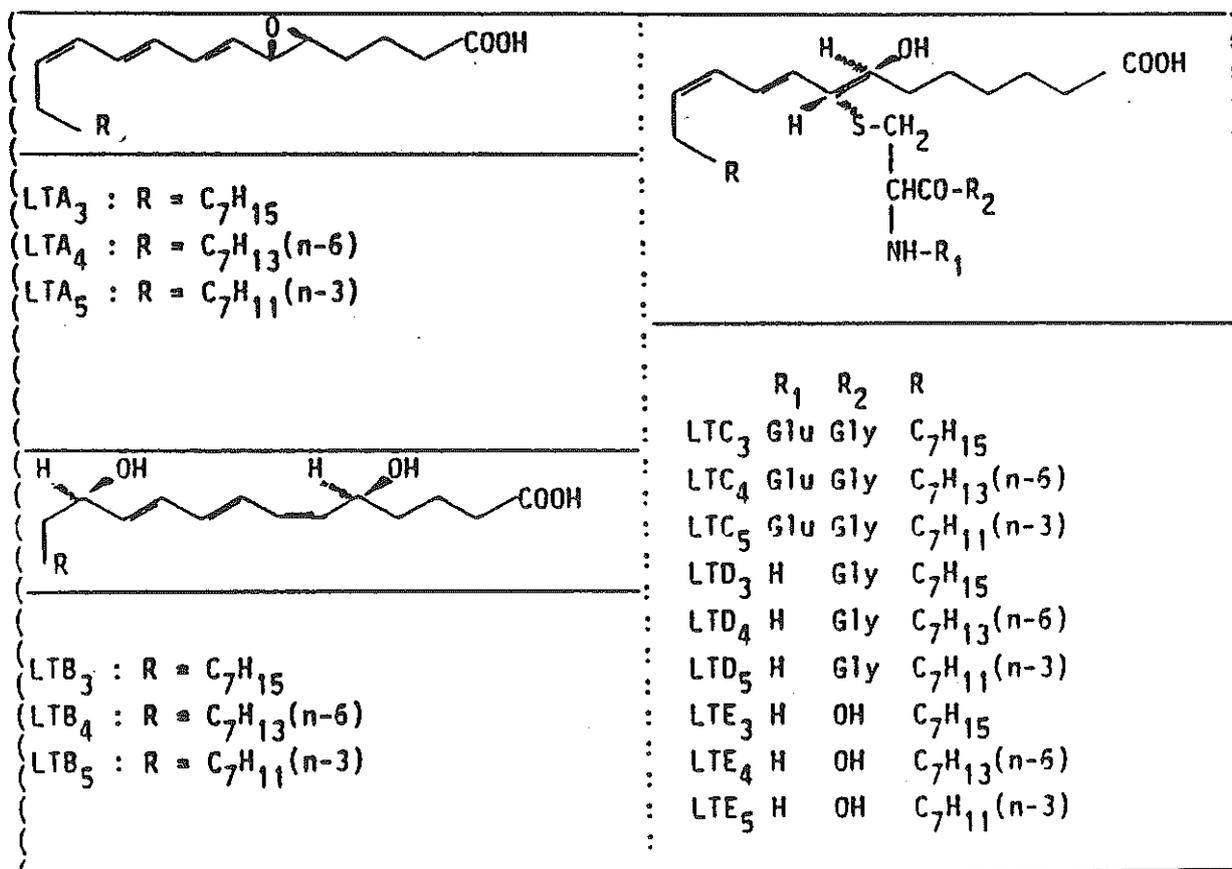


Schéma 5 : Nomenclature des leucotriènes.  
(SAMUELSSON B., 1983)

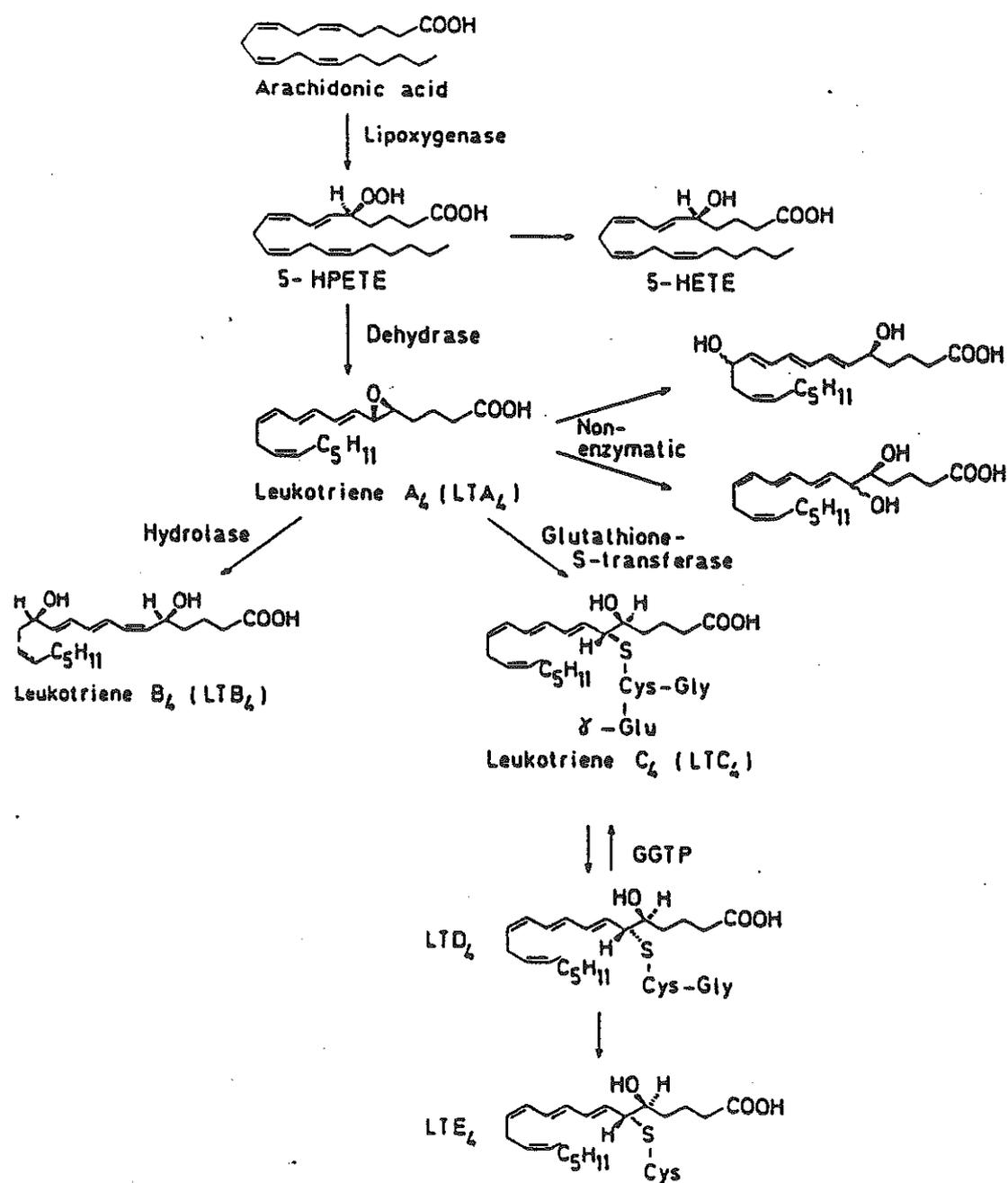


Figure 15 : Voie des leucotriènes.

( d'après BORGÉAT P. et coll., 1985)

La formation de  $LTA_4$  est enzymatique et implique le déplacement stéréospécifique de l'atome d'hydrogène 10(R) de 5 HPETE et la perte d'une molécule d'eau. Cette réaction est catalysée par les 5, 12 lipoxigénases (YAMAMOTO S. et coll., 1987) ou plus fréquemment par la  $LTA_4$  synthétase.

$LTA_4$  est un époxyde allylique instable. Les acides dihydroxy-5(S), 12(R)-eicosatétraène-trans 6, 8, 10, cis 14-oïque ( $\Delta$  6-trans  $LTB_4$ ) et dihydroxy-5(S), 12(S)-eicosatétraène-trans 6, 8, 10, cis 14- oïque ( $\Delta$  6-trans-12-épi- $LTB_4$ ) sont des produits non enzymatiques de  $LTA_4$  qui apparaissent spontanément en milieu aqueux. L'hydrolyse de  $LTA_4$  en isomères dihydroxy-5, 6-eicosatétraène-trans 7, 9, 11, cis 14-oïque peut suivre un mécanisme de formation similaire par attaque en C6 du carbocation intermédiaire (BORGEAT P. et coll., 1979). Toutefois, les isomères 5, 6-dihydroxy peuvent être catalysés par une époxyde hydrolase cytosolique comme l'ont démontré HAEGGSTROM J. et coll. (1986) dans le foie de souris.

Cette époxyde hydrolase cytosolique accepte aussi le 14-15 isomère de  $LTA_4$  comme substrat (WETTERHOLM A. et coll., 1988). D'autre part, UEDA N. et coll. (1988) suggèrent que le 5(S), 6(R)-diHETE est métabolisé à partir de 5 HETE dans les leucocytes du porc sous l'action de la 5 lipoxigénase.

Les acides 5(S),6(R)- et 5(S),6(S)-diHETEs peuvent être convertis en lipoxine  $A_4$  et 6(S) lipoxine  $A_4$  par lipoxigénéation en C15 et en d'autres acides trihydroxyeicosatétraénoïques comme cela a été démontré dans les plaquettes humaines (TORNHAMRE S. et coll., 1992). Cette synthèse plaquettaire peut aussi se faire à partir de  $LTA_4$  exogène et l'intermédiaire formé est le 15-hydroxy- $LTA_4$  (EDENIUS C. et coll., 1991) (SERHAN C.N. et coll., 1990).

Deux voies métaboliques enzymatiques principales permettent la transformation de  $LTA_4$ . Cela peut se faire dans la cellule ayant synthétisé l'époxyde ou suite au transfert du composé dans des cellules ne possédant pas d'activité 5 lipoxigénasique (par exemple : les cellules endothéliales). L'acide dihydroxy-5(S), 12(R)-eicosatétraène-cis 6, 14, trans 8, 10-oïque ou  $LTB_4$  est le produit d'hydrolyse enzymatique de  $LTA_4$ . L'enzyme impliquée est une  $LTA_4$

hydrolase cytosolique (RADMARK O. et coll., 1984).

La seconde voie enzymatique met en jeu une glutathion-S-transférase microsomale ou LTC<sub>4</sub> synthétase (YOSHIMOTO T. et coll., 1988) largement distribuée dans les tissus. L'acide hydroxy-5(S)-glutathionyl-6(R)-S-eicosatétraène-trans 7, 9, cis 11, 14 -oïque (LTC<sub>4</sub>) est le produit de conjugaison d'un glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycocolle) et de LTA<sub>4</sub> en C6. La liaison à l'acide gras est assurée par une liaison sulfoéther. L'acide hydroxy-5(S)-cystéinyl-glycyl-6(R)-S-eicosatétraène-trans 7, 9, cis 11, 14-oïque (LTD<sub>4</sub>) est formé par hydrolyse enzymatique de la chaîne peptidique sous l'action d'une  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase spécifique (TATE S.S. et coll., 1981), et perte du résidu  $\gamma$ -glutamyl. Enfin, LTD<sub>4</sub> peut donner l'acide hydroxy-5(S)-glutathionyl-6(R)-S-eicosatétraène-trans 7, 9, cis 11-14-oïque (LTE<sub>4</sub>) produit de l'action de dipeptidases, par perte d'un résidu glycocolle (LEE C.W. et coll., 1983).

$\Delta$ 11-trans-LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> ont été isolés dans des milieux biologiques (PARKER C.W. et coll., 1980). Un autre dérivé des LTA<sub>4</sub> a été décrit, l'acide hydroxy-5(S)- $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-6(R)-S-eicosatétraène-trans 7, 9, cis 11, 14-oïque (LTF<sub>4</sub>). Ce composé est formé in vitro par incubation de LTE<sub>4</sub> et de glutathion en présence de  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase (BERNSTROM K. et coll., 1982).

### II.3.3- Métabolisme des leucotriènes (Figure 16)

Dans les neutrophiles, la transformation des LTB<sub>4</sub> par  $\omega$ -oxydation est observée après 30 minutes d'incubation (POWELL W.S., 1984). Cette voie métabolique conduit à la formation d'acide trihydroxy-5(S), 12(R), 20-eicosatétraène-cis 6, 14, trans 8, 10-oïque (20-OH-LTB<sub>4</sub>) sous l'action catalytique d'une LTB<sub>4</sub>-20-hydrolase spécifique de la famille des systèmes à cytochrome P450 localisé uniquement dans les microsomes des neutrophiles (SOBERMAN R.J. et coll., 1985b). Ce dérivé biologiquement actif peut être inactivé par oxydation conduisant à la formation d'un aldéhyde, 20-CHO-LTB<sub>4</sub>, lui même transformé en 20-COOH-LTB<sub>4</sub> (SOBERMAN R.J. et coll., 1988) ou en 20-OH-LTB<sub>4</sub> sous l'action d'une aldéhyde réductase (SUTYAK J. et coll., 1989). Cette

Métabolisme général

Métabolisme localisé

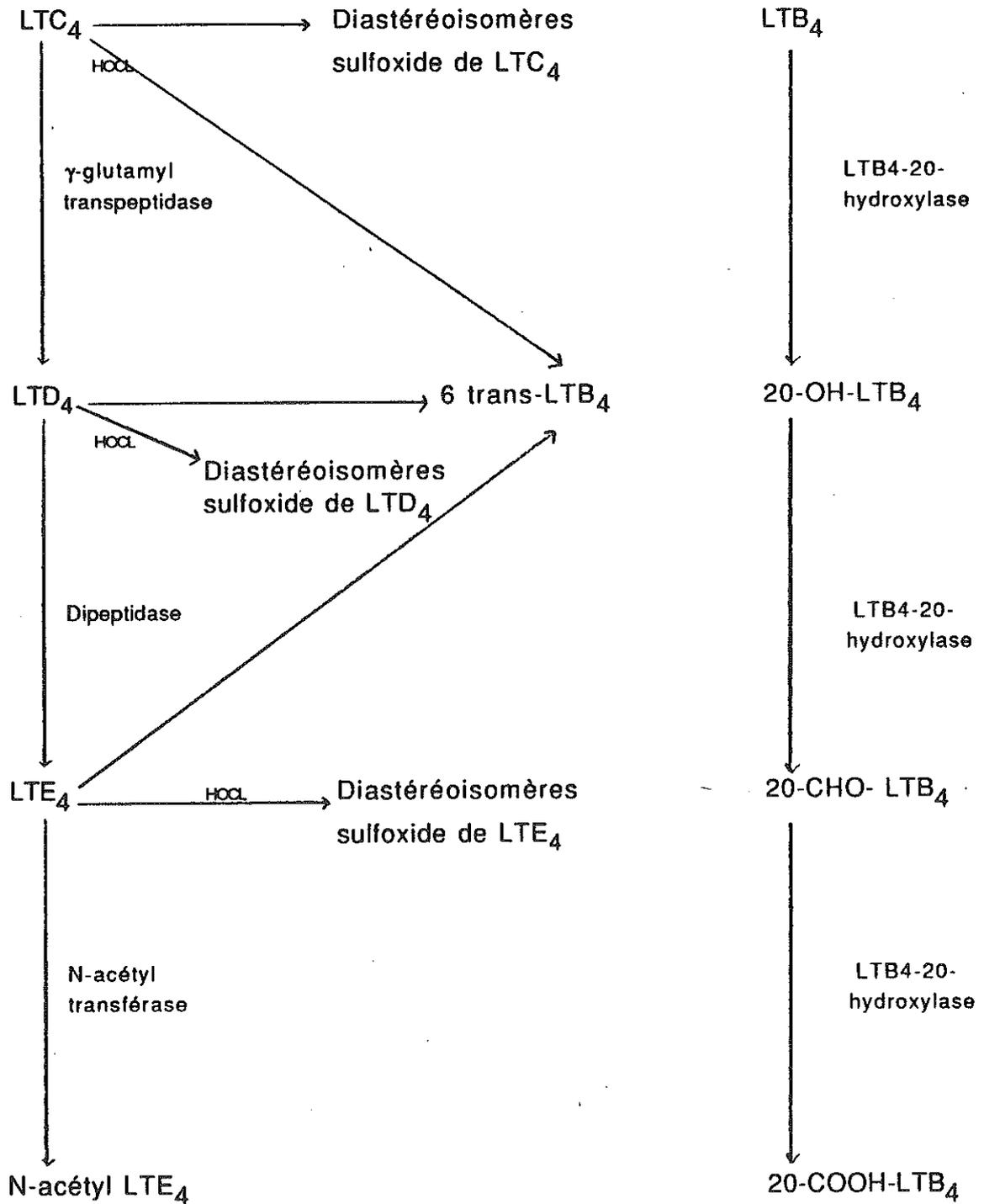


Figure 16 : Métabolisme des leucotriènes.  
(LEWIS R.A. et coll., 1990)

dernière voie métabolique doit être considérée comme une étape de régulation du métabolisme des LTB<sub>4</sub>. Δ6-trans-LTB<sub>4</sub>, Δ6-trans-12-épi-LTB<sub>4</sub> et 5, 12-diHETE peuvent aussi subir des ω-oxydations (POWELL W.S.,1984).

LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> sont métabolisés dans l'environnement extracellulaire des neutrophiles et des éosinophiles activés, en Δ6-trans-LTB<sub>4</sub> et Δ6-trans-12-épi-LTB<sub>4</sub> (LEE C.W. et coll., 1982) et en leurs dérivés sulfoxides respectifs (LEWIS R.A. et coll., 1984). Ce processus implique la production cellulaire de peroxyde d'hydrogène (LEWIS R.A. et coll., 1984). Enfin, LTE<sub>4</sub> est en grande partie excrété par les urines sous forme de N-acétyl-LTE<sub>4</sub> (ORNING L. et coll., 1985).

#### II.4- Autres voies lipoxygénasiques.

La formation longtemps hypothétique de 8 et 9 HPETEs a été identifiée dans les macrophages péronéaux de souris (RABINOVITCH-CHABLE H., 1981).

### C/ACTIVITE MONOOXYGENASIQUE

#### I- Le cytochrome P450.

Il est inclus dans un système multienzymatique qui lui permet d'exercer son action catalytique. Ce système comprend (BATT A.M. et coll., 1991) :

- 1) un donneur d'électron : NADPH/NADP<sup>+</sup> ou accessoirement NADH/NAD<sup>+</sup>.
- 2) une chaîne de transfert d'électrons qui se compose au moins :
  - d'une NADPH cytochrome P450 oxydoréductase; cette flavoprotéine est entourée de plusieurs cytochromes P450 qui reçoivent d'elle les électrons;
  - d'un cytochrome b5 ; il permet le transfert d'électrons à partir de NADPH ;
  - d'un cytochrome P450 oxydase terminale ; cette hémoprotéine est constituée d'une protoporphyrine IX et

d'apoprotéines de composition variable expliquant la diversité des systèmes à cytochrome P450.

Le système enzymatique est lié aux membranes microsomales. Il agit en rompant la double liaison d'une molécule d'oxygène et transfère l'un des oxygènes au substrat tandis que l'autre est éliminé à l'état d'eau (WHITE R.E. et coll., 1980). Le cytochrome P450 agit principalement sur toutes les substances lipophiles susceptibles d'être oxydées, incluant donc les acides gras polyinsaturés.

Toutefois, selon la nature de l'apoprotéine, chaque système enzymatique possède une affinité particulière pour un ou quelques substrats (LU A.Y.H. et coll., 1980) (LANIADO - SCHWARTZMAN M. et coll., 1988).

Le cycle enzymatique peut être décomposé en six étapes (Figure 17)

- 1- fixation du substrat sur la zone hydrophobe de l'apoprotéine ;
- 2- apport du premier électron réducteur transféré par la réductase ;
- 3 & 4 - arrivée d'oxygène moléculaire ; il se fixe sur le fer réduit ; les états d'oxydation du fer se trouvent en équilibre entre l'état ferreux et ferrique ;
- 5- apport du second électron obtenu par l'action conjointe de la réductase et du cytochrome b5 ; le complexe obtenu est dit oxénoïde ;
- 6- transfert d'un atome d'oxygène au substrat puis libération de ce dernier ; réaction du second atome d'oxygène avec un proton et libération de H<sub>2</sub>O.

## II- La voie des époxygénases.

Il s'agit du terme consacré pour définir l'ensemble des métabolites de l'acide arachidonique (CAPDEVILLA J. et coll., 1985) et des acides gras polyinsaturés apparentés (VAN ROLLINS M. et coll., 1984) obtenu par l'action catalytique de systèmes à cytochrome P450 (figure 18). L'oxydation de l'acide arachidonique suivant cette voie a été mise en évidence essentiellement dans le foie (CAPDEVILLA J. et coll., 1982), les reins (OLIW E. H. et coll., 1981) et les microsomes leucocytaires (BEDNAR M.M. et coll., 1984). Les métabolites sont en grande majorité des isomères d'acides époxyeicosatriénoïques

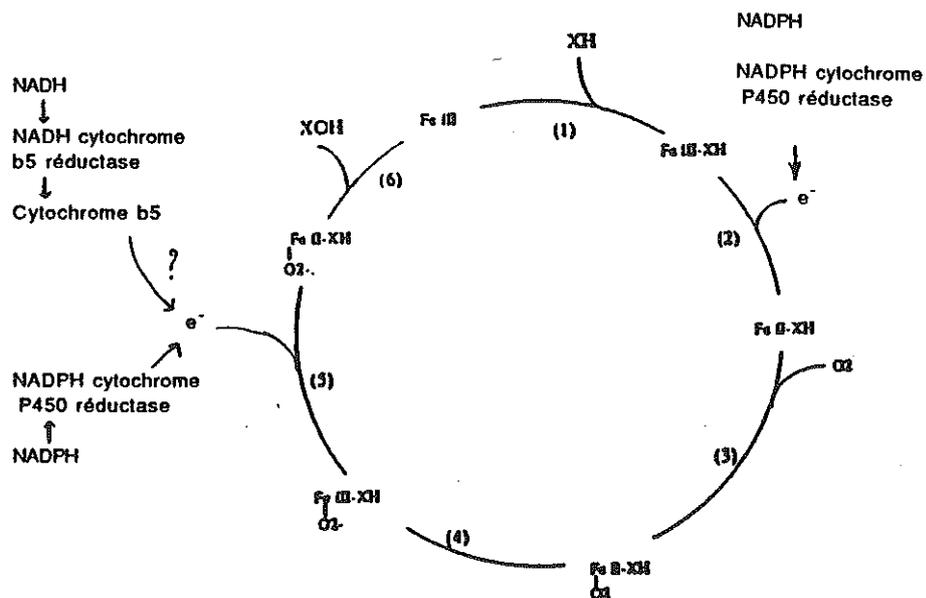


Figure 17 : Cycle catalytique du cytochrome P450.  
(BATT A.M. et coll., 1991)

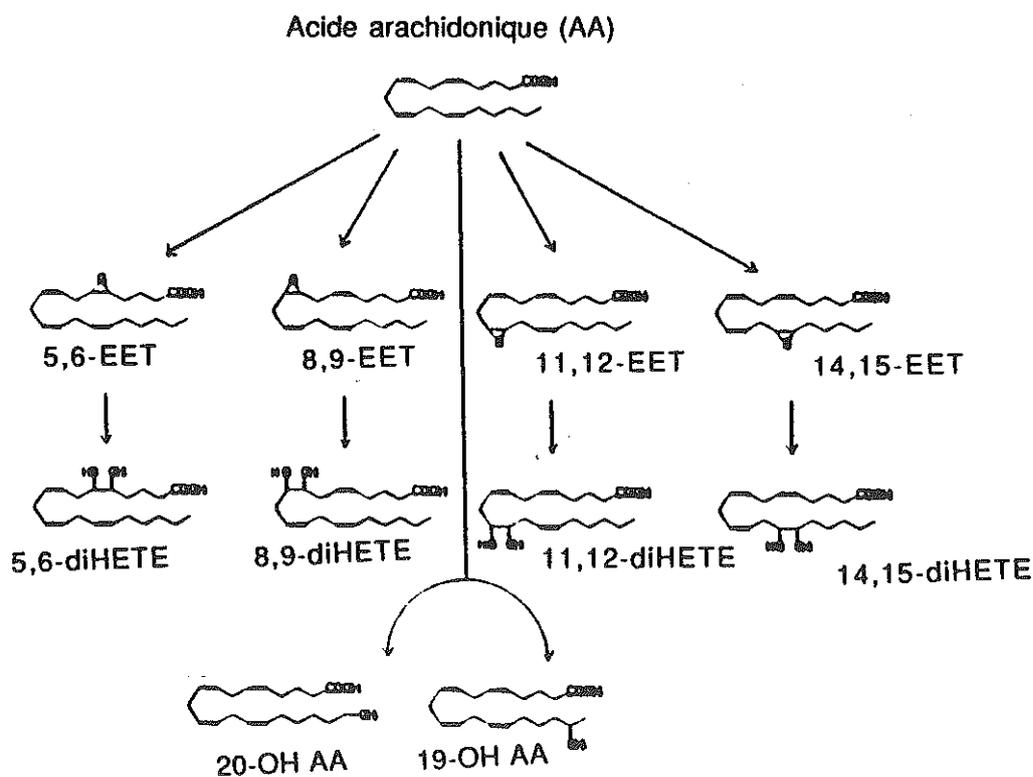


Figure 18 : Voie des époxygénases.  
(FITZPATRICK F.A. et coll., 1989)

(FITZPATRICK F.A. et coll., 1989): 5, 6-EET, 8, 9-EET, 11, 12-EET et 14, 15-EET. L'hydrolyse de ces composés par une époxyde hydrolase donne les diols correspondants (DHTs) (CHACOS N. et coll., 1983). Toutefois, 5, 6-cis-EET est un substrat de faible affinité des époxydes hydrolases microsomiales et cytosoliques. Il est généralement converti en 5-6-époxy-PGG<sub>1</sub> et 5-6-époxy-PGH<sub>1</sub> par la cyclooxygénase (OLIW E., 1984).

Certains HETEs peuvent aussi être métabolisés par cette voie enzymatique sans énantiosélectivité évidente à une exception près: l'acide hydroxy-12(R)-eicosatétraène-cis 5, 8, 14, trans 10-oïque (CAPDEVILLA J. et coll., 1986). De même des alcools  $\omega$  et  $\omega-1$  de l'acide arachidonique ont été mis en évidence (OLIW E.H. et coll., 1981).

Enfin, les monooxygénases modulent l'activité d'eicosanoïdes provenant de la voie des lipoxygénases et cyclooxygénases, par exemple :

- $\omega$ -hydroxylation de 15-HETE dans les microsomes pulmonaires de lapin gravide (OKITA R. et coll., 1988) ;
- $\omega$ -oxydation de 12(S)-HETE (MARCUS A. et coll., 1984) ;
- $\omega$ -oxydation de LTB<sub>4</sub> (SHAK S. et coll., 1984) ;
- $\omega$ -oxydation de leucotriènes sulfidopeptidiques (STENE D.O. et coll., 1988).

## D/ACTIVITE DES PHOSPHOLIPASES

### I- Généralités.

D'après SCHEWE T. et coll. (1986), il semblerait que les lipoxygénases peuvent agir directement sur les acides gras polyinsaturés possédant au moins un système cis 1, cis 4-pentadiène inséré dans les molécules de phospholipides, de diglycérides et de triglycérides. Cela a été démontré par KUHN H. et coll. (1990b) au sujet de la 15 arachidonate lipoxygénase qui peut oxyder directement les membranes lipidiques.

Mais il ressort de la majorité des travaux réalisés à ce sujet que la biosynthèse

d'eicosanoïdes, prostaglandines et leucotriènes incluant le thromboxane, la prostacycline, les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) et les lipoxines, synthétisés par la voie de la lipoxigénase ou de la cyclooxygénase, dépend de la biodisponibilité en acide arachidonique libre. Ce substrat peut provenir d'un apport extérieur à la cellule ou peut être libéré par la cellule elle-même par clivage hydrolytique de phospholipides membranaires.

L'étape de contrôle de la production d'acide arachidonique libre implique vraisemblablement l'intervention de récepteurs membranaires bien que cela n'est pas été clairement établi. Physiologiquement, il semblerait en effet que la déacylation soit la conséquence de la liaison initiale d'un agoniste à son récepteur membranaire. Parmi ces agonistes, certaines études retiennent, la bradykinine, la TSH (Thyroid Stimulating Hormone), la thrombine, le collagène, le facteur de croissance dérivé des plaquettes, l'angiotensine II, etc.(SAMUELSSON B., 1983). Plus récemment, certains travaux concernant la PLA<sub>2</sub>, suggèrent que cette dernière peut être activée par l'interaction de récepteur avec l'interféron  $\gamma$  (PONZONI M. et coll., 1992), des antigènes (ZOR U. et coll., 1991), des particules de zymosan opsonisées (SPORN P.H. et coll., 1990).

La liaison ligand-récepteur induirait alors l'activation de phospholipases, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un médiateur secondaire (DENNIS E.A., 1990).

## **II- Les phospholipases.**

Elles représentent une grande famille enzymatique et agissent directement sur ou dans les membranes cellulaires. Chaque phospholipase est définie par la position spécifique de l'activité catalytique qu'elle exerce sur les glycérophospholipides (DENNIS E.A., 1990) (Figure 19).

### **II.1- Les phospholipases A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) .**

Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison acyl-ester en position 1-acyl des glycérophospholipides membranaires. Cette réaction conduit à la formation d'un

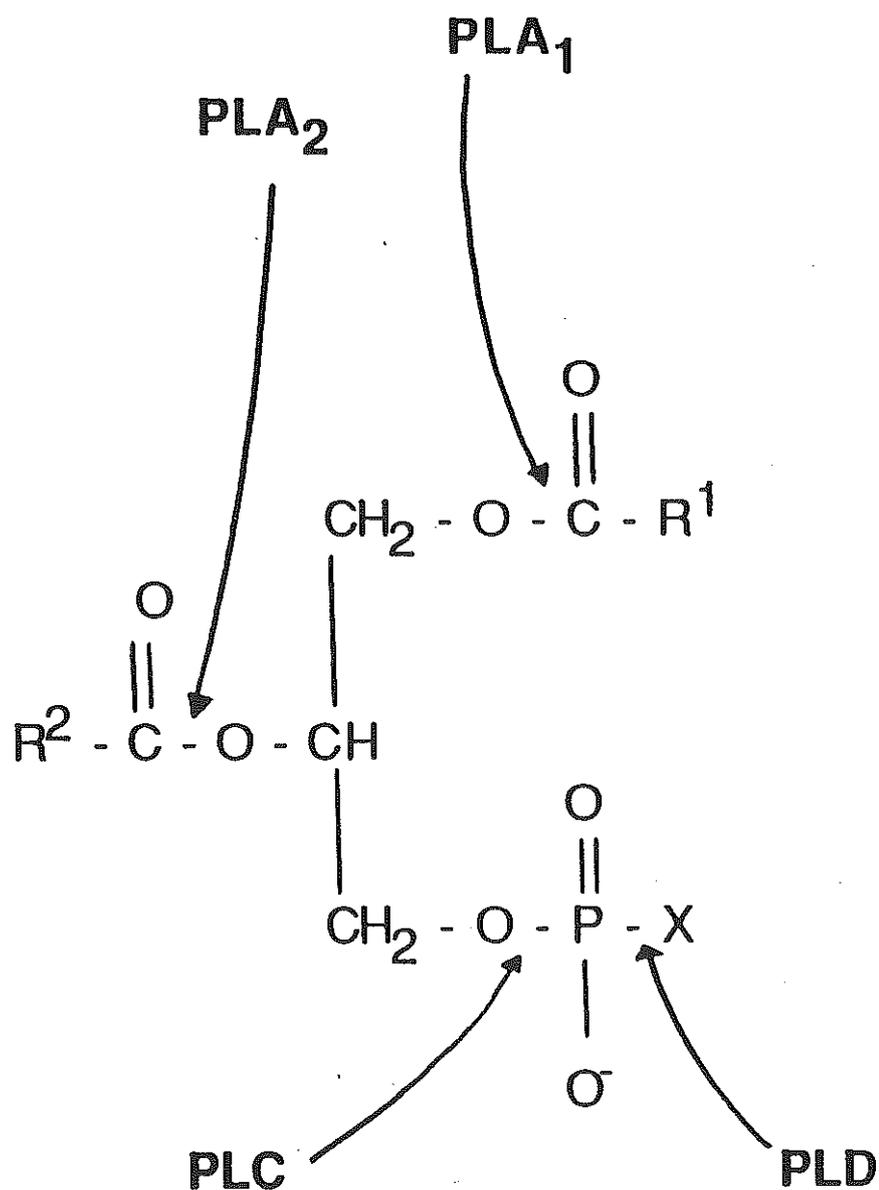


Figure 19 : Sites d'action des phospholipases sur les glycérophospholipides.  
(PERNAS P. et coll., 1991)

lysophospholipide soumis secondairement à l'action catalytique d'une lysophospholipase qui libère l'acide arachidonique en position 2-acyl du phospholipide (DENNIS E.A., 1990).

## II.2- Les phospholipases D (PLD).

Cette voie métabolique n'a été mise en évidence dans divers types cellulaires que récemment (KISS Z., 1991). La PLD catalyse l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester, libérant un acide phosphatidique sur lequel peut agir une PLA<sub>2</sub> et l'alcool terminal (choline, éthanolamine) (KISS Z., 1991).

## II.3- Les phospholipases C (PLC).

Elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester (DENNIS E.A., 1990) libérant un ester monophosphorique hydrosoluble et un diacylglycérol qui peut être substrat d'une kinase ou d'une lipase : la diglycérade lipase catalyse la libération d'acide gras polyinsaturé en position 2-acyl du diglycérade (BELL R.L. et coll., 1979), alors que la diglycérade kinase catalyse celle d'acide phosphatidique (BILLAH M.M. et coll., 1981) ; l'action d'une phospholipase A<sub>2</sub> sur ce dernier permet la libération d'acide gras polyinsaturé en position 2-acyl de l'acide phosphatidique (BILLAH M.M. et coll., 1981).

## II.4- Les phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison acyl-ester en position 2-acyl du glycérophospholipide membranaire libérant un acide gras le plus souvent polyinsaturé et un lysodérivé (DENNIS E.A., 1990)

### II.4.1- Distribution cellulaire et rôle des PLA<sub>2</sub>.

Les PLA<sub>2</sub> sont trouvées en quantité importante dans les sécrétions pancréatiques, le plasma, la lymphe et les sécrétions alvéolaires (VADAS P. et

coll., 1986). Au niveau intracellulaire, elles sont présentes dans tous les tissus et toutes les cellules (VAN DEN BOSCH H., 1980).

Divers types de PLA<sub>2</sub> ont été signalés dans les tissus de mammifères (VAN DEN BOSCH H., 1980) mais le nombre de formes cellulaires est encore inconnu. Leur rôle physiologique est très important, qu'elles restent à l'intérieur des cellules dans les lysosomes, le cytoplasme, les mitochondries, les granules de stockage, les membranes ou qu'elles soient sécrétées à l'extérieur de ces cellules. En effet, elles peuvent participer au remodelage des chaînes grasses des phospholipides dans le cycle déacylation-réacylation, à la destruction des membranes cellulaires altérées ou à celles des bactéries (WRIGHT G. et coll., 1990). Elles sont également impliquées dans la protection des membranes contre les peroxydations (VAN KRUIJF J.M.G. et coll., 1987), contrôlent l'étape initiale de la formation des eicosanoïdes et du PAF-acéther, ainsi que la fluidité membranaire et le flux calcique par modification de la composition de la bicouche lipidique (PERNAS P. et coll., 1991).

Deux PLA<sub>2</sub> cellulaires humaines ont été clonées. L'une de 14 KDa, identique à celle du placenta humain, est retrouvée dans les exsudats inflammatoires (SEILHAMER J.J. et coll., 1989). Sa structure spatiale possède une face de forte affinité pour les membranes phospholipidiques. L'autre, cytoplasmique de 85 KDa (KRAMER R.M. et coll., 1991) ne présente aucune homologie avec la PLA<sub>2</sub> précédente mais a par contre un domaine fortement homologue au domaine responsable de la liaison dépendante du calcium trouvé dans différentes protéines cytoplasmiques: protéine kinase C, PLC, etc.

La PLA<sub>2</sub> humaine de 14 KDa aurait essentiellement pour rôle la destruction des membranes des tissus altérés et des bactéries et serait donc libérée au sein des tissus et des cellules impliquées dans ce processus (PERNAS P. et coll., 1991). La phospholipase de haut poids moléculaire serait impliquée dans la production d'eicosanoïdes, d'acides gras libres et de PAF-acéther en réponse à la stimulation d'un récepteur de surface par un agoniste proinflammatoire: thrombine, ATP, Ca<sup>++</sup>, etc. (PERNAS P. et coll., 1991).

#### II.4.2- Mécanismes réactionnels des PLA<sub>2</sub>.

Ils ne sont pas clairement établis. Les phospholipases A<sub>2</sub> membranaires ont dans leur site actif des résidus :

- \* d'histidine (hydrolyse par attaque électrophile sur une molécule d'eau ou au voisinage de la liaison ester)
- \* d'aspartate (fixation du calcium)
- \* de tyrosine (phosphorylation) (BOREL J.P. et coll.,1987)

#### II.4.3- Régulation de l'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub>.

Vraisemblablement les phospholipases destinées à exercer leur activité microbicide ont une activité réprimée dans les granules de stockage et ne sont activées que dans le milieu extracellulaire après exocytose (KRAMER R.M. et coll., 1990). Les phospholipases agissant dans les cellules de l'organisme sont sous la dépendance de nombreux facteurs.

##### *a - les activateurs.*

L'implication de la PLC spécifique des phosphatidylinositols ne fait plus aucun doute; suite à une stimulation appropriée, faisant intervenir l'activation d'un récepteur lié vraisemblablement à une protéine G, cet enzyme exerce son activité catalytique sur du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) et libère du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (SCOTT T. et coll., 1988).

Les DAG membranaires peuvent activer une protéine kinase C phospholipido-dépendante calcium-dépendante, soit directement en présence de fortes concentrations calciques intracellulaires, soit en association avec des phosphatidylsérines membranaires en présence de faibles concentrations calciques. La kinase activée transfère le phosphate de l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) à des résidus sérines ou thréonines spécifiques situés sur des protéines cibles.

En même temps, le  $\text{Ca}^{++}$  peut : 1) entrer dans la cellule: l'acide phosphatidique, métabolite du DAG sous l'action catalytique d'une kinase (BILLAH M.M. et coll., 1981), et l'acide lysophosphatidique, métabolite de l'acide phosphatidique sous l'action catalytique de  $\text{PLA}_2$  (BILLAH M.M. et coll., 1981), se comportent comme des ionophores calciques;

2) être mobilisé à partir de granules de stockage :  $\text{IP}_3$ , molécule hydrosoluble, en se fixant sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique lisse, permet l'ouverture de canaux calciques des structures de réserve intracellulaire (BERRIDGE M.J., 1984).

A la concentration de  $1\mu\text{M}$ , le  $\text{Ca}^{++}$  peut activer, directement ou par l'intermédiaire de la calmoduline, certaines protéines (SCOTT T. et coll., 1988). La calmoduline en fixant le  $\text{Ca}^{++}$  subit un changement de conformation et découvre un site hydrophobe qui agit et active de nombreux systèmes enzymatiques calcium-dépendants, en particulier des protéines kinases C et la  $\text{PLA}_2$  (SCOTT T., 1988). La protéine kinase C peut être directement activée par de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  et cette activité persiste malgré la diminution de la concentration calcique intracellulaire au cours du temps (SCOTT T. et coll., 1988).

#### *b- les inhibiteurs.*

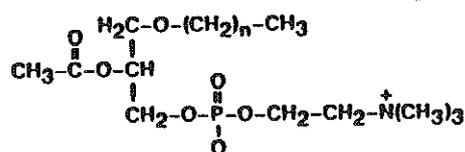
La lipomoduline forme un complexe inactif lipomoduline-calcium- $\text{PLA}_2$ . La synthèse de lipomoduline est fortement augmentée par l'administration de glucocorticoïdes (HIRATA F., 1985). Cette inhibition est levée par la phosphorylation de la lipomoduline, induite par les protéines kinases C phospholipido-dépendantes activées par la calmoduline (NISHIZUKA Y., 1988). La phosphorylation s'accompagne de la libération de  $\text{PLA}_2$  du complexe inactif permettant ainsi l'accès du calcium au site catalytique de la  $\text{PLA}_2$ , d'où l'activation de cet enzyme.

Certains acides gras polyinsaturés sont de puissants inhibiteurs de la  $\text{PLA}_2$ .

DENNIS E.A. (1990) a constaté que l'inhibition augmente avec le degré d'insaturation et que l'AA est un inhibiteur compétitif.

#### II.4.4- Voie de synthèse du PAF-acéther:

Le PAF est le seul phospholipide possédant de nombreuses propriétés biologiques. C'est un 1-0-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine.



(n prend généralement les valeurs 15 ou 17)

La PLA<sub>2</sub> peut catalyser la formation de lyso-PAF et la libération d'acide arachidonique par hydrolyse d'un 1-0-alkyl-2-acyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine. L'acétylation du lyso-PAF par une acétyl transférase aboutit à la formation de PAF-acéther (SNYDER F., 1985). SNYDER F. (1987) a découvert une autre voie de synthèse faisant intervenir les cholinephosphotransférases, utilisant le 1-alkyl-2-acétyl-sn-glycérol et le CDP-choline comme substrat.

### III- Substrats des lipoxgénases, des cyclooxygénases et des époxygénases.

#### III.1- Origine et synthèse des substrats.

Les cellules animales ne peuvent pas synthétiser directement l'acide linoléique, précurseur de l'acide dihomog-γ-linolénique et de l'acide arachidonique, ainsi que l'acide α-linolénique, précurseur de l'acide timnodonique. En effet, les animaux et les végétaux possèdent en commun une seule désaturase en Δ<sup>9</sup> permettant la

synthèse de l'acide oléique, acide octadécène-cis 9-oïque. Les végétaux possèdent des  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases permettant la synthèse de l'acide linoléique, C18:2 (n-6) ou acide octadécadiène-cis 9,12-oïque, et de l'acide  $\alpha$ -linoléique, C18:3(n-3) ou acide octadécatriène-cis 9,12,15-oïque.

Les mammifères, à l'opposé des végétaux, ne possèdent que des enzymes assurant des désaturations à partir du C9 en direction de la fonction carboxylique:  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  et  $\Delta 4$  désaturases.

Les cellules animales peuvent recevoir l'apport exogène d'acide arachidonique et des autres précurseurs directs des eicosanoïdes (d'origine animale) mais cela s'avère insuffisant. En effet, comme le prouvent de nombreuses études initialement menées par BURR G.O. et coll. (1930) l'incorporation dans l'alimentation de l'acide linoléique (d'origine végétale) et de l'acide  $\alpha$ -linoléique (d'origine animale marine) est une nécessité vitale. Aussi, ces deux acides sont qualifiés d'acides gras indispensable par les nutritionnistes (Figure 20).

Chez les mammifères soumis à un régime alimentaire équilibré, le substrat préférentiel des cyclooxygénases et lipoxygénases animales est l'acide arachidonique. Toutefois, les acides gras des familles n-6 et n-3 sont en compétition métabolique vis à vis des désaturases et des élongases mais aussi vis à vis des enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation des acides gras polyinsaturés en eicosanoïdes.

Parmi les étapes conduisant de l'acide linoléique à l'acide arachidonique dans les cellules de mammifères (BRENNER R.R., 1974), la désaturation de l'acide linoléique (18 : 2n-6) par la  $\Delta 6$  désaturase est une étape importante. L'acide  $\gamma$ -linoléique formé (18 : 3n-6) subit alors l'action catalytique d'une élongase. Cependant, l'étape terminale convertissant l'acide dihomo- $\gamma$ -linoléique (20 : 3n-6) en acide arachidonique (20 : 4n-6), catalysée par la  $\Delta 5$  désaturase est déterminante. En effet, elle contrôle directement la biosynthèse d'eicosanoïdes majeurs et règle en partie l'équilibre entre précurseurs des  $PGE_1$  et  $E_2$  (EL BOUSTANI S. et coll., 1986).

Toutes les cellules de l'organisme, ne peuvent synthétiser l'acide arachidonique selon cette voie métabolique. C'est le cas en particulier des plaquettes (SCHICK

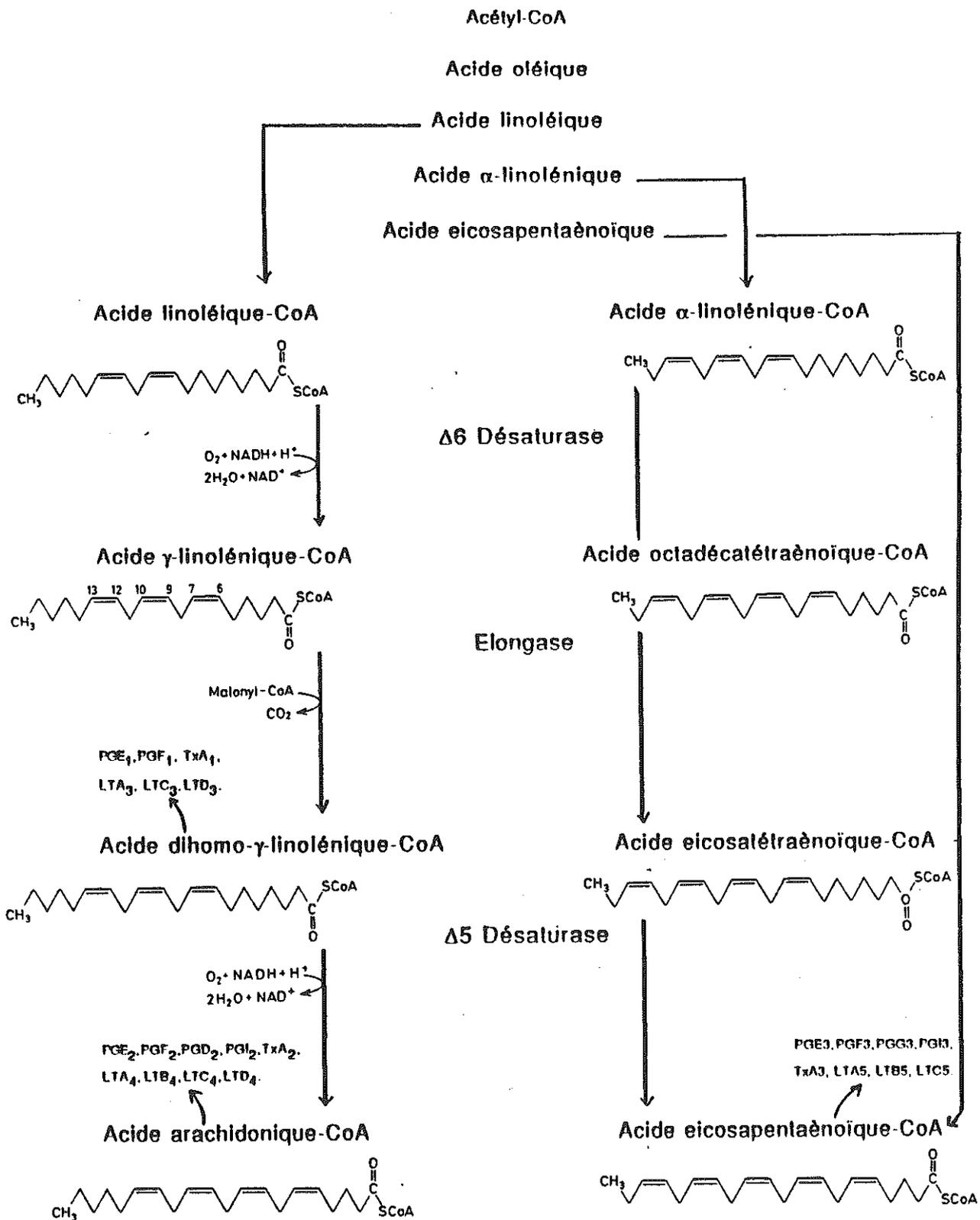


Figure 20 : Origine et métabolisme des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3.

P.K. et coll., 1984), des neutrophiles (CUNNANE S.C. et coll., 1984), des macrophages péritonéaux murins (CHAPKIN R.S. et coll., 1988). Ils constituent toutefois une source importante d'eicosanoïdes. CHAPKIN R.S. et coll. (1988) supposent que l'acide arachidonique synthétisé par d'autres cellules de l'organisme est transporté aux plaquettes, aux neutrophiles et aux macrophages puis esterifié dans les phospholipides membranaires de ces cellules.

### III.2- Stockage de l'acide arachidonique dans les cellules.

Il est couramment admis que l'acide arachidonique, substrat préférentiel des lipoxygénases et des cyclooxygénases, n'est présent qu'en faible quantité dans le cytoplasme et que dès qu'il est synthétisé in situ, ou apporté aux cellules, il se trouve stocké en quasi totalité esterifié dans les phospholipides membranaires, essentiellement sous forme de glycérophospholipides en position  $\beta$  ou 2-acyl glycérol. Mais une autre voie de stockage semble envisageable d'après les études de DVORAK A.M. et coll. (1983).

#### III.2.1- les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques.

Dans les adipocytes, ces corps lipidiques constituent une source énergétique de stockage sous forme de triglycérides. GALLI S.J. et coll (1985) proposent une liste non exhaustive de cellules pouvant contenir des gouttelettes lipidiques. Leur rôle précis dans le métabolisme cellulaire et leur contenu biochimique restent à définir.

Toutefois, DVORAK A.M. et coll. (1983) ont constaté la présence fréquente de ces corps dans les leucocytes et les mastocytes participant in vivo à des processus inflammatoires, immunologiques ou pathologiques. Certaines cellules comme les mastocytes semblent incorporer l'acide arachidonique uniquement dans ces corps lipidiques alors que d'autres cellules tel que les macrophages semblent l'incorporer aussi bien dans les gouttellettes que dans les membranes cytoplasmiques (GALLI S.J. et coll., 1985).

### III.2.2- les phospholipides membranaires.

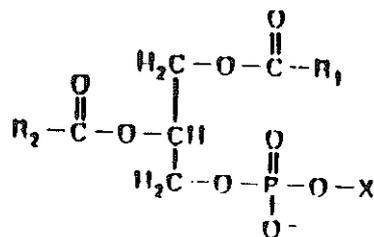
Les membranes cellulaires renferment divers lipides : triglycérides, diglycérides, glycolipides, cholestérol libre, mais surtout phospholipides. Ces derniers présentent aussi une grande diversité de composés : sphingolipides (10 à 20%) et glycérophospholipides (80 à 90%). La grande variété de glycérophospholipides est d'abord assurée par la nature de la tête polaire mais aussi par celle des chaînes situées en position 1 et 2. Généralement, plus de 80% des acides gras insaturés possédant une ou plusieurs double liaisons en cis forment une liaison ester avec l'hydroxyle du glycérol en position 2, alors que l'acide gras estérifié en position 1 est généralement saturé. Les principales classes de glycérophospholipides sources principales d'eicosanoïdes sont représentées par les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylinositols (PI). Figurent aussi deux classes mineures au métabolisme très actif : phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP) et phosphatidylinositol-4,5-diphosphates (PIP<sub>2</sub>) (Figure 21).

L'intégration de l'acide arachidonique dans les glycérophospholipides ne se fait pas lors de la synthèse de-novo de l'acide gras mais par acétylation ultérieure d'un glycérophosphate ou d'un glycérolysophospholipide. L'acide gras est initialement transformé en acyl-CoA sous l'action d'une acyl-CoA-synthétase, en présence d'ATP et de coenzyme A. Si, sous l'action d'une acyl-transférase, l'acyl-CoA est transféré sur un glycérol-3-phosphate, un acide phosphatidique est formé; c'est un composé suffisamment insoluble dans l'eau pour demeurer dans la double couche lipidique. L'action catalytique d'une phosphatase libère alors un phosphate et du 1,2-diacylglycérol (SCOTT T. et coll., 1988).

Le 1,2-diacylglycérol peut réagir avec un cytidine diphosphoéthanolamine (CDP-éthanolamine) en présence d'une éthanolamine phosphotransférase pour donner un phosphatidyléthanolamine et du cytidine monophosphate (CMP).

Chez les mammifères, les phosphatidylsérines sont formées à partir de phosphatidyléthanolamine en présence de calcium et de L-sérine.

Les phosphatidylinositides sont formées par réaction entre du CDP-diacylglycérol et du myo-inositol; la formation de di- et tri-phosphoinositides est



$x = -\text{H}$

Acide phosphatidique

$= -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

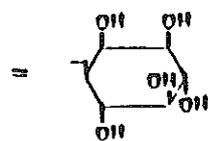
Phosphatidylcholine ou lecthine

$= -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$

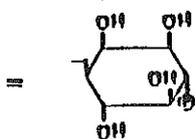
Phosphatidyléthanolamine

$= -\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{NH}_3^+}{|}}{\text{CH}}-\text{CO}_2\text{H}$

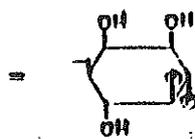
Phosphatidylsérine



Phosphatidyl(myo)inositol ou  
monophosphoinositide



Phosphatidyl(myo)inositol-4-  
phosphate ou diphosphoinositide



Phosphatidyl(myo)inositol-4,5-  
diphosphate ou  
triphosphoinositide

Figure 21: Structure de glycérophospholipides naturels.  
(SCOTT T. et coll., 1988)

l'aboutissement de phosphorylations successives du monoinositide en 4 puis 5 par deux kinases, en présence d'ATP.

Les phosphatidylcholines peuvent être formées selon le même schéma que PE (Figure 22) ou à partir de PE sous l'action catalytique d'une phospholipide méthyltransférase qui assure le transfert de trois méthyles sur le PE.

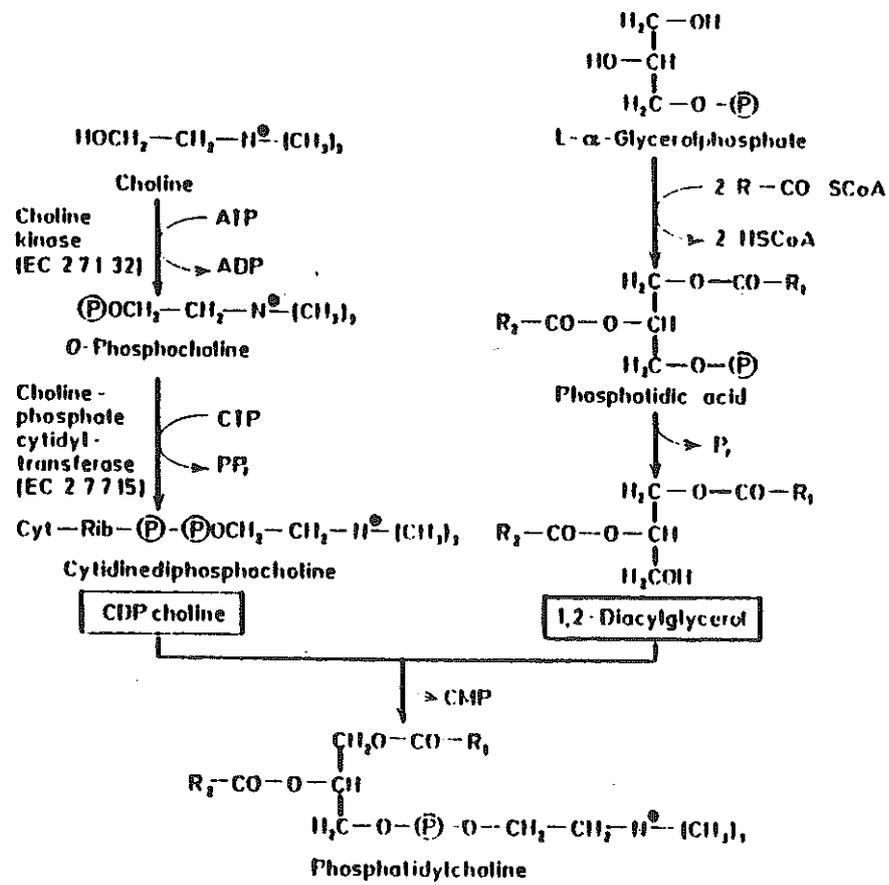


Figure 22 : Biosynthèse des phosphatidylcholines.

(cyt: cytosine; rib: ribose)

(SCOTT T. et coll., 1988)

## EICOSANOÏDES ET CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEÉES

Les cellules phagocytaires mononucléées sont intimement impliquées dans les processus immunologiques et inflammatoires, ainsi que dans la réparation des tissus lésés. Elles interviennent donc au cours d'infection, de réaction d'hypersensibilité, de prolifération tumorale et, dans certains cas de maladies autoimmunes. La synthèse et la libération d'eicosanoïdes par ces cellules régulent en grande partie ces phénomènes. Les métabolites agissent aussi bien sur les phagocytes mononucléés eux-mêmes que sur les autres cellules impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'immunité.

L'activité immunomodulatrice des monocytes circulants et des macrophages résidents ou activés, induite par la production d'eicosanoïdes, est contrôlée ou influencée par de nombreux facteurs présents dans les tissus environnants. L'activité cyclooxygénasique des phagocytes mononucléés est clairement établie. A l'opposé, les études menées sur l'activité lipoxygénasique de ces mêmes cellules donnent des résultats plus ou moins contradictoires.

### A/ CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEÉES: MONOCYTE-MACROPHAGE.

Ces cellules constituent une population cellulaire hétérogène. Selon leur état fonctionnel, elles peuvent être divisées en deux grands groupes à l'intérieur desquels d'autres subdivisions peuvent être faites :

- 1) les phagocytes mononucléés circulants : le monocyte sanguin ;
- 2) les macrophages tissulaires.

#### I- Origine et devenir des monocytes.

Comme toutes les cellules sanguines, les monocytes sont formés dans la moëlle osseuse. Celle-ci contient divers types de phagocytes mononucléés : monoblastes,

promonocytes et monocytes, ainsi que des macrophages résidents.

### I.1- La monocytopoïèse.

Le monocyte est une cellule fille issue de la différenciation d'une cellule souche multipotente de la moëlle osseuse qui est capable de donner naissance à n'importe quelle lignée cellulaire sanguine. L'induction spécifique d'une lignée sanguine est assurée par l'action de facteurs stimulants les colonies, CSF, sur la cellule multipotente et ses cellules filles pré-différenciées (CFU ou unité de formation des colonies). Les CSF sont produits par de nombreux types cellulaires, dont les macrophages et sont largement distribués dans l'organisme (HEYWORTH C.M. et coll., 1990).

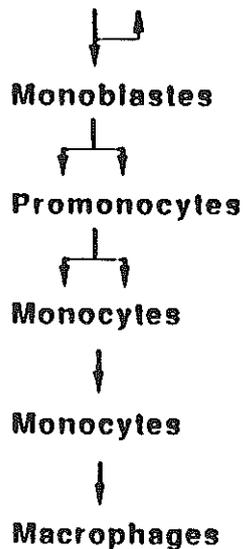
Les monocytes ont une origine commune avec la lignée granulocytaire par le biais de la CFU-GM (unité de formation des granulocytes et macrophages). Les cellules souches de la lignée monocyte-macrophage sont différenciées grâce à l'action principale de IL-1 (interleukine 1), IL-6, IL-3 et CSF (stem cell factor) sur la cellule mère multipotente (METCALF D., 1991). GM-CSF, G-CSF, M-CSF et IL-3 interviennent de façon prépondérante dans le contrôle de la production de la maturation et de l'activité fonctionnelle des monocytes-macrophages et des granulocytes ; G-CSF sélectionne la formation de granulocytes, M-CSF celle de monocytes et les deux autres glycoprotéines interviennent dans les deux voies de maturation (METCALF D., 1991).

La première cellule engagée dans la voie des monocytes est le monoblaste qui se différencie dans la moëlle osseuse en promonocyte puis en monocyte. Ce dernier est alors rapidement libéré dans le flux sanguin (Schéma 6).

Malgré la fréquence apparemment faible des évènements d'initiation de la cellule souche, les cellules sanguines différenciées sont produites à des taux constants et réguliers. Ceci est le reflet d'étapes de contrôle: par exemple, les macrophages, stimulés par l'IL-3 et M-CSF, produisent du G-CSF (METCALF D., 1991) et ceux, stimulés par GM-CSF, produisent M-CSF (HORIGUCHI J. et coll., 1987).

Au cours d'une inflammation, la production médullaire de monocytes est

**Cellules multipotentes**



Moelle osseuse

74

Sang périphérique

Tissus

Tissu conjonctif (histiocytes)  
Peau (histiocytes)  
Foie (cellules de Kupffer)  
Rate (macrophage)  
Thymus  
Moelle osseuse (macrophages résidents)  
Poumon (macrophages alvéolaires et tissulaires)  
Tractus gastro intestinal  
Tractus génital-urinaire  
Organes endocriniens  
Système nerveux central

Cavités

Macrophages pleuraux  
Macrophages péritonéaux

Inflammation

Cellules épithélioïdes  
Cellules multinucléées géantes

Schéma 6 : Système des phagocytes mononucléés.

augmentée. Elle s'accompagne donc, d'une augmentation du nombre de monocytes circulants qui compense la perte cellulaire causée par l'attraction de ces monocytes aux sites inflammatoires. Ce phénomène est induit par un facteur humoral entre autre responsable de la réduction de temps du cycle cellulaire des promonocytes (SLUITER W. et coll., 1987). Apparemment, ce facteur augmentant la monocytopoïèse est sécrété par les macrophages au cours de la phagocytose (SLUITER W. et coll., 1987).

## I.2- Les monocytes circulants.

De la moëlle osseuse, le monocyte gagne dans les 24 heures la circulation sanguine. En moyenne, les monocytes humains séjournent 3 jours dans le flux sanguin. Ces cellules représentent 3 à 7% des leucocytes circulants chez l'adulte, soit 300 à 400/mm<sup>3</sup> de sang. Il existe cependant des variations individuelles et la limite supérieure est de 800 à 1000/mm<sup>3</sup>. Les monocytes dénombrés sur les numérations sanguines ne représentent d'ailleurs qu'une partie des monocytes du sang puisqu'un pool 3 à 4 fois supérieur, de ces cellules, est marginé le long des vaisseaux (VAN FURTH R. et coll., 1986).

Les monocytes sanguins constituent une population cellulaire très hétérogène. Par exemple, NORRIS D.A. et coll. (1979) ont identifié deux populations distinctes de monocytes sanguins en se basant sur la taille et certaines caractéristiques fonctionnelles : les petits monocytes ont un volume compris entre 400 et 440  $\mu\text{m}^3$  et les grands 440 et 520  $\mu\text{m}^3$ . Tous adhèrent au verre, sont doués de propriété phagocytaire et se colorent à l'estérase non spécifique. Les grands monocytes sont Fc positifs et actifs par ADCC (cytotoxicité dépendante d'anticorps), alors que les petits ne le sont pas.

Cependant, aucune étude n'a pu établir, en l'absence de pathologie, que les monocytes sont destinés à un tissu en particulier quand ils quittent la moëlle osseuse (JOHNSTON R.B., 1988). Vraisemblablement, certains monocytes vieillissent et meurent dans la circulation sanguine. Les autres quittent le sang par diapédèse et migrent dans les tissus.

### I.3- Les macrophages.

L'hétérogénéité de lignée macrophagique est liée, plus au stade de développement, qu'à la voie de différenciation. En absence de pathologie, la migration des monocytes dans les tissus se fait au hasard et non par vieillissement en réponse à des signaux bien définis (JOHNSTON R.B., 1988) et la transformation en macrophage est très rapide (2 à 3 heures). Elle aboutit à la formation de macrophages résidents : les cellules de Kupffer du foie, les macrophages alvéolaire, les histiocytes du tissu conjonctif, les cellules microgliales du tissu nerveux, les macrophages pleuraux et péritonéaux, les ostéoclastes des os (GORDON S. et coll. 1988) (Schéma 6).

Dans les tissus sains, la maturation se fait vraisemblablement en réponse à des stimuli spécifiques du tissu. Elle débute par l'interaction monocyte-cellule endothéliale vasculaire. En raison de la richesse en substances environnant ces cellules, il apparait difficile d'affirmer l'implication réelle de facteurs spécifiques, et surtout, le stade cellulaire sur lequel ils agissent.

MUSSON R.A. (1983) montre que le sérum retrouvé au sein de nombreux tissus agrésés (de composition différente du plasma qui constitue l'environnement des monocytes) induit la maturation in vitro de monocytes sanguins en macrophages. Pour recréer une activité similaire à celle induite par le sérum, KREUTZ M. et coll. (1992) proposent de mettre en présence des monocytes, des immunoglobulines (Igs) ou du M-CSF, ou de faire adhérer les cellules au plastique en présence de 1,25-dihydroxycholécalférol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) et d'albumine.

L'IL-3, le GM-CSF et le M-CSF (BECKER S. et coll., 1987) ainsi que l'IL-4 (TE VELDE A.A. et coll., 1988) semblent eux aussi impliqués dans la maturation, voire l'activation, des macrophages.

### I.4- L'activation des macrophages.

L'étape finale de la maturation des macrophages est la conversion de

macrophages immatures ou résidents en macrophages activés. Les macrophages immatures sont sensibles aux stimuli chimiotactiques et répondent mieux aux médiateurs de l'inflammation libérés au cours d'infection, de prolifération tumorale, d'hypersensibilité que les macrophages résidents. Toutefois, ces derniers peuvent aussi répondre à de tels stimuli. Ces macrophages immatures au foyer inflammatoire, se différencient en macrophages de l'inflammation. Les lymphocytes T, sensibilisés par un antigène spécifique du microorganisme, libèrent des lymphokines capables d'activer le macrophage, et donc, d'augmenter l'activité cytotoxique ou cytostatique des phagocytes sur le microorganisme, mais également, sur d'autres éléments étrangers à l'organisme. Ainsi, l'activation requiert une stimulation spécifique d'antigène et, l'activité antimicrobienne développée est non spécifique d'antigène (JOHNSTON R.B., 1988). Interféron  $\gamma$ , GM-CSF sont les deux principales lymphokines impliquées. L'exposition des macrophages à des endotoxines, entraîne la libération de facteur de nécrose des tumeurs (TNF- $\alpha$ ) qui peut lui-même activer le macrophage (STUEHR D.J. et coll., 1987).

### I.5- Physiopathologie de l'inflammation.

La cellule cible responsable de la réaction inflammatoire et la séquence des évènements initiaux varient suivant l'étiologie pathogénique. Le stimulus initial a lieu soit directement au niveau de l'endothélium et des cellules circulantes sanguines, soit au niveau de cellules immunes normalement présentes dans des organes spécifiques (GUALDE N., 1986).

#### I.5.1- La phase vasculaire.

La réaction inflammatoire débute par une phase vasculaire quasi immédiate, constituée d'une cascade d'évènements s'imbriquant dans les autres phases de l'inflammation (MALE D. et coll., 1987) (GUALDE N., 1986). Cette phase vasculaire fait intervenir des molécules diverses, libérées par les cellules sanguines circulantes et les cellules endothéliales endommagées.

Elle débute par une vasoconstriction réflexe limitée aux artérioles relevant de l'intervention des nerfs des vaisseaux, eux mêmes sous la dépendance d'adrénaline, de sérotonine et d'amines vasoactives libérées par les plaquettes. Suit une vasodilatation importante et durable, biphasique, touchant artérioles et artères de petit calibre, résultante de l'action d'histamine, de kinines mais aussi de prostaglandines et d'anaphylatoxines sécrétées essentiellement par les basophiles, les mastocytes, les thrombocytes et les cellules endothéliales.

La libération de ces facteurs de l'inflammation nécessite l'activation des cellules impliquées:

- Les basophiles situés à proximité des vaisseaux sanguins sont stimulés : 1) par des réactions immunitaires, soit directement par sensibilisation au contact d'immunoglobulines E, soit indirectement par l'intermédiaire d'anaphylatoxines : C<sub>3a</sub> et C<sub>5a</sub>;

2) par des lésions tissulaires.

La stimulation de ces cellules déclenche un afflux de Ca<sup>++</sup> suivi d'une augmentation d'AMPc intracellulaire qui induisent la libération de granules de stockage par exocytose et l'activation de phospholipases

- Les plaquettes circulantes n'adhèrent pas entre elles ou à l'endothélium normal mais, en cas de rupture de la tunique endothéliale ou de la présence des complexes immuns, elles se fixent au collagène sous endothélial. Cette étape nécessite la participation du facteur de Willebrand, protéine fabriquée par les cellules endothéliales et retrouvée à la fois dans la paroi vasculaire et le plasma. Ce facteur se fixe sur une glycoprotéine I<sub>b</sub> (GPI<sub>b</sub>) de la membrane plaquettaire (adhésion plaquettaire).

### I.5.2- La phase plasmatique.

L'activation de facteurs de la coagulation est responsable d'un ralentissement de la microcirculation locale favorisant la formation de fibrine qui à son tour favorise l'adhésion des thrombocytes et, à un moindre degré, des leucocytes aux cellules endothéliales du foyer inflammatoire. Cette phase est activée par de nombreux composés. L'adrénaline, le collagène, les premières traces de

thrombine formée au niveau de la lésion favorisent la liaison des cellules circulantes à l'endothélium vasculaire. En particulier, l'adhésivité des plaquettes par l'intermédiaire du GPIb et les divers stimuli environnant activent la PLC plaquettaire et endothéliale. La PGI<sub>2</sub> sécrétée principalement par les cellules endothéliales, ainsi que les PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> à forte concentration et AMPc ont un pouvoir antiagrégant qui permet d'éviter l'extention du thrombus. Inversement, TxA<sub>2</sub> libéré par les plaquettes, ainsi que le collagène, la thrombine, ADP, l'acide arachidonique, PGE<sub>2</sub> à faible concentration, GMPc et PAF ont un pouvoir agrégant, responsable de la stase sanguine locale (PELTIER A.P., 1987). A la surface des plaquettes, GPIIb et GPIIIa s'accolent formant un complexe récepteur qui fixe le fibrinogène, protéine adhésive permettant l'agrégation plaquettaire. L'action du fibrinogène est renforcée par la thrombospondine d'origine intraplaquettaire.

Cette stase locale a deux conséquences principales (GUALDE N., 1986):

1) les médiateurs de l'inflammation essentiellement libérés au cours de la phase dite vasculaire permettent une augmentation de la perméabilité vasculaire responsable de la diffusion dans l'espace périvasculaire d'un exsudat d'origine plasmatique constitué de plasma, de molécules plasmatiques : immunoglobulines, kinines, facteurs de la coagulation (Schéma 8), facteurs du complément (Schéma 7), interleukines, etc. Cet exsudat communément appelé oedème est responsable des manifestations de la réaction inflammatoire : douleur par compression des fibres sensibles locales, rougeur et hyperthermie locale ;

2) la margination suivie de la diapédèse des leucocytes initie la phase cellulaire de l'inflammation.

### I.5.3- La phase cellulaire.

Cette phase se caractérise par un afflux au foyer inflammatoire de leucocytes, en deux phases successives, sous la dépendance de facteurs chimiotactiques. Elle conduit à la formation de granulomes inflammatoires dont l'aspect et l'importance sont fonction de la nature de la réaction inflammatoire et des cellules

qui le composent.

La première vague cellulaire est constituée essentiellement de polynucléaires neutrophiles dont la principale activité est la phagocytose. Ces polynucléaires sont eux-mêmes accompagnés par les basophiles et les éosinophiles.

La seconde vague est plus tardive. Elle se compose de macrophages et de lymphocytes. L'activité principale du macrophage au cours de la réaction inflammatoire est la phagocytose, mais il intervient aussi dans la réaction immunitaire spécifique en présentant l'antigène aux cellules T ou B.

Parmi les types cellulaires les plus fréquemment retrouvés au foyer inflammatoire, les granulomes à polynucléaires neutrophiles composent les foyers inflammatoires aigus et à immuns complexes types Arthus (DAYRENS P. et coll., 1980); les granulomes à polynucléaires éosinophiles se rencontrent au cours d'infections parasitaires (DAYRENS P. et coll., 1980). Les granulomes à lymphocytes sont rarement purs et apparaissent lors de réaction immunitaire avec une forte augmentation du taux d'anticorps (DAYRENS P. et coll., 1980). Dans d'autres cas, comme la réaction d'hypersensibilité retardée de Jones Mote, une accumulation de basophiles est constatée (MALE D. et coll., 1987). Enfin sont décrits :

- des granulomes à cellules épithéliales géantes provenant de monocytes sanguins. Ce type apparaît surtout lors des réactions d'hypersensibilité retardée (DAYRENS P. et coll., 1980) ;

- des granulomes à histiomonocytes caractérisés par une vitesse de renouvellement plus ou moins élevée et accompagnés d'érythrophagocytose. Ce type de granulome apparaît surtout lors d'inflammation chronique (VANE J. R. et coll., 1978) ;

- des granulomes nécrotiques constitués de macrophages, de cellules épithéliales et de lymphocytes. Les plaques nécrotiques sont le résultat de dépôts de fibrine, d'immunoglobuline et de facteur C<sub>3</sub> (DAYRENS P. et coll., 1980) ;

- des granulomes à évolution rapide induits par des agents microbiens sont formés de macrophages (RYAN G. B. et coll., 1970) ;

- des granulomes à évolution lente induits par des agents non

dégradables se composent également de macrophages (VANE J. R. et coll., 1978).

#### I.5.4- Evolution des réactions inflammatoires.

Quelque soit le type de réaction inflammatoire envisagé, les acteurs moléculaires et cellulaires sont identiques, mais différent dans leur importance et leur séquence d'intervention. Le mot "inflammation" implique le développement d'une réponse immunologique ou non immunologique tendant à neutraliser la source même de l'agression. La réaction inflammatoire peut se manifester sous la forme aiguë ou chronique (SPECTOR W. G. et coll., 1968)(MALE D. et coll., 1987).

##### *a- L'inflammation aiguë.*

Elle est assurée par une cascade de réactions et de régulations positives sur un fond d'activités inhibitrices. Mais au premier plan de tous les facteurs influençant l'évolution se situe le devenir de l'agent déclenchant. Une fois éliminé, les macrophages nettoient le site. Le résultat final dépend du degré des lésions affectant les tissus et de la possibilité qu'ont les cellules de ces tissus à se régénérer. Si la régénération ne peut être complète, un tissu cicatriciel de collagène remplacera le tissu initial.

##### *b- L'inflammation chronique .*

Elle est due à la persistance du stimulus. Elle se traduit in situ par l'augmentation de la phase cellulaire du granulome, une destruction accrue des tissus sains et l'apparition fréquente de réactions immunitaires. La complexité des inflammations chroniques est liée à la grande diversité des infiltrations cellulaires. L'inflammation chronique non immune met surtout en jeu monocytes et macrophages. Le maintien de la chronicité est assuré par un afflux constant de monocytes sanguins au sein du site enflammé évoluant en cellules épithéloïdes ou cellules géantes.

Par contre, la mise en jeu de processus immunologiques est responsable de lésions au moins aussi importantes que celles provoquées par le stimulus initial. Le granulome tuberculeux en est un exemple. En règle générale, dans les inflammations chroniques immunes, soit l'antigène échappe à la reconnaissance immunitaire, soit il résiste aux effecteurs de la réponse immunitaire. Par exemple, les trypanosomes modifient en permanence leur antigène de surface ; pour cette raison les réactions chroniques ressemblent davantage à la répétition de réactions aiguës primaires. A l'opposé, *Mycobacterium leprae* résiste aux mécanismes cytotoxiques du macrophage en proliférant à l'intérieur des cellules. L'inflammation chronique immune s'accompagne très fréquemment de réactions d'hypersensibilités.

#### I.5.5- Les médiateurs de l'inflammation.

Les médiateurs primaires de l'inflammation peuvent être libérés par les cellules sanguines circulantes et les cellules endothéliales. Parmi ces composés biologiques, il faut distinguer ceux qui sont préformés et stockés dans des vésicules comme l'histamine, la sérotonine, l'adénosine, etc. et ceux qui sont néoformés au cours de la réaction inflammatoire comme les dérivés de l'acide arachidonique, les radicaux libres oxygénés, etc. Les médiateurs primaires peuvent aussi se trouver activés dans le milieu extracellulaire comme tous les facteurs appartenant au système du complément, au système de la coagulation et de fibrinolyse, les dérivés du groupe des kinines et l'ensemble des complexes immuns (GUALDE N., 1986).

Les cellules effectrices secondaires (leucocytes et plaquettes) qui amplifient le processus inflammatoire, génèrent et libèrent leurs propres médiateurs souvent de même nature que ceux qui gouvernent les étapes inflammatoires initiales. Toutefois, certains ne joueront un rôle authentique que durant cette phase secondaire : sérotonine,  $TxA_2$ , interleukine, etc. (GUALDE N., 1986).

### *a- Les médiateurs cellulaires .*

L'acétylcholine, l'adrénaline participent à la vasoconstriction réflexe initiale. L'histamine et la sérotonine, libérées par les basophiles, les mastocytes et les plaquettes, augmentent le débit sanguin local par dilatation artériolaire ainsi que la perméabilité vasculaire. De plus, elles jouent un rôle important au cours de la bronchoconstriction.

Les eicosanoïdes, les cytokines, et plus spécifiquement les interleukines 1 et 4, jouent un rôle non négligeable et très complexe qui sera développé ultérieurement.

Les radicaux oxygénés libérés dans le milieu extracellulaire par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles sont responsables de dégradations cellulaires entretenant la réaction inflammatoire.

Enfin, le PAF, libéré par ces mêmes cellules exerce une activité importante sur les plaquettes (libération de constituants plaquettaires et agrégation), les neutrophiles (chimiotactisme, agrégation, libération de radicaux libres), les vaisseaux (vasodilatation), les terminaisons des nerfs sensitifs (diminution du seuil de perception de la douleur).

### *b- Les médiateurs vasculaires .*

L'activation du système du complément, composé de vingt et une protéines plasmatiques est un mécanisme puissant d'initiation et d'amplification de l'inflammation. Deux voies d'activation sont distinguées : la voie classique et la voie alterne (Schéma 7) (GUALDE N., 1986). Elles assurent toutes deux la formation d'anaphylatoxines (C<sub>3a</sub> et C<sub>5a</sub>) qui sont les principales protéines impliquées dans le chimiotactisme, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses, la dégranulation des mastocytes et des basophiles.

Ce système est soumis à des mécanismes de régulation ; C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub> convertases sont des enzymes naturellement labiles. La vitesse de dégradation de la C<sub>3</sub> convertase de la voie alterne est contrôlée par la properdine. Une boucle de

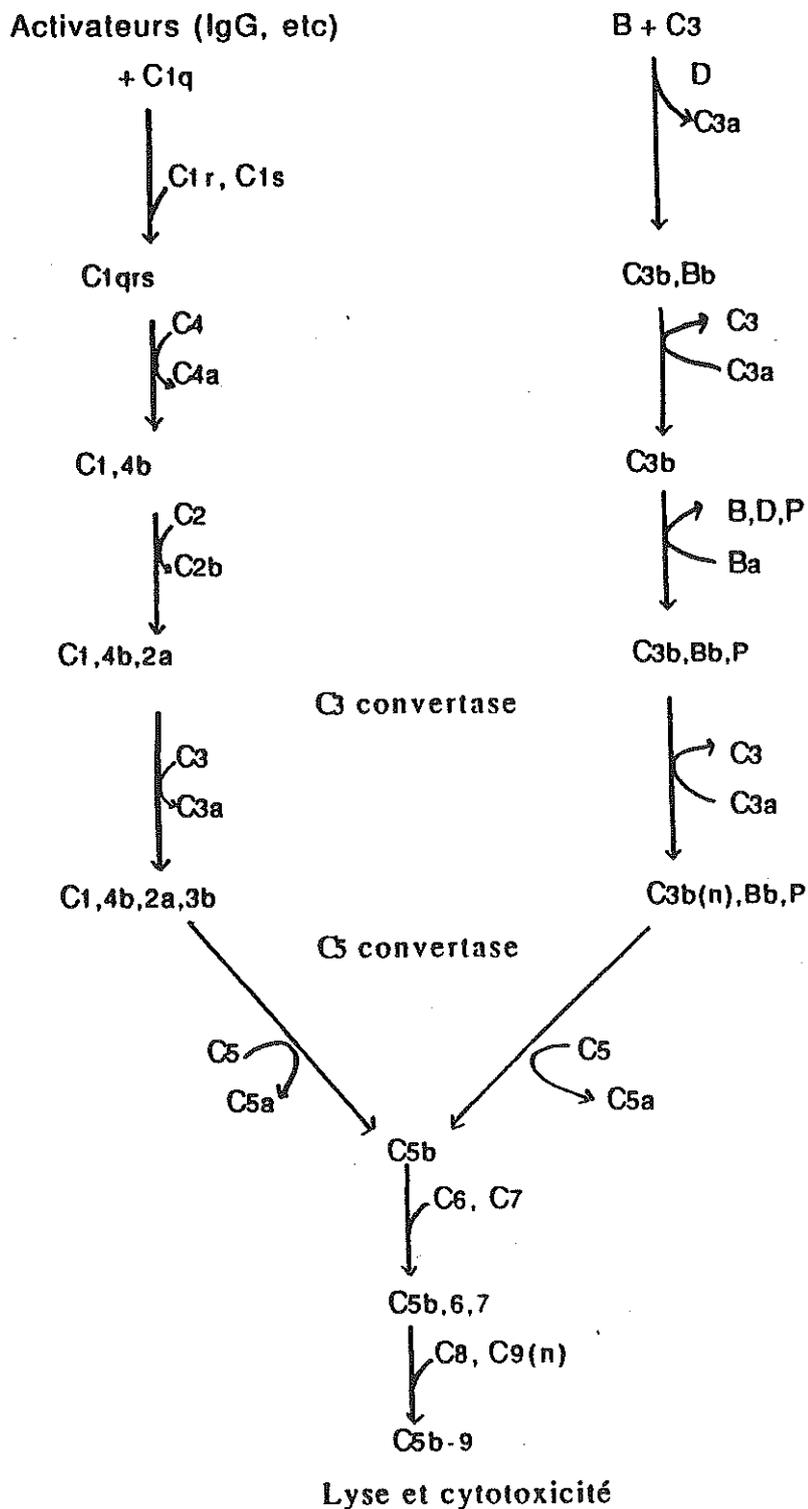


Schéma 7 : Activation de la voie classique et de la voie alterne du système du complément.

rétrocontrôle de la voie alterne clive le C<sub>3b</sub> libre en fragments inactifs grâce à un C<sub>3b</sub> inactivateur facteur I, C<sub>3b</sub>INA. Au niveau de la voie classique divers inhibiteurs peuvent ralentir l'activation du complément : le C<sub>1</sub>-estérase-INH bloque l'activité du C<sub>1s</sub>, le C<sub>3b</sub>INA peut cliver le C<sub>3b</sub> libre, le facteur H dégrade C<sub>4b</sub> et C<sub>3b</sub>, etc.

Les kinines, petits polypeptides, sont des vasodilatateurs efficaces activés dès le début de la réaction inflammatoire par le facteur Hageman; ces médiateurs possèdent aussi un pouvoir chimiotactique à l'égard des neutrophiles. La bradykinine est responsable des phénomènes douloureux. Cette action est potentialisée par la sérotonine, les prostaglandines et les lipoperoxydes (REGOLI D. et coll., 1980).

Les complexes immuns sont normalement éliminés par le foie, la rate, les poumons et activent la voie classique du complément. Leur taille est un facteur important de leur élimination, les plus grands fixent plus aisément les protéines du complément et pourront ainsi être véhiculés jusqu'au lieu de digestion. Cette dernière étape est assurée par les cellules phagocytaires.

Les complexes immuns sont nocifs lorsqu'ils se déposent sur les tissus. Cela est facilité par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la taille importante des complexes, l'affinité de l'antigène pour certains tissus, etc.

L'altération de tout vaisseau sanguin entraîne immédiatement l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sur les cellules endothéliales endommagées et des leucocytes dans les capillaires voisins des cellules agressées. Avec l'agrégation plaquettaire débute la première étape de la coagulation qui est intimement liée à la réaction inflammatoire car un certain nombre de médiateurs participent aux deux processus. Le schéma 8 récapitule brièvement les divers stades de la coagulation par la voie endogène et la voie exogène.

Parmi les facteurs agissant comme médiateur de l'inflammation le facteur XII, la thrombine et la fibrine sont les plus importants : le facteur Hageman activé lors de l'adhésion plaquettaire intervient dans l'activation du système producteur des

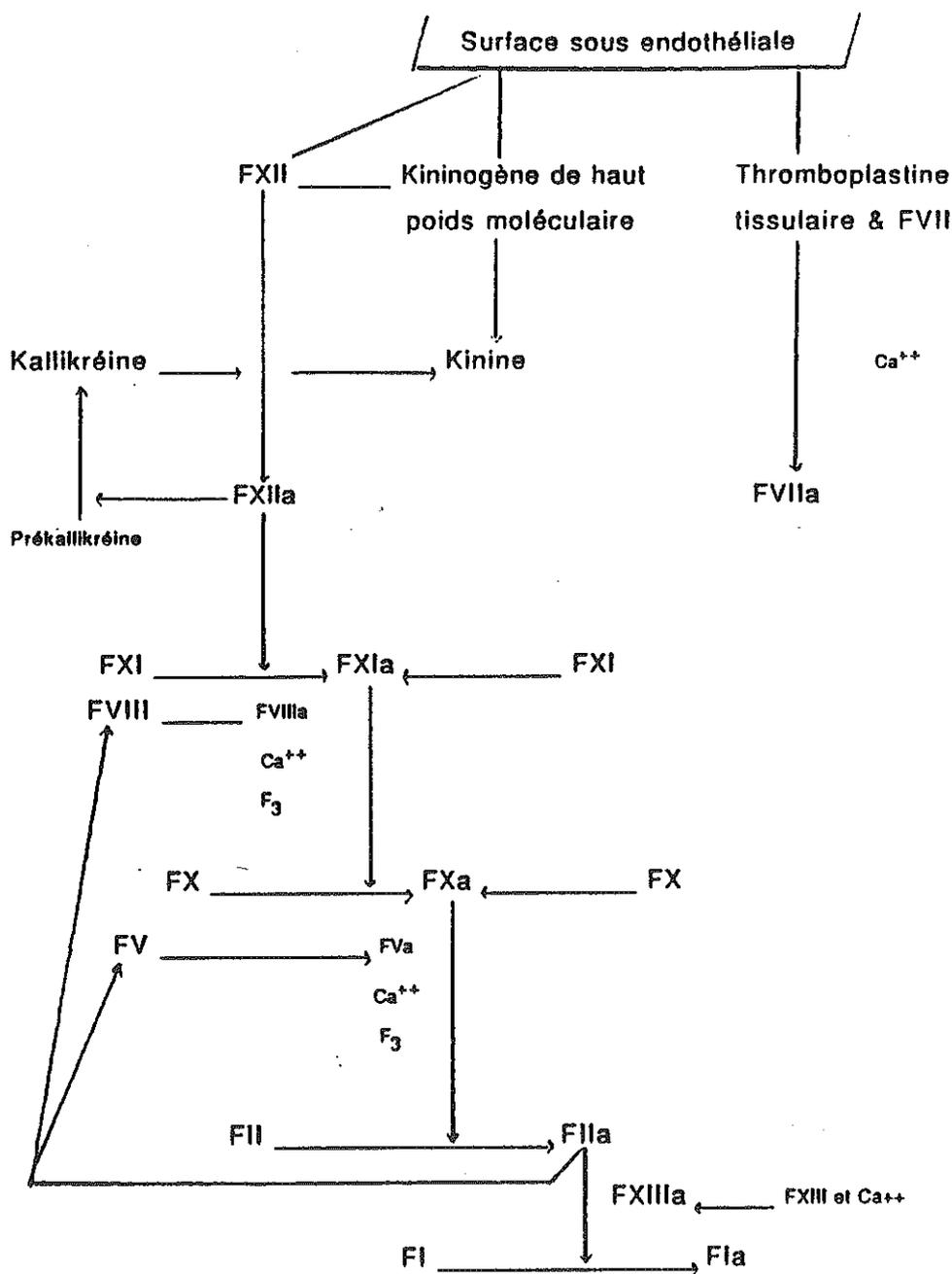


Schéma 8 : Schéma simplifié de la coagulation par la voie endogène et la voie exogène.

- FI : fibrinogène
- FIa : fibrine
- FII : prothrombine
- FIIa : thrombine
- FV : proaccélélerine
- FVII : proconvertine
- FVIII : facteur antihémophilique A
- FIX : facteur antihémophilique B
- FX : facteur Stuart
- FXI : plasma thromboplastine antécédant
- FXII : facteur Hageman
- FXIII : facteur stabilisant la fibrine
- F<sub>3</sub> : facteur plaquettaire 3

kinines et favorise l'adhésion des leucocytes ; la thrombine favorise la libération de sérotonine plaquettaire; la fibrine est chimiotactique pour les leucocytes.

Tous ces systèmes sont étroitement liés. En effet, les anaphylatoxines C<sub>3a</sub> et C<sub>5a</sub> entraînent l'agrégation plaquettaire et le C<sub>5b6</sub> stimule, en se fixant à la surface des plaquettes, la libération des facteurs plaquettaires responsables de la coagulation. La thrombine scinde le C<sub>3</sub>. La plasmine est responsable de la fibrinolyse, clive le C<sub>1q</sub>, active le facteur XII, etc. L'action de C<sub>1</sub> sur C<sub>2</sub> et C<sub>4</sub> est renforcée par la présence de facteurs chimiques issus de l'activation du système des kinines. Le fait que l'inhibiteur de la C<sub>1s</sub>-estérase bloque l'activité du facteur XII, ainsi que l'activité de la plasmine et de la kallikréine témoigne de cette interrelation entre les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse, le système du complément et le système kinine.

## II- Critères de différenciation des cellules phagocytaires mononucléées.

### II.1- Etude morphologique.

#### II.1.1- Les monocytes.

Après coloration au May Grunwald Giemsa (MGG) (LE BARON F. et coll., 1987), le cytoplasme basophile des monocytes se colore en bleu révélant des bords cellulaires, soit réguliers, soit parcourus d'expansions cytoplasmiques. Le noyau assez volumineux (N/C = 0,6 à 0,8), excentré le plus souvent, présente diverse formes: rond, ovalaire et surtout contourné en "fer à cheval". La chromatine irrégulièrement condensée a un aspect peigné. Les nucléoles du noyau sont rarement visibles et apparaissent alors en bleu, enchassés dans le violet de la chromatine. De même, les vacuoles cytoplasmiques de tailles variables ne sont que soupçonnées. Par contre, les granulations azurophiles cytoplasmiques renfermant des acides organiques faibles prennent l'azur de la solution de Giemsa, faisant virer au violet, la teinte bleu claire du colorant. Ces granulations sont nombreuses

et de taille réduite.

A l'état frais, le monocyte sanguin observé en contraste de phase montre des propriétés caractéristiques: étalement sur verre, émission de pseudopodes. De plus, les nucléoles sont bien visibles par ce procédé (LE BARON F. et coll., 1987).

Au microscope électronique, le noyau réniforme, un ou deux nucléoles sont observés. Le cytoplasme est particulièrement riche: mitochondries de petites tailles, appareil de Golgi bien développé entouré de granulations azurophiles, granulations cytoplasmiques diverses correspondant, entre autre, à des lysosomes, des vacuoles de pinocytoses, des expansions fines de la membrane cytoplasmique, des microtubules, des microfilaments (LE BARON F. et coll., 1987).

#### II.1.2- Les macrophages.

La morphologie des macrophages est pratiquement analogue à celle des monocytes mais leur taille ainsi que les organites cellulaires sont plus développés. Dans certaines circonstances locales (inflammation chronique), les macrophages du tissu conjonctif se métamorphosent en cellules épithélioïdes et cellules géantes plurinucléés dont les noyaux se mettent en couronne (cellules de Langhans).

#### II.2- Propriétés cytochimiques.

Ces propriétés sont facilement utilisées comme critère de différenciation des monocytes-macrophages, des autres lignées sanguines. La recherche de l'activité estérasique non spécifique est la plus représentative. La réaction est intense avec l' $\alpha$ -naphtyl-acétate sur toute la lignée des phagocytes mononucléés et inhibée en présence de fluorure de sodium sur les monocytes circulants et non sur les macrophages tissulaires (MUSSON R.A., 1983).

### II.3- Les marqueurs de surface.

L'activation et la maturation des monocytes s'accompagnent de réarrangements de la composition macromoléculaire des membranes plasmiques. L'expression et la fonction de certains récepteurs membranaires dépendent, du stade fonctionnel des cellules phagocytaires mononucléées, de l'influence de facteurs environnants et servent de marqueurs pour différencier les différents stades cellulaires.

#### II.3.1- L'influence de facteurs environnants.

En plus du stade de maturation des cellules, les facteurs environnants sont eux-mêmes impliqués dans l'expression de récepteurs membranaires. L'expression des récepteurs de faible affinité pour la fraction Fc des IgE (FcεR II ou CD23) est un très bon exemple. En effet, WILLIAMS J. et coll. (1992) ont montré que ces récepteurs, présents sur les monocytes circulants et les macrophages alvéolaires, voient leur expression augmentée chez le sujet asthmatique, par rapport au sujet sain. Ils ont ainsi montré que l'expression de ces récepteurs peut être induite par les IgsE et éventuellement l'IL-4, l'INFγ et l'INFα.

L'influence de l'interféron-γ et du facteur de nécrose des tumeurs α (TNFα) sur l'expression des antigènes (Ags) de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), élément clé dans la présentation de l'antigène, est plus complexe. Selon le stade de différenciation, ces cytokines se comportent différemment. Sur les cellules immatures, ces deux facteurs augmentent l'expression des Ags de classe II, alors que sur les macrophages, TNFα diminue la capacité qu'a l'IFNγ d'induire l'expression de ces mêmes récepteurs (WATANABE Y. et coll., 1991).

Les mécanismes internes, responsables de l'expression, ne sont pas toujours bien définis, mais deux cas de figures se présentent.

Dans certains cas, l'expression rapide d'un antigène à la surface des membranes, semble correspondre au transfert, à la surface des cellules, d'un

matériel stocké dans le cytoplasme. C'est ainsi que MILLER L.J. et coll. (1987) ont montré que les protéines d'adhésion Mac-1 et p150-95 passent en quelques minutes du compartiment intracellulaire à la surface cellulaire après traitement de monocytes par le N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (FMLP), TNF, le C<sub>5a</sub> et les leucotriènes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). De même, MIDOUX P. et coll. (1989) ont rapporté l'existence d'un antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 5B5, initialement présent dans le cytoplasme des macrophages, et exprimé en surface de la cellule après adhésion des cellules au plastique.

L'attachement au plastique n'est toutefois pas suffisant pour induire l'expression d'antigènes révélés par l'anticorps AMH 152, comme le montrent MARTIN A. et coll. (1992) qui suggèrent la mise en jeu de synthèses protéiques. L'un des points principaux étayant cette constatation est que ni le FMLP, ni le phorbol myristate acétate (PMA) provoquent l'expression immédiate de cet antigène (MARTIN A. et coll., 1992).

### II.3.2- Critères de différenciation.

L'expression de récepteurs à la surface des phagocytes mononucléés varie au cours de la maturation cellulaire. Les récepteurs pour le mannose, impliqués dans la reconnaissance de glycoprotéines bactériennes, voient leur expression diminuer sur les macrophages activés (CLOHISY D.R. et coll., 1987).

L'emploi d'anticorps monoclonaux permet d'établir avec certitude, l'état fonctionnel dans lequel est la cellule. Les études réalisées dans ce domaine sont nombreuses et les quelques exemples suivants permettent d'en apprécier la complexité et la diversité.

L'expression de l'antigène révélé par l'AMH 152, apparaît sur les monocytes après quelques heures de culture et, est détectée uniquement dans les macrophages des tissus inflammatoires (MARTIN A. et coll., 1992). ZWALDO G. et coll. (1986) ont mis en évidence un anticorps 27E10 agissant sur un antigène membranaire de 17 kDa. Celui ci n'est exprimé que par 20% des monocytes circulants et l'expression diminue avec la maturation cellulaire. Par contre, l'anticorps 27E10 réagit positivement sur la majorité des macrophages aux sites

inflammatoires (ZWALDO G. et coll., 1986).

MRP8 et MRP14 sont deux protéines exprimées par les cellules myéloïdes, et les monocytes circulants mais pas par les macrophages tissulaires (ODINK K. et coll., 1987). Par contre, dans l'inflammation aiguë, les macrophages expriment uniquement MRP14, alors que dans l'inflammation chronique (polyarthrite), l'infiltration macrophagique exprime MRP8 et MRP14 (ODKIN K. et coll., 1987).

L'anticorps 63D3 réagit positivement sur tous les monocytes circulants et l'expression de l'antigène révélé diminue progressivement au cours de la culture cellulaire (UGOLINI V. et coll., 1980). A l'opposé, KP1 reconnaît un antigène persistant tout au long de la maturation des monocytes et des macrophages destinés à assurer la phagocytose, mais dont l'expression augmente au cours de la maturation et de l'activation (PULFORD K.A.F. et coll., 1989).

Ber-Mac 3 reconnaît un épitope de 140 kDa présent sur les monocytes activés par les lipopolysaccharides (LPS), l'interféron- $\gamma$  et/ou l'adhérence ainsi que sur les macrophages résidents tissulaires (BACKE E. et coll., 1991).

ZWALDO G. et coll. (1985) décrivent le 25F9, dirigé contre un antigène de 86kDa, qui ne réagit pas sur les monocytes fraîchement isolés, mais uniquement, après 3 jours de culture et l'expression de l'antigène augmente régulièrement dans le temps. Cet antigène est préférentiellement exprimé par les macrophages tissulaires non impliqués dans des processus inflammatoire (ZWALDO G. et coll., 1985).

L'expression de l'antigène Ia et du CD14 ne définit pas, par contre, un état de maturation. En effet, le CD14 est exprimé sur toute la lignée des phagocytes mononucléés (COUTURIER C. et coll., 1991) et l'expression de l'antigène Ia est réversible et en partie modulée par les facteurs environnants (MAUER U. et coll., 1984).

La découverte constante de nouveaux anticorps monoclonaux permettra dans les années à venir de mieux connaître et de mieux caractériser la maturation des monocytes en macrophages.

### III- Propriétés et activités fonctionnelles des phagocytes mononucléés.

Les activités des monocytes sont multiples dans l'organisme et induites par deux propriétés essentielles qui caractérisent ces cellules: leur capacité d'endocytose et leur activité de sécrétion.

#### III.1- Cellules phagocytaires.

Les macrophages contribuent à l'élimination de corps étrangers (particules inertes, microorganismes) et de cellules endommagées (érythrocytes morts, tissu lésé).

Cette fonction protectrice débute par l'extravasation des monocytes circulants à travers l'endothélium vasculaire et leur migration au site d'invasion des tissus par les microorganismes. Au sein du mouvement deux composantes sont définies : la direction prise par la cellule (chimiotactisme) et la vitesse de déplacement (chimiocinèse) (MALE D. et coll., 1987). Les facteurs chimiotactiques sont engendrés au site de l'inflammation et diffusent facilement à travers les tissus. Certains agissent indépendamment de tout processus immunologique (peptides de la fibrine, de la thrombine ...) mais la majorité sont produits par les neutrophiles, les lymphocytes, les cellules cancéreuses, les macrophages activés : C5a, C5a-desArg, LTB<sub>4</sub>, peptides formyl méthionylés bactériens sont les quatre facteurs chimiotactiques principaux (MALE D. et coll., 1987). MCP (protéine chimiotactique pour les monocytes) agit sélectivement sur les monocytes (BOTTAZZI B. et coll., 1983) et peut être sécrété par ces mêmes cellules après stimulation par des LPS (COLOTTA F. et coll., 1992).

Les particules phagocytées peuvent ne présenter aucun site de reconnaissance (latex, ...). L'interaction est supposée purement physique mais, en général, la reconnaissance est soit non spécifique, assurée par des récepteurs pour le mannose, le fucose, les lipopolysaccharides (CD14), soit spécifique, médiée par des récepteurs pour le fragment Fc (Fc $\gamma$ R I pour les IgGs, Fc $\gamma$ R II et Fc $\gamma$ R III pour immuns complexes) et le CR1, récepteur pour le fragment C3b du

complément. Elle est facilitée en présence d'opsonines (MALE D. et coll., 1987). Toutefois, l'augmentation de l'action microbicide des macrophages activés ne doit pas être systématiquement attribuée à une augmentation des capacités phagocytaires (JOHNSTON R.B., 1988).

### III.2- Cellules bactéricides.

Les monocytes-macrophages, fonctionnent comme des cellules effectrices qui inhibent la multiplication des parasites ou les détruisent. De nombreux facteurs comme  $\text{INF}\gamma$ , GM-CSF, IL-3, sont principalement responsables du phénomène d'activation. Les agents pathogènes eux-mêmes peuvent, indépendamment des cellules T, activer les macrophages soit directement, soit en induisant la sécrétion par les phagocytes de TNF, qui à son tour active d'autres macrophages.

Parmi les mécanismes effecteurs microbicides, la respiration oxydative est l'un des plus importants ; ce terme englobe une série de réactions oxydatives en chaîne déclenchées par une activation appropriée du phagocyte et caractérisées par une augmentation de la consommation d'oxygène, un accroissement considérable du catabolisme du glucose par la voie des hexoses monophosphates et la génération de radicaux libres oxygénés concomitante à l'activation de NADPH oxydase selon la séquence de réactions suivantes: réduction monovalente de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  puis dismutation spontanée ou induite par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enfin, formation secondaire de radicaux hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  et d'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  (LOCKSLEY R.M. et coll., 1983). Après fusion du phagosome avec les granules de peroxydase, la myéperoxydase forme, en agissant sur  $\text{H}_2\text{O}_2$ , des hypochlorites ( $\text{HOCl}$ ) toxiques pour les bactéries. Le macrophage résident perd son activité myéloperoxydasique qu'il ne retrouvera que s'il est activé.

### III.3- Cellules auxiliaires.

En sécrétant de l'IL-1 et en présentant les antigènes aux lymphocytes T, les

macrophages contribuent au développement des réactions immunitaires spécifiques. L'antigène ingéré par les macrophages est présenté aux cellules T après remaniement sous une forme biochimique plus active. Cette capacité fonctionnelle est essentiellement assurée par les macrophages Ia<sup>+</sup> (UNANUE E. R. et coll., 1987).

#### III.4- Cellules cytotoxiques.

Les macrophages s'opposent par des mécanismes extracellulaires à la croissance des cellules tumorales et détruisent certains parasites de grande taille ou des cellules infectées. La mort cellulaire met en jeu de nombreux produits de synthèse : enzymes lysosomiaux, radicaux oxygénés, protéinases cytosoliques, TNF ...

#### III.5- Cellules sécrétrices.

Les phagocytes mononucléés synthétisent et sécrètent une quantité impressionnante de substances à différents stade de leur maturation (NATHAN C.F., 1987) ( Tableau I). Ces composés interviennent soit dans les réactions de défense (lysozyme, IFN, facteurs du complément ...), soit dans les phénomènes inflammatoires (protéases, LTs, PGs, ...), soit dans le métabolisme général (apolipoprotéine E) (BASHEERUDDIN K. et coll., 1992).

### **B/ PRODUCTION D'EICOSANOIDES PAR LES CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEES HUMAINES.**

#### **I- Facteurs influençant l'interprétation des résultats.**

Les méthodes d'extraction des monocytes du sang, le milieu de culture, la durée de l'étude, le pourcentage de purification, l'hétérogénéité des populations monocytaires et macrophagiques, la transposition in vitro, sont autant de facteurs qu'il est nécessaire de prendre en compte afin d'interpréter correctement les

**Hormones polypeptidiques.**

- interleukine 1  $\alpha$  et 1  $\beta$  (IL-1)
- facteur de nécrose des tumeurs (TNF)
- interféron  $\alpha$  et  $\gamma$
- facteur de croissance des plaquettes
- facteur de croissance des fibroblastes
- thymosine B4
- érythropoïétine
- facteur de stimulation des colonies pour les granulocytes et les macrophages (GM-CSF) (G-CSF)
- $\beta$  endorphine
- hormone adrénocorticotrope
- facteur d'activation des neutrophiles
- .....

**Composés du complément.**

- voie classique : C1, C4, C2, C3, C5
- voie alterne : facteur B, facteur D, properdine
- inhibiteurs :  $\beta$ -1H, inactivateur C3b
- fragments actifs produits par les protéases des macrophages : C3a, C3b, C5a, Bb

**Facteurs de la coagulation.**

- voie intrinsèque : IX, X, V, prothrombine
- voie extrinsèque : VII
- activité de surface : facteurs tissulaires, prothrombinase
- activité prothrombolytique : activateur du plasminogène
- activité antithrombolytique : inhibiteurs de l'activateur du plasminogène, inhibiteurs de plasmin.

**Autres enzymes.**

- protéases neutres : activateur de plasminogène, élastase, collagénases...
- lipases : phospholipases A2, lipoprotéine lipase..
- glucosaminidase : lysozyme
- hydrolases acide lysosomales : protéases, lipases (deoxy) ribonucléases phosphatases, glycosidases sulfatases.
- déaminase : arginase

**Inhibiteurs d'enzymes et de cytokines.**

- inhibiteurs de protéases :  $\alpha$ -2-macroglobuline,  $\alpha$ -1-antitrypsine, inhibiteurs de l'activateur du plasminogène, inhibiteurs de la plasmine,
- inhibiteur de la collagénase
- inhibiteur de phospholipase : lipomoduline
- inhibiteur de l'IL-1

**Protéines de la matrice extracellulaire et de l'adhésion des cellules.**

- fibronectine
- protéine de 95 kD de liaison à la gélatine
- thrombospondine
- protéoglycane sulfate de chondroïtine

**Autres protéines de liaisons.**

- transferrine, isoterritines acides, transcobalamine II
- lipides d'apoprotéine E, protéine de transfert des lipides
- avidine

**Oligopeptides bioactifs**

- glutathion

**Lipides bioactifs.**

- produits de la cyclooxygénase
- produits de la lipoxygénase
- facteur d'activation des plaquettes (PAF)

**Hormones stéroïdes**

- 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamine D3

**Produits de la purine et de la pyrimidine**

- thymidine, uracil, acide urique, déoxycytidine, néoptérine

**Intermédiaires oxygénés réactifs.**

- superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle

**Intermédiaires nitrogénés réactifs.**

- nitrites, nitrates.

Tableau 1 : Produits de sécrétion des phagocytes mononucléés.  
(NATHAN C. F., 1987)

résultats concernant la synthèse et la sécrétion d'eicosanoïdes par les monocytes et les macrophages.

## I.1- Techniques de séparation cellulaire.

### I.1.1- Prélèvements.

Les méthodes de prélèvement sont liées à l'origine des cellules: prise de sang pour les monocytes circulants, biopsie médullaire pour les cellules souches monocytiques, biopsie péritonéale pour les macrophages péritonéaux, lavage bronchoalvéolaire pour les macrophages pulmonaires.

Le recueil de prélèvements sanguins doit impérativement être réalisé sur anticoagulants : citrate, héparine, EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique).

### I.1.2- Séparations cellulaires.

Très souvent, la séparation des monocytes à partir du sang circulant utilise la capacité d'adhérence des monocytes au plastique et au verre. La population cellulaire ainsi obtenue est pour certains, considérée comme pure alors que pour d'autres, elle ne l'est pas (contamination par certaines populations lymphocytaires); dans tous les cas, les monocytes sont susceptibles d'être stimulés (HASKILL S. et coll., 1988).

La centrifugation en gradient de densité (Ficoll Hypaque - Nycoprep 1,068) n'affecte vraisemblablement pas la fonction monocyttaire mais une perte cellulaire est constatée ainsi que la contamination cellulaire par les lymphocytes de taille et de densité similaire, et par les plaquettes agrégantes (VISSERS M.C.M. et coll., 1988).

L'élutriation permet de séparer de grandes quantités de cellules dans de bonnes conditions de stérilité lorsqu'elle est réalisée par un manipulateur consciencieux. Elle nécessite toutefois un équipement spécial (MASSON R.R. et coll., 1985).

Plus récemment, l'essor du fractionnement des cellules mononucléées par

l'emploi de particules marquées par des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de membrane ouvre une nouvelle voie. D'après les constatations de FLO R.W. et coll. (1991), la morphologie des monocytes reste intacte, le rendement est intéressant et l'étude en microscopie électronique n'indique aucune dégénération et activation.

### I.2- Culture.

Les conditions de culture, milieu et durée, sont deux paramètres très importants. BOCKMAN R.S. (1981) a pu expliquer la divergence des résultats obtenus *in vitro* sur la sécrétion de prostaglandines par les monocytes humains. Les cellules fraîchement isolées, libèrent du  $\text{TxA}_2$  après adhérence au plastique. Après 18 heures de culture, elles synthétisent en majorité  $\text{PGE}_2$ . Cette synthèse augmente dans le temps ainsi que sous certaines stimulations à visée inflammatoire:  $\text{C}_{3\text{bi}}$ , immun complexe, endotoxine.

La culture sur teflon (substance hydrophobe), minimise l'adhérence des monocytes et donc leur stimulation (ANDREESSEN R. et coll., 1983).

### I.3- Degré de purification.

Les préparations de monocytes sont toujours contaminées, même en proportion minime, par d'autres populations cellulaires lors d'extraction par élutriation ou marquage de billes. Plus la contamination sera importante, plus la qualification et la quantification des métabolites formés seront inexactes.

Cette contamination peut aussi créer des problèmes d'interprétation lors de l'étude de l'influence de stimuli exogènes. Il apparaît difficile de distinguer l'effet de l'agent sur le monocyte ou le macrophage induit, de l'effet second médié partiellement ou entièrement par les cellules contaminantes.

Enfin, il est clairement établi que les cellules communiquent entre elles et s'échangent l'acide arachidonique ou certains de leurs métabolites qu'elles ne peuvent pas synthétiser mais qu'elles peuvent éventuellement transformer (CHAPKIN R.S. et coll., 1988)(BIGBY T.D. et coll., 1989).

Les contaminants principaux de cultures de monocytes sont:

- 1) Les macrophages activés: les monocytes circulants sont beaucoup plus sensibles aux stimuli que les macrophages résidents.
- 2) Les lymphocytes: leur taille et leur densité sont voisines de celles du monocyte.
- 3) Les plaquettes: ces cellules adhèrent dix fois plus aux monocytes qu'aux neutrophiles. Cette réaction implique l'expression de thrombospondine à la surface des plaquettes stimulées et la liaison de la thrombospondine sur certains récepteurs de monocytes (SILVERSTEIN R.L. et coll., 1987).

#### I.4- Hétérogénéité des populations.

GOLDYNE M.E. et coll. (1979) ont trouvé des différences significatives entre les différentes sous populations de monocytes, fractionnées par centrifugation en gradient discontinu, sur la synthèse de  $PGE_1$  et  $PGE_2$ . De même, COGNY-VAN WEYDEVELT F. (1987), a mis en évidence que certaines sous populations de macrophages péritonéaux de souris produisent  $LTC_4$ , d'autres  $LTB_4$  ou  $PGE_2$ .

#### I.5- Influence des métabolites.

Dans l'organisme les métabolites de l'acide arachidonique sont rapidement dégradés puis excrétés grâce à l'intervention de cellules et de médiateurs solubles environnants.

In vitro, ces métabolites sont formés mais non dégradés, à l'exception du  $TxA_2$ , de la  $PGI_2$ , et d'une fraction de 5 HETE en milieu acide et de  $LTB_4$ , donc actifs. En particulier, la stimulation des monocytes et des macrophages s'accompagne de la libération de  $PGE_2$  qui elle même active une adénylate cyclase. Il en résulte une augmentation du niveau d'AMPc lequel peut inhiber l'activité des phospholipases et donc la libération d'acide arachidonique libre (MINKES M. et coll., 1977).

## II- Production d'eicosanoïdes par les monocytes stimulés et non stimulés.

### II.1- Agents stimulants.

#### II.1.1- Acide arachidonique (AA)

L'apport d'acide arachidonique permet d'étudier le métabolisme lipoxygénasique exogène de la cellule. Toutefois, l'AA est reconnu comme étant un inhibiteur compétitif de la PLA<sub>2</sub> (DENNIS E.A., 1990). Cela pourrait expliquer la diminution de l'activité 5 lipoxygénasique dans les monocytes humains préincubés en présence d'AA (GOLDYNE M.E. et coll., 1984).

D'autre part, l'AA a la capacité de créer une déplétion en ATP. Le mécanisme semblerait associé à des phosphorylations oxydatives non couplées (ARSLAN P. et coll., 1984). La 5 lipoxygénase est connue comme étant ATP dépendante (ROUZER C.A. et coll., 1985). A l'opposé, la 15 lipoxygénase de certains kératinocytes néonataux humains est inhibée par l'ATP (BURRALL B.A. et coll., 1988). C'est ainsi que PETERS-GOLDEN M. et coll. (1988) ont montré que l'AA exogène modifie la synthèse de dérivés de la cyclooxygénase et la lipoxygénase dans les macrophages alvéolaires de rat et que l'inhibition de la 5 lipoxygénase est liée à une déplétion en ATP et s'accompagne parallèlement de la production de 15 HETE.

#### II.1.2- Ionophore calcique A 23187.

C'est une molécule hydrophobe qui se dissout dans les doubles couches lipidiques de la membrane plasmique et augmente la perméabilité ionique de la double couche. Il transporte des ions divalents comme le Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup> du milieu extérieur vers le cytoplasme. Ces ions sont échangés contre deux protons.

D'un point de vue physiologique, l'action du ionophore peut être comparée à celle de l'IP<sub>3</sub> bien que ce dernier mobilise le Ca<sup>++</sup> des compartiments de stockage intracellulaire. Le Ca<sup>++</sup> active la PLA<sub>2</sub> et favorise la translocation de la 5

lipoxigénase du cytosol à la membrane (ROUZER C.A. et coll., 1988).

### II.1.3- Esters de phorbol.

Le TPA, phorbol 12-0-tétradécanoate 13-acétate, et le PMA, phorbol 12-myristate 13-acétate, sont les esters de phorbol les plus souvent employés. Ils se lient aux protéines kinases C et les activent. Leur action est comparée à celle du DAG sur les protéines kinases C sans augmenter la concentration calcique intracellulaire (HOFFMAN T. et coll., 1988).

### II.1.4- Peptides formyl-méthionylés.

Ces peptides sont libérés par la paroi des bactéries. Le plus actif est le FMLF (N-formyl-L-méthionine-L-leucine-L-phénylalanine), médiateur chimiotactique, il est surtout un activateur de la 5 lipoxigénase.

### II.1.5- Agents divers.

La concanavaline A (Con A) est une phytohémagglutinine spécifique de la liaison des oses. Elle possède une activité mitogène et augmente la concentration calcique dans la cellule en induisant l'hydrolyse du phosphatidylinositol (HOFFMAN T. et coll., 1991).

La cytocholasine B est un métabolite à activité cytostatique. Il semble amplifier de nombreuses réponses générées au niveau des membranes plasmiques.

Le zymosan est une particule de la paroi des levures contenant des  $\alpha$ -mannoses et  $\beta$ -glucanes. Il augmente la concentration en calcium dans les cellules. HOFFMAN T. et coll. (1988) ne peuvent assurer qu'il s'agisse d'une conséquence de la phagocytose. Mais la phagocytose est elle-même associée à une augmentation de  $Ca^{++}$  intracellulaire.

## II.2- Voie de la cyclooxygénase.

D'après les travaux de BOCKMAN R.S. (1981), les monocytes humains fraîchement isolés, libèrent du  $\text{TxA}_2$  après une courte période d'adhérence. Non stimulées, ces cellules sécrètent 24 à 48 heures plus tard des PGEs et surtout  $\text{PGE}_2$  (PASSWELL J.H. et coll., 1979).

Après 24 à 48 heures de culture, la stimulation de ces mêmes cellules par les fragments Fc des IgGs, la Con A, le zymosan ou des billes de Séphadex s'accompagne d'une augmentation de la synthèse de  $\text{PGE}_2$ . La cytochalasine B agit en synergie avec le fragment Fc alors qu'elle n'a aucune action sur l'effet de la Con A. Dans tous les cas, l'implication de récepteurs de surface, spécifiques ou non, sur la synthèse de  $\text{PGE}_2$  est certaine. L'insuline par contre n'aura aucune incidence sur le métabolisme de la  $\text{PGE}_2$ . La phagocytose de particules de latex ne modifie pas la production de  $\text{PGE}_2$  et les endotoxines ne l'augmentent que faiblement (PASSWELL J.H. et coll., 1979).

D'après de nombreux résultats, il faut, en fait, distinguer des sous populations de monocytes ayant chacune des capacités différentes pour la synthèse de PGEs et d'IL-1, métabolites à action antagoniste (KHANSARI N. et coll., 1985).

$\text{PGI}_2$  est retrouvée en quantité non négligeable dans les surnageants cellulaires; elle est détectée en HPLC par l'intermédiaire de son produit de dégradation 6 céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  (HOFFMAN T. et coll., 1988). Quelques pics sont observés aux temps de rétention de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et  $\text{PGD}_2$  dans certaines cultures cellulaires stimulées ou non par des particules de zymosan, du TPA ou du ionophore A 23187 après 4 heures de marquage à l'AA radioactif (HOFFMAN T. et coll., 1988).

## II.3- Voie de la lipoxygénase.

### II.3.1- Métabolisme général.

Les monocytes humains prémarqués 4 heures par de l'acide arachidonique radioactif et incubés 2 heures en absence ou en présence de stimulus (ionophore A

23187, particules de zymosan, TPA) métabolisent d'après HOFFMAN T. et coll. (1988) des produits issus de l'activité catalytique de la cyclooxygénase et de la 15 lipoxygénase.

Selon de nombreux travaux, les monocytes, après des étapes d'adhérence et sous l'action stimulante de facteurs augmentant les concentrations de calcium intracellulaire, peuvent exprimer une 5 lipoxygénase, une glutathion-S-transférase spécifique et une LTA<sub>4</sub> hydrolase. L'expression d'une  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase spécifique serait induite par le FMLP. WILLIAMS J.D. et coll. (1986) ont mis en évidence la transformation partielle de LTC<sub>4</sub> en LTD<sub>4</sub> dans les monocytes humains. HOFFMAN T. et coll. (1988) ont aussi détecté dans certains lots cellulaires la production de LTD<sub>4</sub> après stimulation par du ionophore ou des particules de zymosan.

### II.3.2- Métabolisme sous stimulus augmentant la concentration de Ca<sup>++</sup> intracellulaire associé à des étapes d'adhérence.

Les monocytes humains possèdent à la surface de leur membrane plasmique deux catégories de récepteurs pour la phagocytose: récepteur pour le fragment Fc des IgGs et récepteur des  $\beta$ -glucanes. Ceux ci diffèrent par leur spécificité de ligand, leur sensibilité à la trypsine et leurs cofacteurs (CZOP J.K. et coll., 1985) (WILLIAMS J.D. et coll., 1984).

La stimulation des récepteurs pour le fragment Fc des IgGs s'accompagne de la libération de métabolites issus de l'activité catalytique de la cyclooxygénase (PASSWELL J.H. et coll., 1979).

L'activation des récepteurs  $\beta$ -glucane qui reconnaissent certaines particules comme celles du zymosan en absence de protéines plasmatiques, stimule la voie de la 5-lipoxygénase des monocytes qui libèrent alors LTC<sub>4</sub> et LTB<sub>4</sub> (CZOP J.K. et coll., 1985). Ce dernier, métabolite principal des monocytes engagés dans cette voie, promouvoit certainement au cours de la phagocytose non immune le recrutement et la margination des leucocytes ainsi que leur migration vers le site d'inflammation. Ce récepteur pour les  $\beta$ -glucanes initie de plus le clivage rapide du C3. Celui-ci en se fixant sur son récepteur amplifie la réponse des récepteurs

pour les  $\beta$ -glucanes mais aussi celle des récepteurs pour le fragment Fc des IgG donc facilite la phagocytose immune et non immune (CZOP J.K. et coll., 1985) (WILLIAMS J.D. et coll., 1984).

La stimulation des récepteurs des  $\beta$ -glucanes favorise aussi le clivage de la fibronectine qui opsonise certaines particules et les lie à des récepteurs de la fibronectine qui à leur tour synergissent l'action des récepteurs pour les  $\beta$ -glucanes et non celle pour les Fc des IgG (CZOP J.K. et coll., 1985) (WILLIAMS J.D. et coll., 1984).

Stimulés par du ionophore A 23187, les monocytes humains libèrent 5 HETE, LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub> et des métabolites non enzymatiques 5S-12R et 5S-12S-LTB<sub>4</sub> (WILLIAMS J.D. et coll., 1986) (GOLDYNE M.E. et coll., 1984) (BIGBY T.D. et coll., 1987). Cette sécrétion est six fois plus importante que lors de l'activation des monocytes par le FMLP préincubés en présence de cytochalasine B (WILLIAMS J.D. et coll., 1986). Par contre, la cytochalasine ne potentialise pas l'action de l'ionophore sur ces cellules.

### II.3.3- Métabolisme en présence d'ester de phorbol.

Sur des monocytes obtenus par élutriation, le TPA n'induit pas la libération de métabolites issus de la 5 lipoxygénase (HOFFMAN T. et coll., 1988). Par contre, le PMA et la Con A induisent une libération très faible de LTB<sub>4</sub>. HOFFMAN T. et coll. (1991) ont montré qu'une forte proportion de LTB<sub>4</sub> reste en fait associée à certaines fractions cellulaires lorsque les monocytes sont stimulés par PMA ou Con A. Par contre, ensemble, ces deux agents agissent en synergie et libèrent des quantités de LTB<sub>4</sub> comparables à celles obtenues par des particules de zymosan, ou du ionophore.

### II.3.4- Métabolisme en présence d'acide arachidonique exogène.

Tous les travaux s'accordent pour affirmer qu'en présence d'AA exogène, les monocytes circulants ont une capacité diminuée à libérer des métabolites issus de

la 5 lipoxygénation (BIGBY T.D. et coll., 1987) (WILLIAMS J.D. et coll., 1984) (GOLDYNE M.E. et coll., 1984) (FERRERI N.R. et coll., 1986) à l'exception de BALTER M.S. et coll. (1989) qui montre que les monocytes synthétisent et sécrètent de fortes proportions de  $\text{LTB}_4$  et  $\text{LTC}_4$  en présence d'AA exogène par rapport aux macrophages alvéolaires humains.

### II.3.5- Incidence des interactions cellulaires sur le métabolisme 5-lipoxygénasique des monocytes.

La contamination des préparations monocytaires par les lymphocytes et les plaquettes a un intérêt évident dans l'interprétation des phénomènes biologiques. Les monocytes se comportent comme des cellules accessoires, vis à vis des lymphocytes qui déclenchent alors une réponse immune. Les plaquettes se fixent au cours de thrombose, de processus inflammatoires, sur les monocytes, et jouent un rôle dans le recrutement de ces cellules.

Par contre, lors de l'étude du métabolisme propre des monocytes, la contamination des préparations monocytaires peut entraîner des erreurs d'interprétation.

#### *a- Interaction monocyte-plaquette.*

Les plaquettes sont une source de 12 HPETE et de 12 HETE (HAMBERG M. et coll., 1974). D'après BIGBY T.D. et coll. (1989), l'acide arachidonique libre, 5 HETE et  $\text{LTA}_4$  des monocytes humains sont convertis par les plaquettes en 12 HETE, 5S-12S-diHETE et  $\text{LTC}_4$ , respectivement. Par contre, les monocytes n'incorporent pas de produits de la 12 lipoxygénase libérés par les plaquettes. Et les plaquettes n'activent pas la 5 lipoxygénase des monocytes.

#### *b- Interaction monocyte-lymphocyte .*

Avant la mise en évidence par JAKOBSSON P.J. et coll. (1992) d'une 5 lipoxygénase dans les lymphocytes B, tous les travaux montraient que les

lymphocytes humains ne peuvent synthétiser le 5 HPETE à partir d'acide arachidonique exogène; par contre, tous admettent que les lymphocytes et en particulier les cellules monoclonales lymphocytaires possèdent une LTA<sub>4</sub> hydrolase. JAKOBSSON P.J. et coll. (1991) mettent en évidence que LTA<sub>4</sub> libéré dans le milieu extracellulaire par les monocytes humains est métabolisé en LTB<sub>4</sub>. Cet eicosanoïde stimule les lymphocytes qui peuvent alors libérer des Igs et certaines lymphokines qui peuvent contribuer à l'activation de la 5 lipoxygénase des monocytes.

### II.3.6- Métabolisme en présence d'interleukine 4.

#### *a- Interleukine 4 .*

Les réponses immunitaires, sont la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types de cellules qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de facteurs solubles appelés cytokines. IL-4, glycoprotéine de 20 kDa est une cytokine produite par les cellules T (HOWARD M. et coll., 1982), les mastocytes (PLANT M. et coll., 1989) et certaines cellules myéloïdes (LEGROS G.S. et coll., 1987). Récemment, une production excessive d'IL-4 a été signalée, in vitro, par des cellules T dans des cas d'hyper-recrutement d'IgG, désordre déprimant fortement la réponse inflammatoire (VERCELLI D. et coll., 1990). En fait, IL-4 agit aussi bien sur la réponse immunitaire, le contrôle de l'hématopoïèse et les réactions inflammatoires et l'hypersensibilité immédiate. Ces effets sont en majorité antagonisés in vitro par l'IFN $\gamma$ .

#### *- Action sur les cellules T:*

IL-4 stimule les cellules T au repos (HU-LI J. et coll., 1987). Toutefois, cette stimulation n'est pas aussi intense que celle induite par IL-2. La présence d'un co-stimulant tel que les esters de phorbol (PMA) accroît la différenciation et la prolifération de cellules T en CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Fonctionnellement, IL4 induit sur les cellules T CD8<sup>+</sup> l'expression de leur fonction cytotoxique. Son rôle sur la

fonction des CD4<sup>+</sup> n'est pas clairement établi ainsi que d'équivalent physiologique du PMA (YOKOTA T. et coll., 1988).

- Action sur les cellules B.

IL-4 est initialement définie comme un facteur stimulant les cellules B. Elle induit leur prolifération en présence d'anticorps anti IgM et favorise l'entrée de cellules au repos dans la phase S du cycle cellulaire .

Elle induit aussi l'expression de récepteurs à la surface des cellules B comme les molécules de classe II du CMH (NOELLE R. et coll., 1984), le CD23 (FcεR II) (HUDACK S.A. et coll., 1987) et son propre récepteur (OHARA J. et coll., 1988). Enfin, IL-4 en présence de LPS, augmente la sécrétion d'IgG et E et diminue celle des autres isotypes (VITETTA E.S. et coll., 1985) (COFFMAN R.L. et coll., 1986).

Tous ces effets suggèrent que IL-4 joue un rôle dans la préparation de l'interaction cellules B-cellules T et dans la réponse des processus allergiques.

- Contrôle de l'hématopoïèse.

Dans la moelle osseuse, IL-4 favorise la maturation de granulocytes, mégacaryocytes et érythrocytes. Par contre, elle inhibe l'action de IL-3 et du GM-CSF (LONDON L. et coll., 1990).

- Action sur les monocytes et les macrophages humains.

Deux types de récepteurs pour IL-4 ont été identifiés à la surface des monocytes humains. Chacun peut être régulé par IL-4 elle-même ou par une PKC. Ils ne dépendent pas des concentrations calciques (WAGTEVELD A.J., 1991).

IL-4 exerce une régulation négative sur la synthèse de nombreuses monokines, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8, G-CSF, GM-CSF par les monocytes humains stimulés par les LPS (HART P.H. et coll., 1992) (HAMILTON J.A. et coll., 1992)

(FENTON M.J. et coll., 1992). Les mécanismes impliqués ne sont pas tous connus. L'expression des gènes codant pour IL-6 et IL-1 est inhibée par altération du processus de transcription et par réduction de la demi vie des ARNm induits par les LPS. Parallèlement, IL-4 stimule l'expression d'ARNm et la synthèse de protéines antagonistes pour les récepteurs de IL-1 (FENTON M.J. et coll., 1992) (ESSNER R. et coll., 1989) (VANNIER E. et coll., 1992).

ARRUDA S. et coll. (1992) suggèrent que la translocation dans les monocytes humains de la protéine kinase C (PKC) à une fraction nucléaire est l'un des mécanismes par lequel la PKC régule la transcription de gènes comme ceux codant pour IL-1 et TNF. La transduction des récepteurs de IL-4 dans les monocytes humains est associée à la translocation de PKC.

IL-4 régule négativement la sécrétion de PGE<sub>2</sub> immunosuppressive (NATHAN C.F., 1987). Elle inhibe aussi la génération d'anion superoxide (ABRAMSON S.L. et coll., 1990). Il en est de même sur l'expression des trois classes de récepteurs pour la fraction Fc des Igs (TE VELDE A.A. et coll., 1990).

D'après TE VELDE A.A. et coll. (1988), IL-4 induit la maturation des monocytes humains en macrophages. Les modifications morphologiques apparaissent au bout de 5 jours de culture et sont associées à une augmentation des synthèses protéiques. IL-4 augmente l'expression du FcεR II sur les monocytes humains (TE VELDE A.A. et coll., 1990). Cette cytokine apparaît comme un des pivots dans les réactions allergiques en promouvant la réponse des IgsE alors que normalement elle semble contribuer à la limitation et à l'arrêt des réactions inflammatoires à médiations cellulaires. Toutefois, curieusement IL-4 ne peut induire l'expression de FcεR II sur les macrophages alvéolaires (VAN HAL P.T.W. et coll., 1992).

*b- Stimulation des monocytes humains par diverses cytokines* (CONRAD D.J. et coll., 1992).

Les monocytes humains fraîchement isolés sont incubés en présence de diverses cytokines pendant trois jours. Seule la stimulation par IL-4 induit l'expression de la 15 lipoxigénase détectable dès la douzième heure de culture.

IFN $\gamma$ , PMA et l'hydrocortisone sont capables d'inhiber cette induction.

Si l'incubation est associée à un apport d'AA exogène, les métabolites formés sont 15 HETE et 12 HETE dans un rapport de 10:1. Une partie du 15 HETE est estérifiée sur les membranes cellulaires et cette estérification est renforcée par certains stimuli (ionophore, particules de zymosan opsonisées). La présence d'un pic migrant dans la région de 5 HETE lors de l'analyse des métabolites en HPLC n'a été soumise à aucune investigation.

## C/ PROPRIETES DES EICOSANOIDES ET DE LEURS METABOLITES.

### I- Mécanisme d'action des prostaglandines et des leucotriènes.

L'activité biologique des eicosanoïdes est fugace, et leur concentration n'est importante qu'au site même de leur action. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore mal définis, cependant, certains récepteurs membranaires spécifiques des PGs et des LTs ont été mis en évidence.

#### I.1- Récepteur des prostaglandines.

GARDINIER P.J. (1990) a tenté de classer les récepteurs des PGs connues à ce jour en fonction de leur localisation tissulaire, de leurs agonistes et antagonistes.

MUALLEM S. et coll. (1989) classent les récepteurs des PGs en trois catégories en se basant sur les signaux induits par l'activation de ces systèmes : le premier récepteur interagit à PGF $_{2\alpha}$ , PGD $_2$  et TxB $_2$  ; le deuxième se lie à PGE $_2$ , PGE $_1$ , PGI $_2$ , PGA $_2$  et 6-oxo-PGF $_{1\alpha}$  et stimule la PLC ; le troisième récepteur se lie à PGE $_2$ , PGE $_1$ , PGI $_2$  et PGA $_2$  et augmente le taux d'AMPc.

Sur les cellules circulantes du sang périphérique, des récepteurs ont été décrits pour les érythrocytes (LEFKOWITZ R.J. et coll., 1977), les plaquettes (SCHAFER A.I. et coll, 1979), les monocytes (ROSSI A.G. et coll., 1989), les lymphocytes (GOODWIN J.S. et coll., 1979), les neutrophiles (ROSSI A.G. et coll., 1989).

$PGE_2$  en se fixant sur son récepteur membranaire active vraisemblablement une adényl cyclase qui induit la production d'AMPc qui active lui-même une protéine kinase. L'AMPc, à l'inverse inhibe la synthèse de PGs ce qui suggère l'existence d'un rétrocontrôle cellulaire (SMITH W.L. et coll., 1985).

Les  $PGF\alpha$  stimulent la guanylate cyclase membranaire provoquant une augmentation du taux de GMPc antagoniste de l'AMPc. Ceci pourrait expliquer en partie les actions antagonistes souvent constatées entre  $PGF\alpha$  et PGE (HENRY J.C., 1988).

## I.2- Récepteurs des leucotriènes.

KRELL R.D. et coll. (1990) proposent une classification provisoire et simplifiée des récepteurs des LTs. L'abréviation pLT est adoptée pour les récepteurs des LT-peptidiques : le récepteur du  $LTC_4$  est appelé pLT<sub>1</sub> ; aucun antagoniste n'a pu être identifié à ce jour. Le deuxième type de récepteur présente divers sous types définis selon l'affinité d'antagonistes ; ils réagissent surtout avec  $LTD_4$  et  $LTE_4$ .  $LTB_4$  se fixe sur deux types de récepteurs : 1)  $LTB_4$  IA récepteur de forte affinité sur les PMN impliqué dans le chimiotactisme, le chimiocinèse, l'adhérence, l'afflux de glucose, l'afflux de  $Ca^{++}$  intracellulaire et 2)  $LTB_4$  IB de faible affinité sur les PMN impliqué dans la libération d'enzymes et de radicaux libres (GOLDMAN D.W. et coll., 1984).

Le récepteur du  $LTB_4$  de la membrane des neutrophiles est associé à une protéine G liée au guanosine triphosphate (GTP) qui régule l'affinité du récepteur pour le ligand et transmet le signal (GOLDMAN D.W. et coll., 1984).

$LTD_4$  agit sur son récepteur en activant au moins deux protéines G. Cela entraîne la mobilisation de calcium par l'activation d'une PLC spécifique des phosphatidylinositols (CROOKE S.T. et coll., 1990). L'activation d'une PKC stimule une topoisomérase-I qui induit la transcription d'au moins un gène codant pour une protéine activatrice des phospholipases laquelle agit en particulier sur la  $PLA_2$  (CROOKE S.T. et coll., 1990).

## II- Activités biologiques des eicosanoïdes.

La répartition des eicosanoïdes dans l'organisme est ubiquitaire, leurs actions sont multiples et impliquées dans de nombreux processus physiologiques.

### II.1- Prostaglandines et thromboxane $A_2$ .

Ils sont synthétisés dans tous les tissus (sauf les hématies) et exercent leurs effets localement, étant formés en faible quantité et rapidement métabolisés.

#### II.1.1- Système cardiovasculaire.

Sur la fonction cardiaque, seule  $PGE_2$  semble capable d'accroître légèrement la contractilité du myocarde (EKLUND B. et coll., 1980). Les PGs modifient indirectement la fonction cardiaque suite à l'activation réflexe du système nerveux autonome engendrée par leurs effets hémodynamiques.

Sur la musculature des parois vasculaires,  $PGE_1$ ,  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  et oxo-6- $PGE_1$  induisent une relaxation et  $TxA_2$  en provoque toujours la contraction. L'action de  $PGF_{2\alpha}$  est variable (MONCADA S. et coll., 1980). Les parois vasculaires synthétisent presque exclusivement  $PGE_2$  et  $PGI_2$ .

#### II.1.2- Fonction plaquettaire.

$TxA_2$  synthétisé essentiellement par les plaquettes est un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire en agissant comme un ionophore du calcium (LAGES B. et coll., 1981).  $PGG_2$ ,  $PGH_2$  et  $PGE_2$  à faible concentration ont un effet pro-agrégant alors qu'à forte concentration, elles inhibent l'agrégation.  $PGE_1$ ,  $PGD_1$  mais surtout  $PGI_2$  et  $PGI_3$ , sont des inhibiteurs de l'agrégation (NEEDLEMAN P. et coll., 1979). De plus,  $PGI_2$  se caractérise aussi par sa capacité unique de provoquer la désagrégation des thrombi plaquettaires.

### II.1.3- Fonction rénale.

Le rein est un des organes qui a la plus grande capacité de synthèse et de catabolisme des PGs. Leurs actions sont déterminantes sur la fonction du rein: PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et oxo-6-PGE<sub>1</sub> contribuent entre autre à la libération de rénine; l'augmentation de l'excrétion urinaire d'eau et d'électrolytes est principalement assurée par PGE<sub>2</sub> qui antagonise l'action antidiurétique de la vasopressine au niveau du tube collecteur et qui inhibe la réabsorption de NaCl au niveau de la branche ascendante de Henle (PATRONO C. et coll., 1982).

### II.1.4- Système respiratoire.

L'acide arachidonique à faible concentration entraîne une vasodilatation pulmonaire alors qu'à des taux plus élevés il provoque une vasoconstriction. TxA<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub> se sont révélés de puissants bronchoconstricteurs. PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, agissent aussi dans le même sens mais de façon moins prononcée. PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> et oxo-6-PGE<sub>1</sub> exercent par contre un effet bronchodilatateur (SPANNHAKE E.W.M. et coll., 1981).

### II.1.5- Système gastrointestinal.

Sur la musculature du tractus gastro-intestinal, la résultante des actions opposées exercées par les PGs est une inhibition du tonus (WILSON D.E. et coll., 1981).

PGE<sub>2</sub> et PGI<sub>2</sub> sont de puissants inhibiteurs de la sécrétion d'acide chlorhydrique et de pepsine par l'estomac ; parallèlement, elles sont capables de stimuler la sécrétion de bicarbonate et de mucus (WILSON D.E. et coll., 1981).

Au niveau intestinal, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> provoquent l'accumulation intraluminaire d'eau et d'électrolytes (ROBERT A., 1976).

Indépendamment de leurs propriétés antisécrétoires à l'égard du HCl, les PGs exercent au niveau de l'estomac et de la portion supérieure du duodénum un effet cytoprotecteur contre de nombreuses substances irritantes et ulcératives

(ROBERT A., 1976).

### II.1.6- Système reproducteur.

Bien qu'encore imparfaitement défini, le rôle physiologique des PGs au niveau du système reproducteur paraît important. Entre autres activités, la biosynthèse des PGs augmente graduellement durant la grossesse pour atteindre un sommet durant le travail (MONCADA S. et coll., 1980).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et  $\text{PGE}_2$  sont connues pour leur effet abortif dès le deuxième trimestre de la grossesse et se sont avérées efficaces pour déclencher le travail au terme de la grossesse.

### II.1.7- Inflammation.

Tous les stimuli inflammatoires provoquent la synthèse de PGs (MALE D. et coll., 1987). Au cours d'inflammation, aiguë ou chronique, les principaux métabolites cyclooxygénasiques retrouvés sont  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  et  $\text{TxA}_2$ . Cependant, la nature des PGs présentes au site de l'inflammation dépend de la localisation du foyer enflammé et des mécanismes de défense mis en jeu par l'organisme. Par exemple, au cours de mastocytose,  $\text{PGD}_2$  est le principal métabolite cyclooxygénasique détecté dans le plasma et les urines. De plus, en fonction de la nature de l'agresseur, différents types de cellules sont stimulés. Ainsi, les neutrophiles sont une source majeure de  $\text{TxA}_2$ , les cellules tissulaires et les macrophages libèrent essentiellement  $\text{PGE}_2$ .

Les PGs produites au site de l'inflammation agissent plutôt comme des modulateurs que comme des médiateurs de l'inflammation. Une fois libérés, ces eicosanoïdes contribuent à la genèse des signes et symptômes de l'inflammation (PETTIPHER E.R. et coll., 1992).

En sensibilisant les terminaisons nerveuses afférentes aux stimulations douloureuses produites par diverses substances libérées au site de l'inflammation,  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGI}_2$  amplifient les phénomènes d'hyperalgésie. Par leur action vasoactive, les PGs et surtout  $\text{PGE}_2$  contribuent à provoquer l'érythème, la chaleur et l'oedème.

En cas de réaction allergique, les PGs peuvent être responsables de désordres :  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$  et  $\text{TxA}_2$  libérés par les tissus bronchiques,  $\text{PGD}_2$  libérée par les mastocytes sont de puissants bronchoconstricteurs. Toutefois, les inhibiteurs de la cyclooxygénase sont très souvent inefficaces dans le traitement de l'asthme en raison de l'inhibition parallèle de la synthèse de  $\text{PGE}_2$  bronchodilatatrice.

### II.1.8- Fièvre et infection.

La fièvre qui accompagne fréquemment les infections résulte de la production de pyrogènes endogènes, IL-1 et  $\text{TNF}\alpha$ , par les cellules phagocytaires en réponse à l'agent envahisseur (DUFF G.W., 1986). IL-1 et  $\text{TNF}\alpha$  stimulent certaines cellules endothéliales des capillaires du système nerveux central. Ces dernières produisent alors  $\text{PGE}_2$ . L'élévation de la concentration en  $\text{PGE}_2$  dans les centres hypothalamiques thermorégulateurs s'accompagne d'une élévation de la température corporelle. Cette élévation de température contribue à l'élimination naturelle des microorganismes infectants, stimule la prolifération de lymphocytes T auxiliaires tout en limitant l'action des lymphocytes T supresseurs et favorisant la réponse humorale primaire (DUFF G.W., 1986).

### II.1.9- Immunité.

Les PGs et principalement  $\text{PGE}_2$  jouent un rôle de régulateur de la réponse immune (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). Elles ont en général une activité immunosuppressive surtout in vitro et sont impliquées dans l'induction des cellules T immunosuppressives, dans l'inhibition des fonctions des monocytes-macrophages, dans l'inhibition de la production d'IL-1, d'IL-2 et de  $\text{TNF}\alpha$  et dans l'inhibition de la réponse humorale.

Parmi les cellules immunes, les monocytes-macrophages constituent la principale source de  $\text{PGE}_2$  (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). Stimulées, ces cellules libèrent aussi IL-1 et  $\text{TNF}\alpha$  (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). In vitro, l'activation des macrophages est diminuée, voire inhibée par  $\text{PGE}_2$ . Cet eicosanoïde est en particulier responsable d'une diminution et parfois d'une

suppression de la phagocytose (SCHNYDER J. et coll., 1979) et de la production d'IL-1 et de TNF $\alpha$  (KUNKEL S.L. et coll., 1986) (PETTIPHER E.R. et coll., 1992).

Ces cytokines jouent un rôle majeur dans le recrutement des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes aux sites de l'inflammation. Elles induisent aussi certaines actions procoagulantes sur les cellules endothéliales conduisant parfois au dépôt de fibrine, une caractéristique des réactions auto-immunes chroniques (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). De plus, ces cytokines causent de nombreux dommages tissulaires en favorisant la libération d'enzymes protéolytiques (PETTIPHER E.R. et coll., 1992).

PGE<sub>2</sub> inhibe aussi l'expression des molécules de classe II du CMH sur les macrophages et peut interférer dans la présentation de l'antigène aux cellules T (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). Par contre, IL-1 peut stimuler la production de PGE<sub>2</sub> (DINARELLO C.A. et coll., 1983).

Sur les cellules B, PGE<sub>2</sub> inhibe leur différenciation induite par les lymphocytes T stimulés par des mitogènes et la formation de plasmocytes (THOMPSON P.A. et coll., 1984). Elle serait aussi impliquée dans l'induction de la tolérance (SCHAD V.C. et coll., 1988).

Mais c'est surtout sur les cellules T que va s'exercer son activité immunosuppressive (PETTIPHER E.R. et coll., 1992). PGE<sub>2</sub> favorise en effet la prolifération de cellules suppressives CD8<sup>+</sup>. Ces dernières inhibent la production d'IL-2, cytokine indispensable dans la maturation des cellules T auxiliaires (CHOUAIB S. et coll., 1985). PGE<sub>2</sub> inhibe aussi l'expression du récepteur de la transferrine nécessaire à la prolifération des lymphocytes (CHOUAIB S. et coll., 1985). Elle est enfin impliquée dans la différenciation et/ou l'activation des thymocytes (GUALDE N. et coll., 1982).

Toutefois, dans certaines circonstances, les PGs peuvent stimuler la réponse immune. En fait, le site de production et la concentration en médiateurs produits sont déterminants sur les effets immunosuppressifs ou immunostimulants des PGs (PETTIPHER E.R. et coll., 1992).

## II.2- Leucotriènes.

Il convient de distinguer d'une part  $\text{LTB}_4$  et ses isomères et métabolites, d'autre part les peptidoleucotriènes qui constituent la "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (SRS-A).

### II.2.1- Système pulmonaire.

$\text{LTB}_4$ ,  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  et  $\text{LTE}_4$  provoquent la contraction du parenchyme pulmonaire (voies aériennes de faible calibre) avec un potentiel d'action de la SRS-A largement supérieur à celui de l'histamine.  $\text{LTC}_4$  est environ mille fois plus puissant que l'histamine (sur une base molaire) à produire une diminution du volume résiduel; de plus, la contraction induite par  $\text{LTC}_4$  est lente à se développer et persistante. L'action de  $\text{LTE}_4$  est plus faible mais de durée plus prolongée et semble, pour ces raisons, impliquée dans la bronchoconstriction durable de l'asthmatique (DAHLEN S.E. et coll., 1990).  $\text{LTC}_4$  et  $\text{LTD}_4$  sont aussi très actifs sur la trachée et les bronches et contractent les vaisseaux pulmonaires (DRAZEN J.M. et coll., 1980).  $\text{LTB}_4$  est moins actif sur les bronches et la trachée.

$\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$ ,  $\text{LTE}_4$  favorisent aussi la production de mucus (MARON Z. et coll., 1982). Ils sont reconnus comme de puissants médiateurs de l'inflammation et de l'hypersensibilité immédiate (SAMUELSSON B. et coll., 1987).

### II.2.2- Système cardiaque.

$\text{LTC}_4$  et  $\text{LTD}_4$  agissent sur la pression artérielle en induisant le plus souvent une hypertension conséquence de la constriction artériolaire générale initiale suivie d'une hypotension par hémococoncentration.  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  et  $\text{LTE}_4$  diminuent la contractilité cardiaque secondairement à la diminution du débit coronarien (DAHLEN S.E. et coll., 1981).

### II.2.3- Inflammation.

Les LTs sont synthétisés par les cellules participant aux processus inflammatoires. Ils sont retrouvés au sein des foyers inflammatoires ; LTB<sub>4</sub> y exerce essentiellement une action pro-inflammatoire et les peptidoleucotriènes agissent plus sur les vaisseaux (DAHLEN S.E. et coll., 1981).

LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> et LTB<sub>4</sub> augmentent la perméabilité vasculaire. En association avec PGE<sub>2</sub> vasodilatatrice, ils provoquent l'oedème (DAHLEN S.E. et coll., 1981). L'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par LTB<sub>4</sub> nécessite un temps de latence.

LTB<sub>4</sub> est surtout actif comme stimulateur de différentes fonctions leucocytaires liées à l'inflammation. En effet, LTB<sub>4</sub> est un agent chimiotactique puissant pour les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Il est aussi chimiocinétique (SAMUELSSON B. et coll., 1987). Au niveau cellulaire selon le type de récepteurs auquel il se lie sur les PMNL, l'action diffère comme cela a déjà été signalé. Son activité porte surtout sur la stimulation de la production d'anion superoxyde, sur la mobilisation du calcium intracellulaire, sur la dégranulation des PMNL en combinaison vraisemblablement avec le PAF et 5 HPETE. Il augmente aussi le taux d'AMPc dans les cellules, induit la libération d'enzymes lysosomiaux en présence de cytochalasine B et l'entrée d'hexoses dans la cellule (GOLDMAN D.W. et coll., 1984).

### II.2.4- Immunité.

Les LTs et plus particulièrement LTB<sub>4</sub> sont impliqués dans la régulation des réactions immunitaires (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992).

#### *a- Prolifération des lymphocytes .*

LTB<sub>4</sub> induit la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives et inhibe celle des CD4<sup>+</sup>. L'expression des activités suppressives des CD4<sup>+</sup> requiert la présence de monocytes (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1985). L'addition d'indométacine,

inhibiteur de la cyclooxygénase, à des cultures de cellules T et de monocytes, abolit dans certains cas l'effet immunosuppresseur (ROLA-PLESZCZYNSKI M., 1985) alors que dans d'autres, elle n'a aucun effet (GUALDE N. et coll., 1985). Cependant, les métabolites de la cyclooxygénase jouent un rôle important dans le mécanisme effecteur de LTB<sub>4</sub>.

Le contact de thymocytes immatures avec un antigène en présence de LTB<sub>4</sub> peut induire des cellules suppressives et donc une tolérance à l'antigène (DELEBASSEE S. et coll., 1988).

#### *b- Activité cytotoxique .*

LTB<sub>4</sub> module l'activité des cellules tueuses naturelles (NK) qui entraînent la lyse spontanée de certaines cibles cellulaires. LTB<sub>4</sub> augmente considérablement la cytotoxicité de ces cellules (BRAY R.A. et coll., 1986).

Les LTs induisent la libération de PGs et d'enzymes lysosomiaux par les macrophages et LTB<sub>4</sub> augmente la cytotoxicité médiée par les monocytes (GAGNON L. et coll., 1989) et favorise la liaison de ces cellules aux cellules cibles (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992).

#### *c- Production de cytokines .*

De nombreux effets des LTs sur la fonction des lymphocytes peuvent être amplifiés ou modulés par l'interaction LTs - monocyte/macrophage. Ces derniers synthétisent eux mêmes LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub>.

LTB<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> augmentent la production d'IL-1 par les monocytes stimulés par les LPS (GAGNON L. et coll., 1989) (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992). Cette production est aussi augmentée en présence de LTB<sub>4</sub> sur les monocytes humains adhérents ou les monocytes stimulés par des particules de zymosan (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992). LTB<sub>4</sub> accroît aussi la libération d'IL-6 par les monocytes (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992). Ces deux cytokines, IL-1 et IL-6, agissent en synergie pour induire la prolifération de thymocytes (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992).

LTB<sub>4</sub> module indirectement la production de cytokines en agissant sur les cellules T. LTB<sub>4</sub> augmente en particulier la production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et favorise ainsi la production d'IL-1 et/ou de PGE<sub>2</sub> par les monocytes.

LTB<sub>4</sub> augmente la production de TNF par les monocytes et les macrophages alors que de fortes concentrations de LTB<sub>4</sub> l'inhibent (GAGNON L. et coll., 1989) (ROLA - PLESZCZYNSKI M., 1992). LTB<sub>4</sub> peut donc influencer l'activité cytotoxique des monocytes humains en augmentant leur production de TNF, ou en l'inhibant.

### II.3- Les acides hydroxy- et hydroperoxy- eicosatétraénoïques.

#### II.3.1- Synthèse des eicosanoïdes.

15 HPETE, 12, 5 et 15 HETEs sont des inhibiteurs de la prostacycline synthétase. Une exposition prolongée aux HETEs peut compromettre les activités antithrombotique et vasodilatatrice de l'endothélium en réduisant la capacité de synthèse de PGI<sub>2</sub> (MAYER B. et coll., 1986) (HADJIGAPIOU C. et coll., 1986).

5 HPETE stimule la 5 lipoxygénase des PMNL du rat (RIENDEAU D. et coll., 1986).

Dans les macrophages péritonéaux de souris, 12 et 15 HPETEs sont des inhibiteurs irréversibles de la cyclooxygénase et des inhibiteurs réversibles de la 5 lipoxygénase. De plus 15 et 12 HETEs dans ces mêmes cellules inhibent réversiblement ces deux voies (HUMES J.L. et coll., 1986).

L'apport exogène de 15 HETE à des PMNL de lapin (VANDERHOEK J.Y. et coll., 1980b), à des cellules T humaines (GOETZL E.J., 1981), à des éosinophiles humains (CASHMAN J.R. et coll., 1988) stimulés ou non par du ionophore A 23187 inhibe la 5 lipoxygénase. GOETZL E. J. (1981) montre que ni la production de 11 HETE, ni celle de PGE<sub>2</sub> ne sont par contre modifiées dans les cellules T. L'activité inhibitrice du 15 HPETE est plus importante que celle du 15 HETE sur les éosinophiles (CASHMAN J.R. et coll., 1988).

12 HPETE peut stimuler la 5 lipoxygénase des PMN (MACLOUF J. et coll.,

1982) et ne semble pas avoir d'action sur celle des monocytes (BIGBY T.D. et coll., 1989).

### II.3.2- Libération d'histamine.

5 HETE, 5 HPETE et 12 HETE provoquent la libération d'histamine par les basophiles humains stimulés par des IgsE (PETERS S.P. et coll., 1981).

### II.3.3- Peau et psoriasis.

La formation de 15 HETE est une voie de régulation importante de l'activité dermique. Sa défection contribue au développement du psoriasis associé à une production accrue de 5 et 12 HETEs (KRAGBALLE K. et coll., 1986).

### II.3.4- Inflammation.

Tous les HETEs sont chimiotactiques pour les neutrophiles. Parmi eux, 5 HETE est le plus puissant (MALMSTEN C.L., 1984).

D'après KUHN H. et coll. (1990 b), l'oxygénation des membranes biologiques par la 15 lipoxygénase initie la dégranulation d'organelles intracellulaires au cours de la maturation des hématies. De même, CONRAD D.J. et coll (1992), supposent que 15 HETE des monocytes dégrade certains organelles au cours de la différenciation cellulaire et/ou de la phagocytose. Dans les monocytes, 15 HETE peut induire l'oxydation de LDL (CONRAD D.J. et coll., 1992).

### II.3.5- Immunité.

Les effets des H(P)ETES sont similaires à ceux de LTB<sub>4</sub> sur les NK (BRAY R.A. et coll., 1986) et les cellules T (GUALDE N. et coll., 1983 a). De plus, 15 H(P)ETE inhibe la production polyclonale d'Igs (GUALDE N. et coll., 1983 b).

## II.4- Lipoxines, hépoxilines et acides époxyeicosatriénoïques.

Leurs actions pharmacologiques sont encore mal définies.

### II.4.1- Lipoxines.

La lipoxine A stimule la production d'anion superoxide dans les neutrophiles. C'est un agent chimiotactique qui possède aussi une activité spasmogène (SAMUELSSON B. et coll., 1987). Elle élève le taux de calcium intracytoplasmique des neutrophiles (MOORES K.E. et coll., 1991) et apparait comme un activateur de la protéine kinase C (HANSSON A. et coll., 1986).

### II.4.2- Hépoxilines.

Elles augmentent le transport et la mobilisation du calcium intracellulaire (DHO S. et coll., 1990) et stimulent la libération d'insuline (PACE - ASCIAK C.R. et coll., 1984).

### II.4.3- Acides époxyeicosatriénoïques.

Les EETs sont doués de propriétés vasodilatatrices (CARROLL M.A. et coll., 1987). 14R-15S cis EET inhibe la cyclooxygénase et l'agrégation plaquettaire (MALCOM K. et coll., 1990).

## **SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

## MATERIELS ET METHODES

### A/ MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'OBTENTION DES MONOCYTES HUMAINS.

#### I- Solutions et matériels.

##### I.1- Tubes de prélèvement.

Le sang est collecté dans des Diatube<sup>R</sup> H (Diagnostica Stago) contenant un mélange citrate de sodium/acide citrique (0,109M) supplémenté en théophylline, adénosine et dipyridamole.

##### I.2- Nycoprep<sup>TM</sup>.

Le Nycoprep 1.068 (Nycomed Pharma A.S.) permet la séparation cellulaire en gradient de densité. Les monocytes sont retrouvés dans la phase intermédiaire.

##### I.3- Solution antiagrégante.

Cette solution que nous appelons CATCH pour des raisons de commodité dans la suite de notre étude a la formule 1.

##### I.4- Solutions de lavage.

##### I.4.1- Solution d'EDTA et de sérum de veau foetal.

Cette solution est constituée de 1ml de sérum de veau foetal (SVF), de 0,13g d'EDTA disodique et complétée à 100ml par une solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000.

## FORMULE 1 : CATCH.

Solution saline de Hank's sans calcium et sans magnésium : 500 ml  
Adénosine : 133,60 mg  
Théophylline : 180,17 mg  
Citrate trisodique dihydraté : 1,900 g  
Albumine de sérum bovin, fraction v : 17,500 g  
Tampon HEPES : 2,975 g  
Eau distillée: quantité suffisante pour 600 ml

## FORMULE 2 : PBS 10X.

Chlorure de sodium : 1,38 mM  
Chlorure de potassium : 27,00 mM  
Phosphate disodique, hydraté : 81,00 mM  
Phosphate monopotassique : 14,70 mM

#### I.4.2- Solution saline de phosphate.

Le pH de cette solution saline, PBS 10X (formule 2), est ajusté à 7,4. Avant toute utilisation, elle est rendue isotonique aux cellules par une dilution au dixième (PBS 1X).

## II-METHODES.

### II.1- Principe de la procédure de séparation.

Les monocytes ont une densité moyenne inférieure aux lymphocytes mais la densité de certaines sous populations de ces deux types cellulaires se chevauche (Figure 23). Il est donc possible d'établir une séparation satisfaisante de haute reproductibilité, basée seulement sur les différences de densité. Les laboratoires Nycomed Pharma préconisent l'emploi de Nycoprep 1.068 légèrement hypertonique. Tout en gardant constante la densité, le Nycoprep 1.068 modifie l'osmolalité du gradient moyen. En augmentant l'osmolalité, les cellules expulsent de l'eau, et leur densité augmente en parallèle. Les lymphocytes plus sensibles que les monocytes sédimentent plus lors de la centrifugation, laissant les monocytes au dessus du gradient.

II.2- Procédure de séparation préconisée par les laboratoires commercialisant le Nycoprep 1.068.

Le sang est collecté dans des tubes d'EDTA. Dix parties sont mélangées avec une partie de solution de dextran 500 à 6% dans du chlorure de sodium à 9 pour 1000. Après la sédimentation des hématies à température ambiante pendant 40mn, la couche plasmatique supérieure riche en leucocytes est récupérée. 5ml de ce plasma riche en leucocytes sont alors déposés sur 3ml de Nycoprep 1.068 dans un tube de 14 mm de diamètre et sont centrifugés 15 mn à 20 °C et 600 g. La centrifugeuse utilisée est une JOUAN CR 312. La phase intermédiaire est alors collectée et lavée deux fois par une solution d'EDTA et de SVF. Après chaque

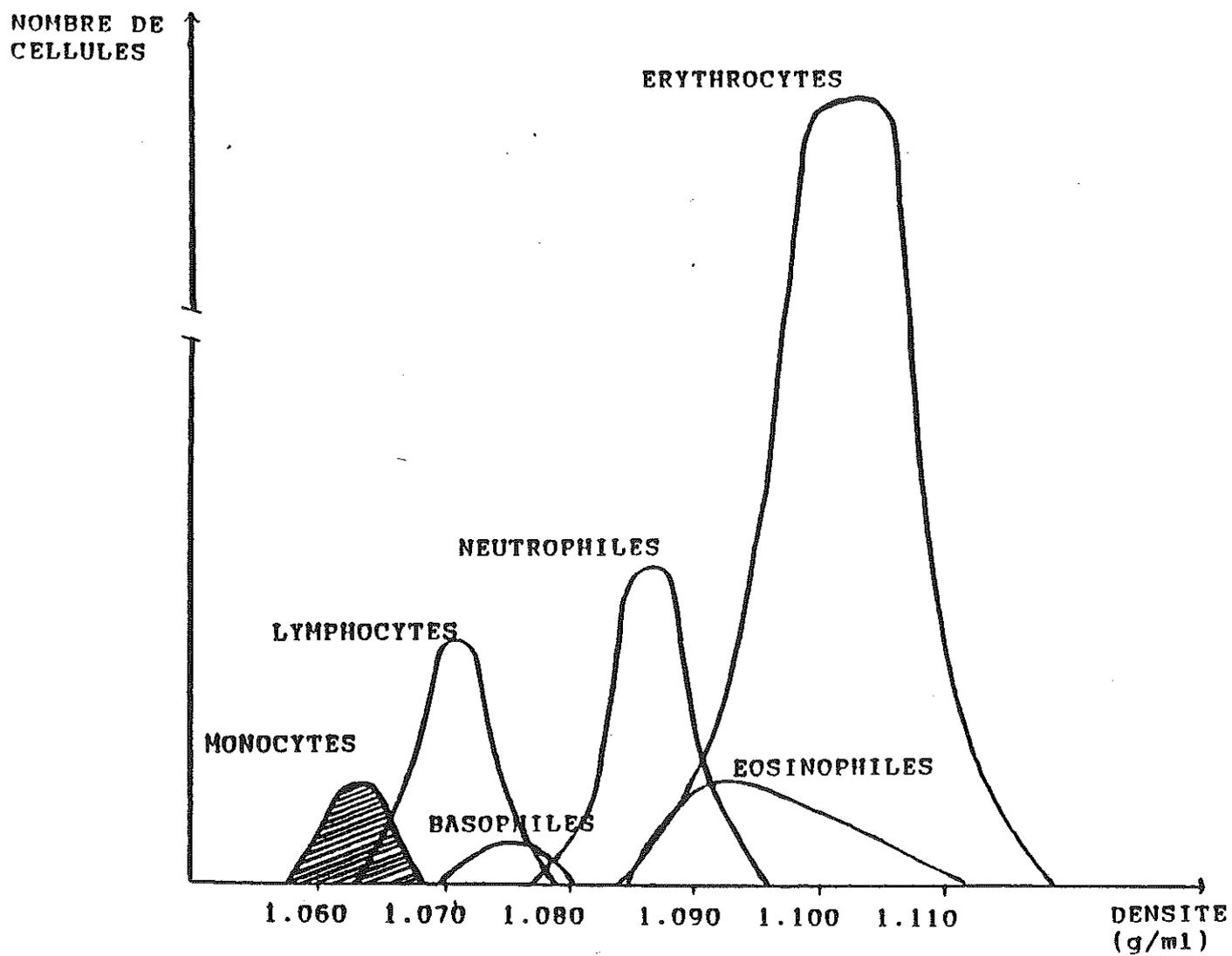


Figure 23 : Densité des divers éléments figurés sanguins.

lavage, la suspension cellulaire est centrifugée 10mn à 4°C et 600 g. Afin d'éliminer les plaquettes, les cellules reprises dans 1ml de solution de Hanks sans calcium ni magnésium (Gibco) sont déposées sur 3ml de Nycoprep 1.063 et centrifugées 15 mn à 4°C et 350g. Les monocytes récupérés dans le culot sont alors lavés par une solution d'EDTA et de SVF selon les mêmes modalités que précédemment.

### II.3- Mise en application de la méthode de Pawlowsky.

Cette technique (PAWLOWSKY N.A. et coll., 1983) reprise dans de nombreux travaux propose après les étapes d'extraction et de lavage d'incuber deux fois 15mn à 37°C les monocytes en présence de sérum contenant 5mM d'EDTA. Après incubation, les cellules sont centrifugées 7mn à 23°C et 350 g.

### II.4- Emploi de Diatube et de CATCH.

Le sang est prélevé directement sur Diatube contenant des inhibiteurs de l'activation et de la libération plaquettaire. Le citrate de sodium contenu dans ces tubes est connu pour ses propriétés chélatrices du calcium extracellulaire (un facteur indispensable à l'activation plaquettaire). La théophylline, l'adénosine et le dipyridamole augmentent la concentration en AMPc dans les plaquettes favorisant ainsi la séquestration de  $Ca^{++}$  plaquettaire dans le compartiment de stockage et inhibant par ce biais de nombreuses fonctions plaquettaires. La théophylline, in vitro, inhibe une phosphodiesterase tandis que le dipyridamole, in vitro, et l'adénosine agissent en synergie et activent une adényl-cyclase membranaire.

Le sang collecté est alors mélangé à volumes égaux à une solution de CATCH, possédant approximativement les mêmes composants que ceux renfermés dans le diatube et étant enrichie en albumine, protéine principale du plasma sanguin très employée en thérapeutique dans la restauration de la volémie et aussi connue pour ses propriétés nutritives et sa capacité à fixer certains ligands toxiques pour les cellules.

5ml de sang sont alors déposés sur 3ml de Nycoprep 1.068 et centrifugés à 500 g à 20°C pendant 15mn. La partie intermédiaire est alors lavée deux fois par une solution de CATCH 10mn à 4°C et 120 g. Le culot est ensuite lavé une première fois 10mn à 4°C et 140 g dans du PBS 1X puis une deuxième fois à 280 g.

## B/ CARACTERISATION DES MONOCYTES ISOLEES.

### I- Numération cellulaire et viabilité.

Les cellules sont numérées sur cellule de Malassez après dilution à moitié dans du bleu Trypan à 0,14 %.

### II- Identification.

Elle est réalisée par coloration au MGG et par la réaction des estérases non spécifiques à l' $\alpha$ -naphtyl acétate avec et sans fluorure de sodium.

## C/ ETUDE ANALYTIQUE DES METABOLITES LIPOXYGENASIQUES.

### I- Appareillages et produits.

#### I.1- Spectrophotométrie.

La spectrophotométrie d'absorption est basée sur le principe de la proportionnalité entre l'intensité lumineuse absorbée par une solution et la concentration de cette solution en substance absorbante. Ce principe est exprimé par la loi de Beer Lambert.

$$DO = \log I_0/I_t = \epsilon l C$$

DO : densité optique ou absorbance

$I_0$  : intensité du faisceau lumineux à l'entrée de la solution

$I_t$  : intensité du faisceau lumineux

$C$  : concentration du corps absorbant

$l$  : épaisseur totale traversée

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire ou coefficient d'extinction spécifique; il dépend de la nature du corps absorbant, de la longueur d'onde et de la température.

L'appareil utilisé pour réaliser ces mesures est un HEWLETT PACKARD 8450A.

## I.2- Chromatographie.

La chromatographie est une technique de séparation fondée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases non miscibles: la phase stationnaire, soit solide en chromatographie sur couche mince (CCM), soit liquide en chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la phase mobile liquide. Des différences d'affinité des divers constituants pour chacune des deux phases, résultent des différences de vitesse de migration des composés et donc une possibilité de les séparer.

### I.2.1- HPLC

Dans ce type d'analyse, chaque substance du mélange après avoir été déposée au sommet de la colonne est entraînée par la phase mobile hors de la phase stationnaire pour être identifiée dans l'éluat.

#### *a- Appareillage (Schéma 9 et 10).*

Il est constitué de:

- trois réservoirs de phase mobile étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants et leur contamination par les vapeurs d'eau de l'atmosphère;
- une pompe Merck 655 A-71; elle assure un écoulement à vitesse linéaire de la

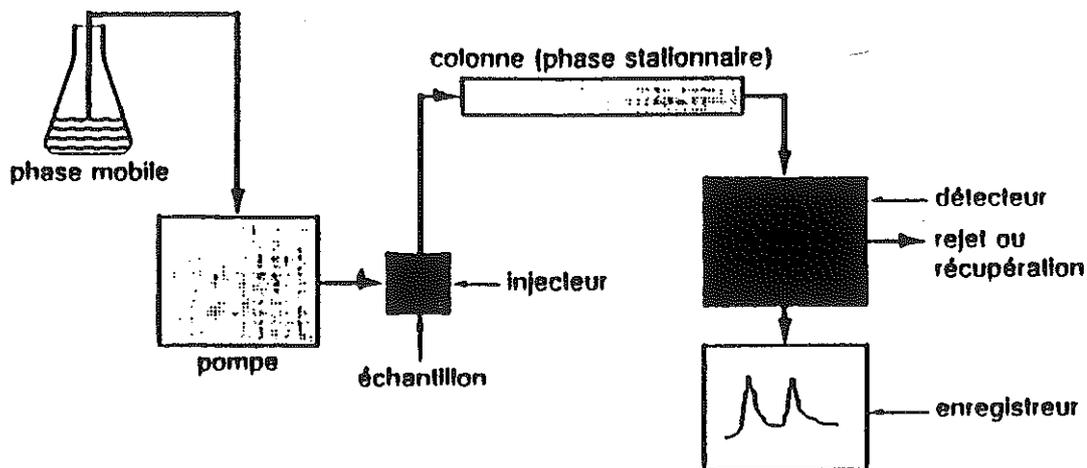


Schéma 9 : Les composants d'un chromatographe liquide à haute pression.

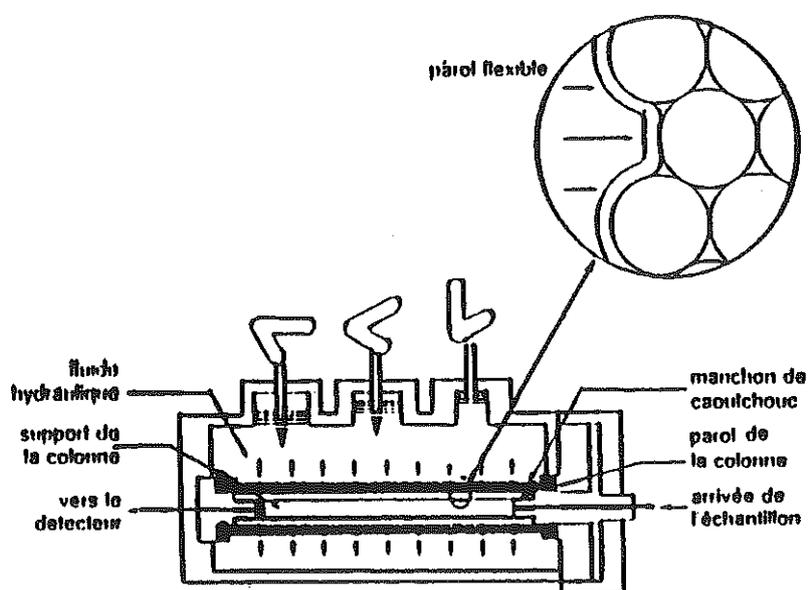


Schéma 10 : Appareillage de réduction du temps mort; colonne de matière plastique soumise à une pression radiale.

phase mobile;

- un injecteur et un système d'injection (655a-11);
- une précolonne Résolve C18 Guard Pack (Waters);
- une colonne Résolve C18 de 100 mm de long (Waters); les particules de silice font 5  $\mu\text{m}$  de diamètre; cette colonne est maintenue sous une pression radiale mécanique de 17mPa assurée par un module RMC8 10 Waters;
- un spectrophotomètre UV de détection et un enregistreur qui suivent en continu la présence des composés dans la phase mobile au fur et à mesure de leur élution.

*b- chromatographie de partage à polarité de phase inversée.*

La phase stationnaire est liquide. Elle constitue une gaine à forte concentration en éluant secondaire de la phase mobile, au contact d'une greffe par liaison covalente dans les pores de silice.

La nature des greffes conditionne la polarité de la phase stationnaire. La méthode de greffage utilisée conduit à la formation de liaisons  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{R}_3$  thermiquement stables et peu hydrolysables en milieu aqueux ou organique. Elle consiste à faire réagir un chlorosilane sur les groupements silanols très réactifs de la silice.

En chromatographie de partage à polarité de phase inversée, les molécules greffées sont apolaires. Ce sont en particulier des chaînes hydrocarbonées, alkyl C18 et/ou C8. La phase mobile est polaire. Ainsi, le constituant le moins polaire (acétonitrile) de la phase éluante s'adsorbe préférentiellement à la surface des chaînes hydrocarbonées et plus le solvant d'élution est riche en eau, plus la rétention de ces composés est importante.

*c- Paramètres chromatographiques d'un soluté.*

Si la quantité d'échantillons injectés est suffisamment petite, la phase stationnaire n'est pas saturée et la distribution est dite régulière. Alors chaque composé élué est détecté par l'observation d'un pic symétrique et gaussien (Figure 24). Ce pic est caractérisé par son temps de rétention  $t_r$  (temps compris

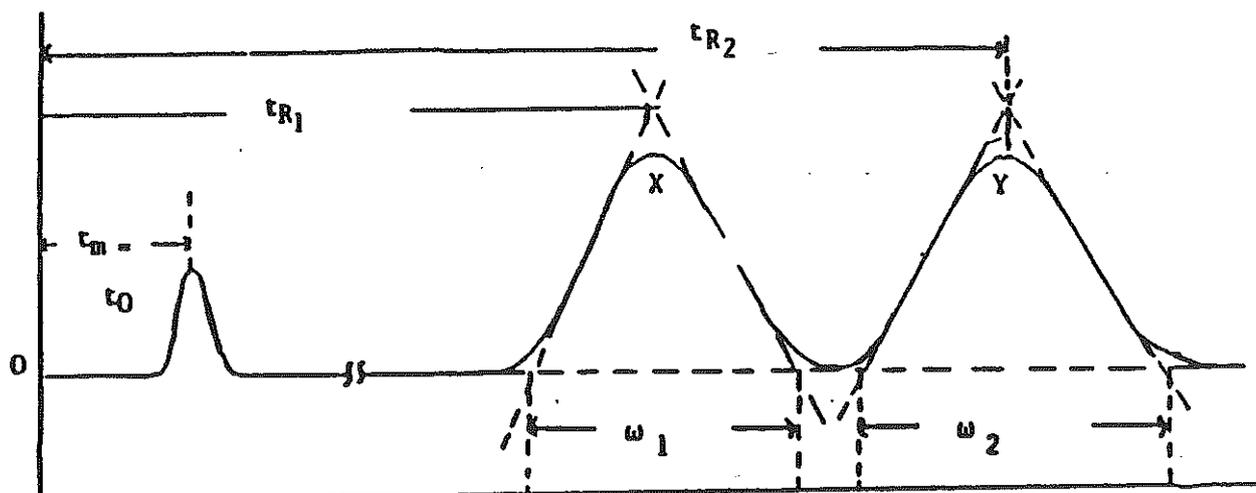


Figure 24 : Exemple de chromatogramme d'un échantillon.

$t_{r1}$  et  $t_{r2}$  : temps de rétention de composés élués

$t_m$  : temps mort du système chromatographique

$\omega_1$  et  $\omega_2$  : largeur des pics chromatographiques X et Y à leur base

FORMULE 3: Solvant de migration pour CCM.

Acétate d'éthyle : 110 ml

Isooctane : 50 ml

Acide acétique : 20 ml

Eau distillée : 100 ml

entre le moment de l'injection et le sommet du pic). Le  $t_r$  d'un composé inerte, traversant la colonne chromatographique à la vitesse du solvant vecteur, définit le temps mort  $t_m$  du système chromatographique. Le temps de rétention corrigé  $t_r'$  d'un soluté se calcule par l'équation  $t_r' = t_r - t_m$ .

Si la distribution est régulière, l'équilibre établi entre les deux phases peut être décrit au moyen d'une constante dépendante de la température qui est le coefficient de partage, coefficient de partition :  $k = C_s/C_m$  ( $C_s$  et  $C_m$  désignant respectivement la concentration du soluté dans des volumes identiques de la phase stationnaire et de la phase mobile). Le facteur de capacité  $k'$  est souvent utilisé pour caractériser la rétention d'un composé :  $k' = t_r'/t_m$ .

#### *d- Paramètres chromatographiques de la colonne.*

L'efficacité d'une colonne est exprimée par le nombre de plateaux théoriques. Il faut considérer la colonne chromatographique comme composée d'une série de couches horizontales continues et étroites appelées plateaux théoriques. Dans chaque plateau s'établit un équilibre du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile qui vérifie la loi de la conservation de la matière. La migration du soluté et du solvant est donc réalisée par une suite d'équilibres d'un plateau à l'autre. L'efficacité de la séparation chromatographique augmente avec le nombre d'équilibres réalisés et par conséquent avec le nombre de plateaux théoriques  $N$ . Si  $L$  est la longueur de la colonne utilisée, un deuxième paramètre peut décrire l'efficacité de la séparation et donc de la colonne; c'est la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT). HEPT et  $N$  dépendent non seulement de la nature des phases, de la géométrie de la colonne mais également de tous les facteurs susceptibles d'influencer les équilibres :

Une colonne est d'autant plus efficace que  $N$  est grand;  $N = 16 (t_r/\omega)^2$  avec  $\omega$  la largeur du pic chromatographique à sa base définit comme la distance entre les tangentes au point d'inflexion avec la ligne de base. HEPT mesuré est égal à  $L/N$ .

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs, il

faut se référer au facteur de sélectivité ou rétention relative définie par  $\alpha$  :

$\alpha = (tr_2 - tm) / (tr_1 - tm)$  avec  $tr_1$  et  $tr_2$  les temps de rétention respectifs du composé le moins retenu et celui le plus retenu. Pour séparer les composés 1 et 2, il faut que  $\alpha$  soit différent de 1.

L'aptitude de la colonne à séparer deux solutés donnant des pics voisins est caractérisée par la résolution de la colonne R:

$$R = 2 (tr_2 - tr_1) / (\omega_1 + \omega_2)$$

$$R = N^{1/2} / 4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times k_2 / (k_2 + 1)$$

Pour améliorer la résolution et obtenir une durée d'analyse acceptable, il est possible de jouer sur la nature et la composition de la phase mobile, d'où l'intérêt analytique de l'élution graduée c'est à dire de l'augmentation graduelle du pourcentage de solvant ayant une force d'élution la plus élevée.

### I.2.2- CCM.

L'originalité de la CCM tient au fait que la phase stationnaire (gel de silice) est déposée en un film adhérent de faible épaisseur sur une surface rigide. Les plaques utilisées sont des Macherey Nagel SIL G-25, préalablement lavées au méthanol.

#### *a- Solvant de migration.*

Après avoir saturé le solvant en eau dans une ampoule à décanter seule la phase organique est conservée. La solution préparée comme indiquée dans la formule 3 est placée dans la cuve de migration 30 mn à 1 H avant l'analyse dans le but de saturer la cuve afin d'obtenir une migration uniforme du solvant.

#### *b- Dépôt.*

Il est réalisé en ligne à 2 cm du bord inférieur et séché rapidement afin de limiter les phénomènes de diffusion.

### *c- Révélation.*

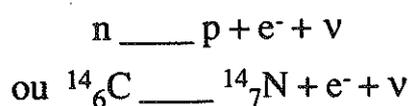
La révélation des corps gras insaturés est assurée par une exposition de quelques minutes aux vapeurs d'iode. Les composés apparaissent sous forme de taches brunes après réaction de l'iode sur les double liaisons. La réaction est réversible.

### I.3- Carbone 14 et acide arachidonique 1-C<sup>14</sup>.

#### I.3.1- Transformations radioactives.

Un atome est un ensemble électriquement neutre caractérisé par le nombre d'électrons  $Z$  qui gravitent autour du noyau et par le nombre de nucléons  $A$  qui constituent le noyau. Dans la nature, il existe un nombre limité d'éléments stables tel que le carbone  $Z = 6$  et  $A = 12$  et l'azote  $Z = 7$  et  $A = 14$ . Les autres atomes sont radioactifs.

Le carbone 14 ( $Z = 6$  et  $A = 14$ ) apparaît naturellement dans la haute atmosphère. Il émet des particules  $\beta^-$ . L'excès du nombre de neutrons par rapport au nombre de protons conduit à la transformation spontanée d'un neutron  $n$  en proton  $p$  selon le mécanisme réactionnel suivant:



Au cours de la transformation radioactive, il y a émission de deux particules, un électron ( $e^-$  ou  $\beta^-$ ) et un antineutrino ( $\nu$  ou particule de masse).

#### I.3.2- Cinétique des transformations radioactives.

La désintégration radioactive d'un noyau atomique est un phénomène aléatoire dont on peut définir la probabilité de survenue dans le temps. Cette probabilité est un paramètre caractéristique de chaque noyau radioactif et indépendant de la température, de la pression, et de la combinaison dans laquelle l'élément peut être engagé. Sa dimension est l'inverse du temps, son appellation la constante

radioactive, son symbole  $\lambda$ . Pour  $^{14}\text{C}$ ,  $\lambda$  est égal à  $1.21 \cdot 10^{-4} \text{ an}^{-1}$ .

#### *a- Activité.*

Soit  $Nt$  le nombre moyen d'atome de  $^{14}\text{C}$  à l'instant  $t$ ,  $\lambda N dt$  atomes se désintègrent pendant l'intervalle de temps  $dt$ .  $\lambda N$  est défini comme l'activité exprimée en Becquerel (Bq) qui correspond au nombre de désintégrations par seconde. L'activité est l'unité utilisée pour exprimer la quantité de radioéléments.  $3.7 \cdot 10^{10}$  désintégrations par seconde correspondent à 1 Curie (Ci).

#### *b- Décroissance radioactive - Période.*

Le nombre d'atomes radioactifs  $N$  décroît exponentiellement avec le temps:  
 $N = N_0 e^{-\lambda t}$  ( $N_0$  étant le nombre d'atomes radioactifs au temps zéro).

La période  $T$  est le temps au bout duquel le nombre d'atomes radioactifs a diminué d'un facteur 2:  $T = \ln 2 / \lambda$ . Pour l'atome  $^{14}\text{C}$ ,  $T$  est égal à 5730 ans (Figure 25).

#### 1.3.3- Particules $\beta^-$ .

Ce sont des électrons non monoénergétiques, distribués selon un spectre caractéristique du nuclide.

Dans la matière, ces particules subissent un grand nombre de collisions au cours de leur déplacement, avec de faibles pertes d'énergie. Elles peuvent céder leur énergie par petites fractions au cours de chocs avec les électrons des atomes qui se trouvent alors excités ou ionisés.

Au voisinage d'un atome, la particule  $\beta^-$  subit un changement de direction et un freinage. Elle perd ainsi une partie de son énergie qui est rayonnée sous forme de photons. Ces photons constituent le rayonnement de freinage dont le spectre d'énergie est constitué de 0 à  $E_{\text{max}}$  du  $\beta^-$  (Figure 26). Ce phénomène est d'autant plus important que  $\beta^-$  est plus énergétique et que la matière est de  $Z$  plus élevé.

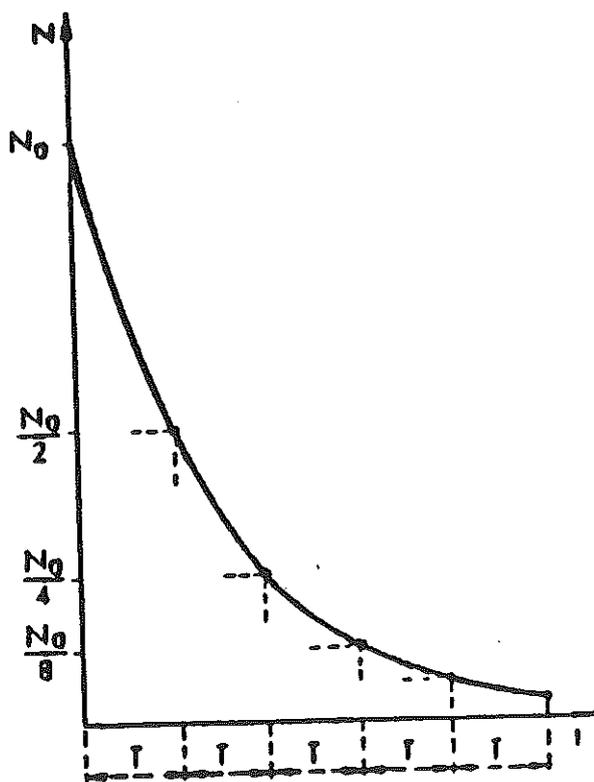


Figure 25 : Courbe de décroissance radioactive en fonction du temps.

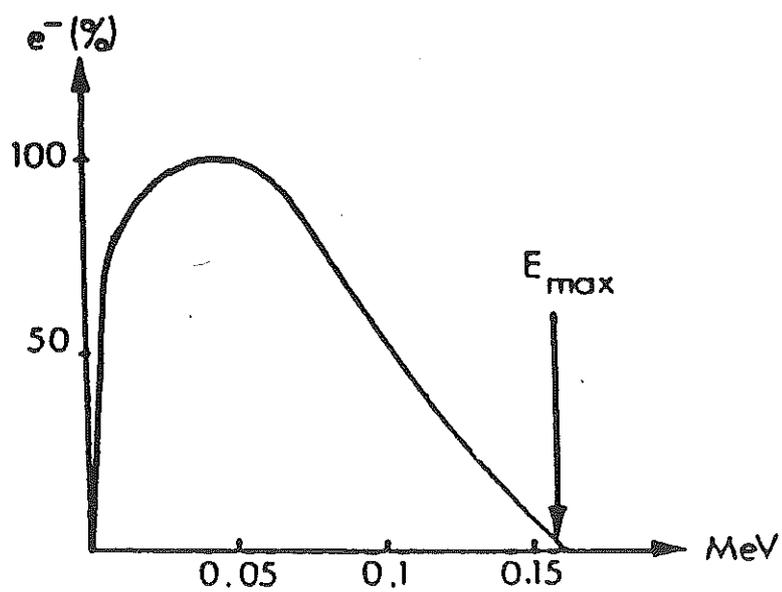


Figure 26 : Spectre  $\beta^-$  du  $^{14}\text{C}$ .

#### I.4- Détecteurs de rayonnement $\beta^-$ .

##### I.4.1- Dénombrement des rayonnements.

###### *a- Perte de comptage.*

Dans un détecteur, l'effet physique observé dépend du nombre de particules qui y ont subi une interaction. Or, toutes les particules émises par une source ne sont pas prises en compte par perte de comptage par coïncidence ou pour des raisons purement géométriques. De plus, le rayonnement peut subir des interactions avec d'autres matériaux que le détecteur et il convient de tenir compte du temps de résolution de l'appareil.

###### *b- Statistique de comptage.*

L'émission d'un rayonnement et son interaction avec la matière étant des phénomènes aléatoires, la fréquence de répartition des comptages d'une même source radioactive se distribue selon une loi de Poisson centrée sur la moyenne des comptages.

###### *c- Bruit de fond.*

Le bruit de fond est susceptible de fausser les résultats. Il est dû aux électrons arrachés par effet thermoionique, à la radioactivité des composants du détecteur et aux rayonnements cosmiques.

##### I.4.2- Analyseur linéaire LB-2832 Berthold.

Il s'agit d'un compteur proportionnel utilisant l'ionisation pour détecter les rayonnements  $\beta^-$ .

### *a- Principe et appareillage.*

Ce type de détecteur est composé d'une enceinte contenant un gaz (argon et 10% de méthane) placé dans un champ électrique (1530 Volts). L'ionisation de ce gaz, sous l'effet des radiations ionisantes  $\beta^-$ , produit des paires d'ions constituées chacune d'un électron et d'un ion positif. Un champ électrique étant appliqué au sein du gaz, les électrons peuvent être collectés par une anode centrale. Ils provoquent alors une impulsion de tension et la radiation est détectée. Selon la tension appliquée entre les électrodes, différents régimes de fonctionnement sont envisageables. Dans le cas d'un compteur proportionnel, le champ électrique est suffisamment fort pour que les ions primaires formés, en fait les électrons, aient une énergie suffisante pour ioniser d'autres atomes de gaz. Il se produit une amplification gazeuse. Le nombre d'ions secondaires créés reste limité et l'avalanche qui apparaît autour de l'anode centrale reste localisée à proximité de la trajectoire de l'ion primaire. Ce type de compteur permet de dénombrer les particules émises par le composé ayant migré sur une plaque de CCM (25cm de long sur 1.5cm de large) en mesurant l'énergie de rayonnement absorbée par le gaz.

### *b- Précautions particulières.*

Dans l'air, à la pression atmosphérique, la portée des particules  $\beta^-$  n'est que de 0.5mm. De plus, ces particules irradient dans toutes les directions. Pour obtenir de bons résultats, la plaque chromatographique doit être positionnée aussi près que possible de la fenêtre.

## I.4.3- Détecteurs à scintillation.

### *a- Principe et appareillage.*

Le détecteur à scintillation est composé d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur.

Le scintillateur est constitué d'un solvant, l'Ultima-Flo M, dans lequel est mis une substance fluorescente. La source dont on mesure la radioactivité est placée dans le solvant. L'énergie  $\beta$  est cédée aux molécules du solvant qui passent à un état excité. Cette excitation est transmise aux molécules du solvant qui restituent l'énergie ainsi absorbée sous forme de photons lumineux.

Le scintillateur est couplé optiquement à un photomultiplicateur composé d'une cellule photoélectrique qui transforme les photons émis par le scintillateur en électrons. Le courant ainsi obtenu est ensuite amplifié par un multiplicateur d'électrons. L'intensité du courant collecté est finalement proportionnelle à l'énergie perdue par le rayonnement. Les détecteurs à scintillation permettent de dénombrer le rayonnement et d'en mesurer l'énergie.

#### *b- Phénomène d'affaiblissement des scintillations.*

La diminution du rendement lumineux ou quenching peut être due à la composition du scintillateur ou à la présence de substances non fluorescentes, en particulier d'oxygène. Cela se traduit par l'inhibition ou la destruction d'états excités conduisant à des réactions non radioactives et/ou par l'absorption des photons émis. La conséquence du quenching est une diminution de l'efficacité de comptage aux basses énergies et un décalage du spectre vers les basses énergies.

## **II- Mise au point de l'étude analytique.**

### **II.1- Analyse spectrophotométrique.**

#### **II.1.1- Spectre des leucotriènes et des HETEs.**

Les produits de la voie de la lipoxygénase peuvent être détectés en absorbance UV grâce à la présence de double liaisons conjuguées. Deux grands groupes de composés sont définis:

- les HETEs et les HPETEs possèdent un système diène conjugué dans leur structure. Tous présentent une absorption maximale à 235nm (Figure 27) avec un

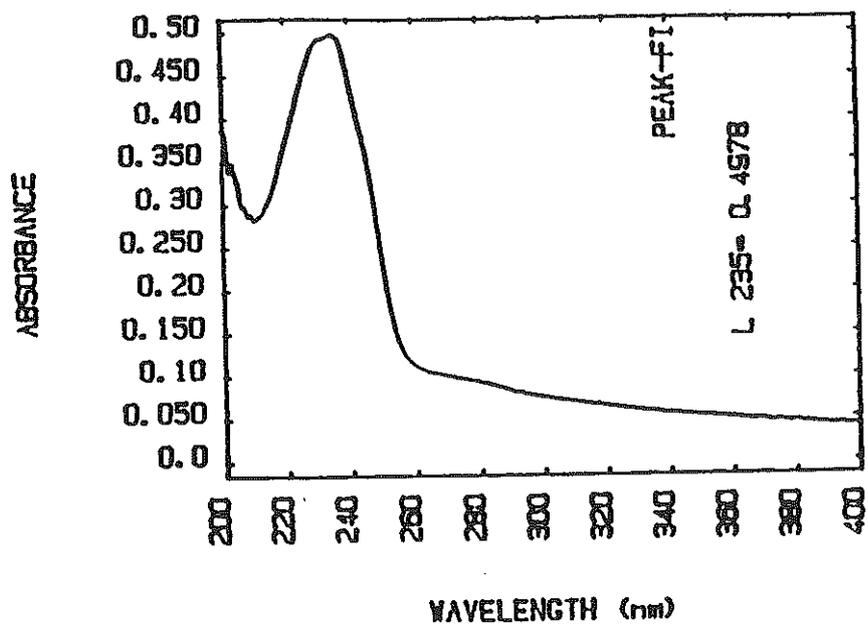
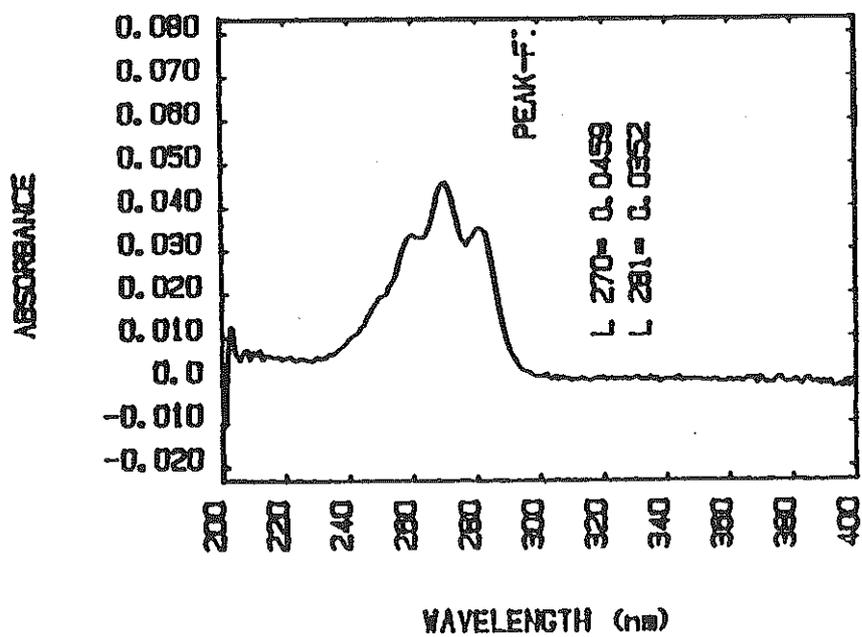


Figure 27 : Spectre UV du 15 HETE.

Figure 28 : Spectre UV de LTB<sub>4</sub>.

coefficient d'extinction de 29500 (POWELL W.S., 1987).

- les leucotriènes et leurs isomères possèdent un système triène conjugué avec trois absorptions maximales avoisinant 260, 270 et 280nm (Figure 28) et un coefficient d'extinction de 40000 (POWELL W.S., 1987).

En analyse, la détection des HETEs et des LTs est réalisée à 235 et 280 nm.

### II.1.2- Spectre du standard interne : PGB<sub>2</sub>.

En absence de double liaisons conjuguées, les PGs n'absorbent la lumière UV qu'à de faibles longueurs d'onde: 195-205nm. Toutefois, la PGB<sub>2</sub> absorbe aussi à 280nm mais cette absorption ne peut être détectée par le spectrophotomètre.

### II.1.3- Etude qualitative.

L'acide arachidonique, les leucotriènes et en particulier les peptidoleucotriènes, l'ionophore sont des produits très sensibles aux variations de température. Ils doivent être conservés à -20°C et le ionophore doit être préservé des rayonnements lumineux. Malgré toutes les précautions prises, il arrive que ces produits se dégradent. L'acide arachidonique en particulier s'autooxyde très rapidement donnant des HPETEs. L'analyse spectrophotométrique permet d'apprécier la pureté des réactifs. Les figures 29 et 30 proposent les spectres d'acide arachidonique pur et d'acide arachidonique autooxydé.

## II.2- CCM et TLC- analyseur linéaire.

La CCM permet d'établir rapidement l'état qualitatif des échantillons. Les distances de rétention sont exprimées par le rapport entre les longueurs parcourues depuis la ligne de départ (2cm du bord) par le centre de la tache de la substance analysée  $d_x$  et par le front des solvants  $d_s$ ;  $RF = d_x / d_s$ . Elles sont caractéristiques du composé et du solvant de migration.

L'acide arachidonique auto-oxydé donne de nombreux spots à la révélation alors que le produit pur n'en donne qu'un de RF avoisinant 0.87.

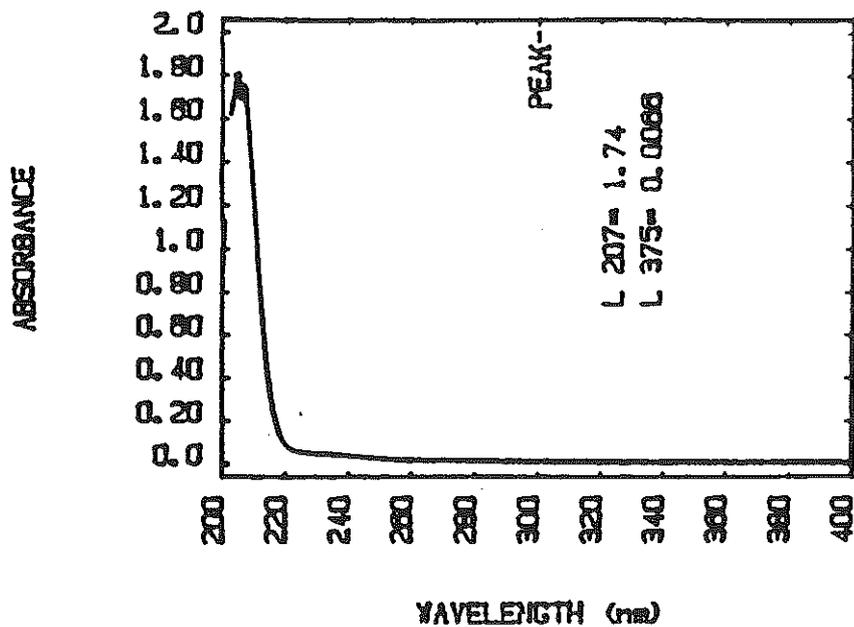


Figure 29 : Spectre UV d'acide arachidonique pur.

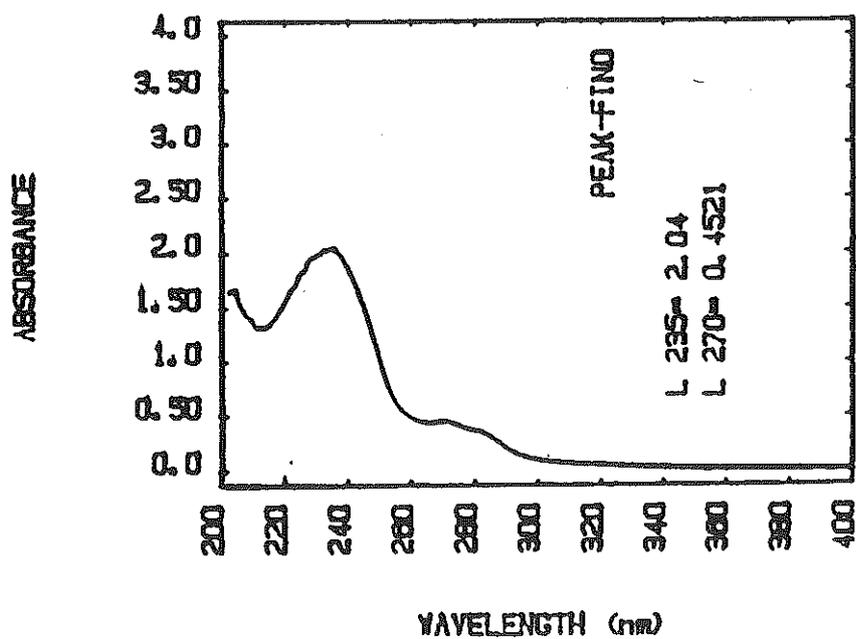


Figure 30 : Spectre UV d'acide arachidonique auto-oxydé.

L'étude qualitative en CCM est toutefois imprécise: appréciation personnelle, faible sensibilité de révélation par les vapeurs d'iode. L'analyse en spectrophotométrie donne à l'opposé des résultats de certitude. Mais ne voulant pas contaminer la cuve du spectrophotomètre par du  $^{14}\text{C}$ , l'analyse en CCM couplée à la détection par un analyseur linéaire de radioactivité a permis de vérifier la qualité de l'acide arachidonique radiomarqué. Les figures 31 et 32 montrent respectivement un spectre d'AA pur et d'AA autooxydé.

### II.3- Incubation des monocytes.

Le culot cellulaire repris dans une solution de PBS 1X est débarassé de toutes traces de protéines par deux lavages successifs. Les monocytes sont suspendus dans 1 ml de tampon phosphate 0,05 M (formule 4) de pH 8,2 et préincubés 5 mn à 37°C avec des chlorures de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ). La concentration finale est de 2mM en  $\text{CaCl}_2$  et 0,5mM en  $\text{MgCl}_2$ . Puis, les cellules sont stimulées par de l'acide arachidonique et 1 $\mu\text{g}$  d'ionophore A23187 pendant 10 mn à 37°C. L'incubation est arrêtée par 1 ml d'une solution de méthanol contenant 200ng de  $\text{PGB}_2$ . Le précipité protéique est éliminé par centrifugation. Avant analyse en HPLC, le pH du surnageant est amené à 3 par une solution contenant 10% d'acide phosphorique.

### II.4- HPLC.

#### II.4.1- Solution de standards.

Cette solution est composée de produits fournis par les laboratoires Sigma:

- $\text{PGB}_2$ ;
- $\text{LTB}_4$ ;
- $\Delta 6$ -trans- $\text{LTB}_4$ ;
- $\Delta 6$ -trans-12 épi- $\text{LTB}_4$ ;
- mélange de  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$ ,  $\text{LTE}_4$ ;
- mélange de 5 HETE, 12 HETE, 15 HETE;
- 5 HETE-1,5-lactone (5 HETE estérifié).

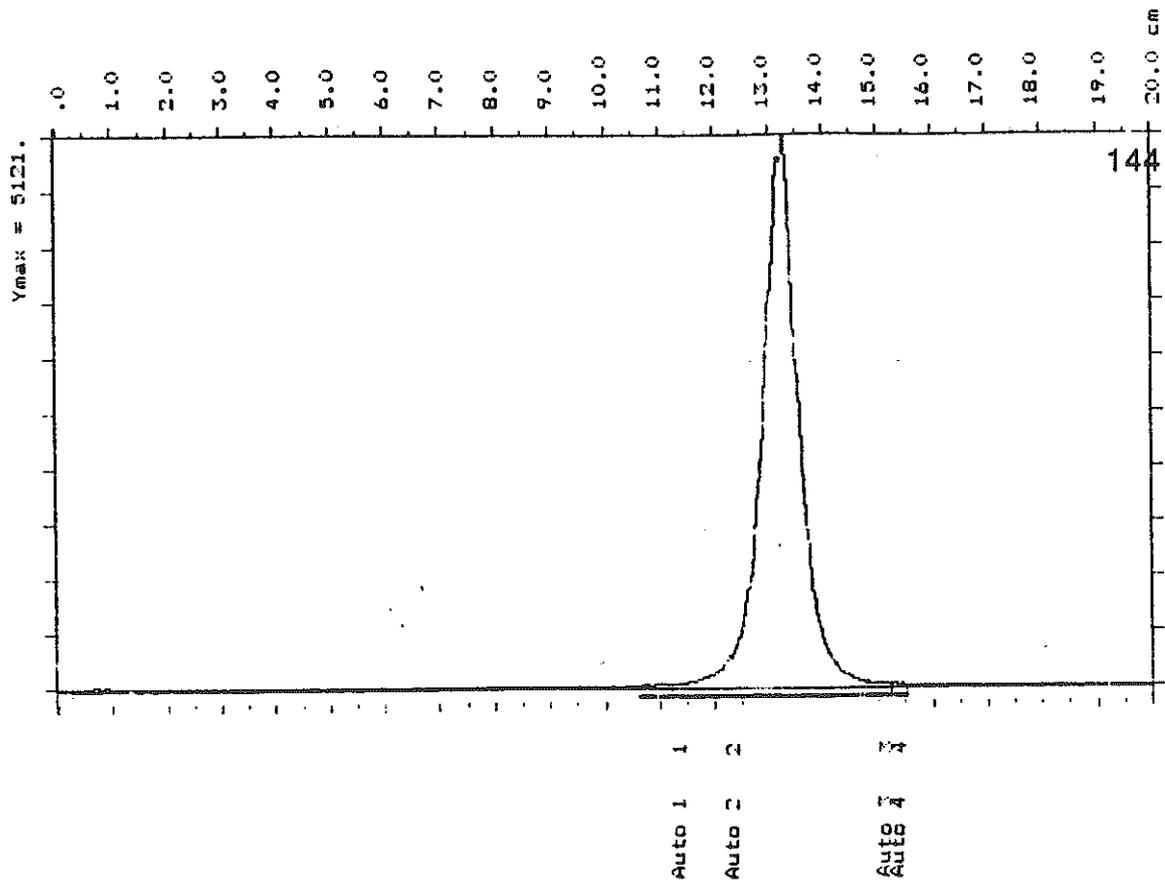


Figure 31 : Spectre radioactif d'acide arachidonique  $^{14}\text{C}$  pur après CCM.

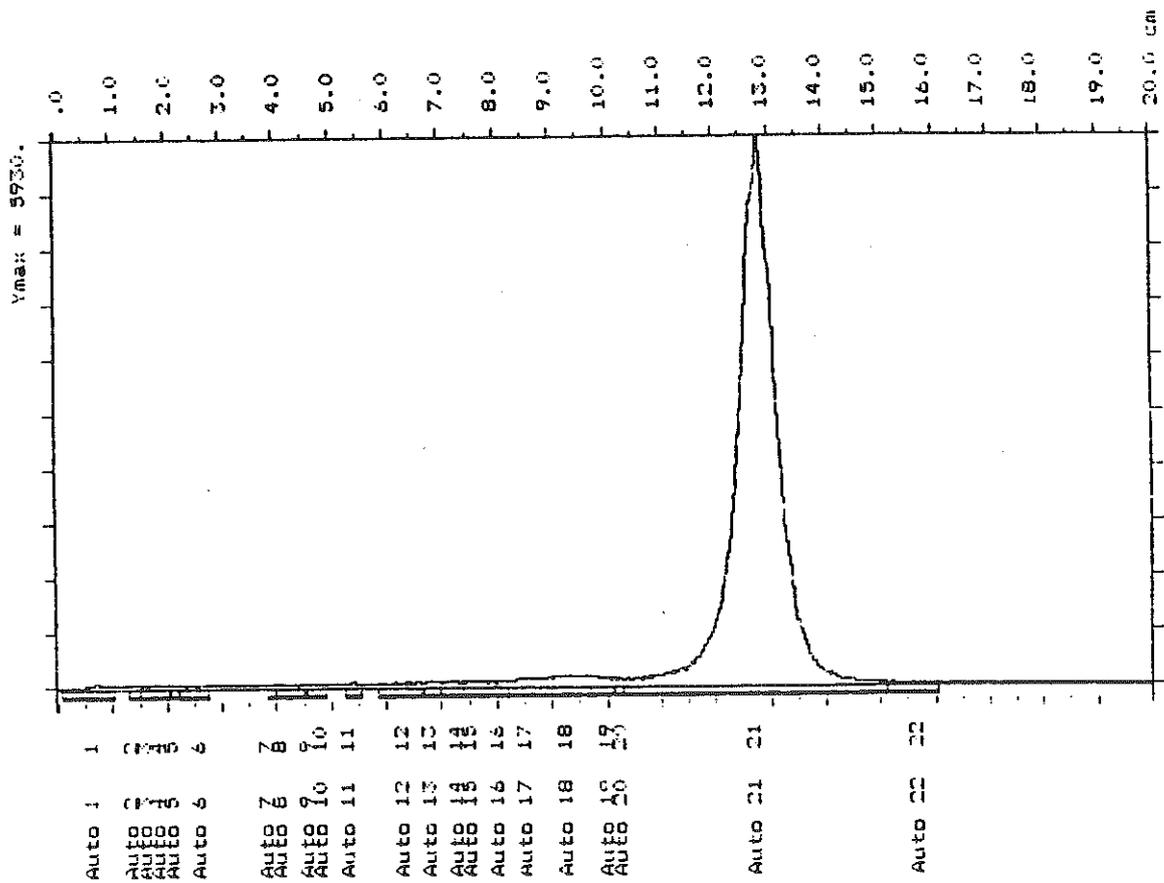


Figure 32 : Spectre radioactif d'acide arachidonique  $^{14}\text{C}$  autooxydé après CCM.

FORMULE 4 : Tampon phosphate 0,05 M à pH 8,2.

Solution de phosphate dissodique monohydraté 0,2 M : 94,7 ml

Solution de phosphate monosodique 0,2 M : 5,3 ml

Eau distillée : quantité suffisante pour 400 ml

TABLEAU II : Solvants d'éluion.

COMPOSES CHIMIQUES	SOLVANT A	SOLVANT B	SOLVANT C
Acétonitrile	45	30	45
Méthanol	45	30	45
Eau	10	40	10
Acide phosphorique	0,02	0,02	0,02
pH (NH <sub>3</sub> ,H <sub>2</sub> O)	3,5	3,5	5,5

La solution de standards présente les mêmes caractéristiques que le surnageant cellulaire après l'étape d'incubation. Une quantité connue, en général 100ng de chaque eicosanoïde, est réunie. Les solvants sont évaporés puis, les réactifs sont repris dans un volume (0,5ml) de méthanol filtré et dégazéifié et un volume de tampon phosphate 0,05M. Le pH avant injection est ramené à 3 par l'emploi d'une solution contenant 10% d'acide phosphorique.

#### II.4.2- Gradient.

Les peptidoleucotriènes sont extrêmement sensibles aux variations de pH et en général leur temps de rétention diminue considérablement lorsque le pH augmente (BORGEAT P. et coll., 1984). Aussi, en plus de l'utilisation d'un gradient, nous augmentons sensiblement le pH des solvants d'élution.

Le pH des solvants A et B est ajusté à 3,5 et celui de C à 5,5 par adjonction d'ammoniaque. Leur composition chimique est indiquée au tableau II.

Chaque solvant est préalablement filtré et dégazéifié par le passage sur filtre Durapore adapté à la nature du solvant afin d'éviter la présence de gaz dissous et en particulier d'oxygène. En effet, les gaz moins solubles aux fortes pressions forment des bulles qui perturbent la régularité de la chromatographie et des systèmes de détection. L'acétonitrile utilisé est distillé et les fractions retenues sortent vers 80°C.

L'échantillon à analyser (volume = 1 ml) est injecté sur la colonne équilibrée avec le solvant B, sans extraction préalable. Le gradient suivant est alors réalisé:

TEMPS (mn)	FLUX (ml/mn)	A (%)	B (%)	C (%)	
0,0	2		0	100	0
5,0	2		40	60	0
17,5	2		60	40	0
22,5	2		0	30	70
32,5	2		0	0	100
48,0	2		0	0	100

La colonne est nettoyée après le passage d'échantillon cellulaire par un mélange à volumes égaux d'acétonitrile et d'isopropanol filtrés et dégazéifiés.

## II.5- Détecteur à scintillation.

L'HPLC n'est pas couplé à un compteur de radioactivité.

50 ng de chaque standart (LTs et HETEs) sont ajoutés à la suspension cellulaire à analyser en HPLC. Les différentes fractions éluées sont recueillies et 1 ml d'éluant radioactif est ajouté à 9 ml d'Ultima-Flo M. Le dénombrement des rayonnements sur chaque fraction est réalisé pendant 10 mn.

## D/ EXTRACTION D'ARN TOTAUX ET RECHERCHE PAR PCR DE L'EXPRESSION AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL DE LA 5 LIPOXYGENASE.

### I- Les acides nucléiques.

Deux classes d'acides nucléiques se distinguent par leur composé carbohydrate: les acides ribonucléiques (ARN) contenant un ribose et les acides désoxyribonucléiques (ADN) contenant un désoxyribose. Alors que l'ADN porte le matériel génétique et est répliqué au cours des divisions cellulaires en ADN fils structurellement identique, l'ARN obtenu par transcription d'ADN, transfère l'information génétique de l'ADN au site de biosynthèse des protéines (ARN messagers) et traduit les séquences nucléotidiques en séquences protéiques au cours de cette biosynthèse (ARN messagers, ARN de transfert, ARN ribosomal).

Les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides. Ceux-ci se composent chimiquement d'une base purique ou pyrimidique, d'un pentose, et d'esters d'acide phosphorique. Les cinq bases principales sont l'uracile U de l'ARN, la thymine T de l'ADN et la cytosine C pour les pyrimidines et l'adénosine A et la guanine G pour les purines.

Chaque unité mononucléotidique est liée à la suivante par un groupement phosphate qui forme une liaison ester en 3' de l'un des sucres et en 5' du voisin. La liaison 3'-5' forme une chaîne linéaire entre phosphate-pentose. La base est liée en C1 de chaque sucre par une liaison N-glycosidique. L'arrangement statistiquement irrégulier des bases porte l'information génétique.

Les groupes réactifs  $-NH_2$ ,  $-OH$  et  $-NH$  des purines et des pyrimidines permettent la formation de liaisons hydrogènes entre les purines et les pyrimidines et plus spécifiquement entre A et T, A et U, G et C.

Alors que l'ARN est monocaténaire, l'ADN est constitué par deux chaînes complémentaires de polynucléotides enroulées l'une autour de l'autre. Ces deux chaînes sont polarisées et orientées dans des directions opposées: la liaison phosphodiester doit être lue dans la direction 5'-3'.

## II- Extraction des ARN totaux.

### II.1- Principe.

Les ribonucléases (RNase A) sont susceptibles de dégrader l'ARN. L'emploi de gants pour manipuler, de tubes et de pointes autoclavées est indispensable afin d'éviter la contamination par les RNases.

#### II.1.2- Préparation des ARN totaux.

Les cellules sont homogénéisées dans une solution tampon capable d'inhiber des RNases endogènes et de dissocier des protéines fixées aux acides nucléiques. Ces propriétés sont assurées par l'association d'un détergent puissant (SDS, sodium dodécyl sulfate ou sarcosyl), d'un agent dissociant (chlorure ou thiocyanate de guanidine), d'un agent réducteur à haute concentration ( $\beta$ -mercaptoéthanol ou DTT, dithiothréitol) dans une solution tampon (acétate).

RNA<sup>TM</sup> (Bioprobe) permet d'autre part la formation de complexes entre l'ARN, le guanidinium et les molécules d'eau et supprime les interactions hydrophiles avec l'ADN et les protéines.

#### II.1.2- Extraction des ARN totaux.

Elle est basée sur la solubilité différentielle des molécules (ARN / ADN et protéines) entre deux phases non miscibles.

### II.1.3- Précipitation et lavage des ARN totaux.

Les précipitations ont pour but de récupérer les acides nucléiques sous forme solide, ce qui permet après lavage à l'éthanol à 75 % et séchage de les resolubiliser à la concentration souhaitée dans de l'eau traitée par du diéthylpyrocarbonate (DEPC), un inhibiteur de RNases. Ces précipitations sont accélérées par le froid (-20°C ou -70°C). Le précipité est récupéré par centrifugation.

### II.1.4- Dosage des acides nucléiques et contrôle de qualité.

#### *a- Dosage par spectrophotométrie.*

Une estimation de la concentration en acides nucléiques est effectuée par photométrie (les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'U.V. à 260 nm).

Une unité de densité optique à 260 nm correspond à :

- une solution d'ADN double brin à 50 µg/ml
- une solution d'ADN simple brin ou d'ARN à 40 µg/ml.

Une éventuelle contamination protéique (les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm) est recherchée par la mesure de la densité optique à 280 nm. Une solution pure d'acide nucléique (ARN ou ADN) doit avoir un rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  compris entre 2 et 1,8. Une contamination entraîne une surestimation de la concentration réelle en acide nucléique, et risque d'inactiver ou de gêner les enzymes utilisés ultérieurement. Un contrôle de la qualité des acides nucléiques extraits est nécessaire après leur extraction.

#### *b-Electrophorèse.*

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées. Ils peuvent migrer dans un champ électrique.

Le choix de la nature et de la concentration du support de l'électrophorèse est fonction de la taille moyenne des fragments à séparer. La migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases du fragment. Chaque gel est étalonné avec des marqueurs de taille connue. Le gel d'agarose est le support le plus utilisé. Les gels sont coulés à l'horizontale dans des appareils transparents aux U.V. Une circulation de tampon entre les deux bacs doit être assurée afin de diminuer les variations de pH de chaque bac qui résultent de la décomposition par électrolyse.

### *c- Révélation.*

Le bromure d'éthidium est une drogue intercalante (présentant un risque cancérigène) qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Cette molécule, spontanément non fluorescente, présente une fluorescence orange lorsqu'elle est intercalée entre les bases des acides nucléiques. Dans la pratique, cette molécule est introduite dans l'agarose avant que le gel ne soit coulé. Après migration, sous l'effet des U.V. (vers 300 nm), les acides nucléiques sont visualisés sous forme de bandes oranges. Il est alors possible de prendre des photographies.

## II.2- Protocole.

### II.2.1- Extraction des ARN totaux.

Le protocole utilisé est dérivé de la méthode de CHOMCZYNSKI P. et coll. (1987). Le culot cellulaire lavé par du PBS 1X est repris et consciencieusement homogénéisé dans 0,2 ml de tampon RNA<sup>TM</sup> pour 10<sup>6</sup> cellules. 0,2 ml de chloroforme sont ajoutés à 2 ml d'homogénat. L'ensemble est vigoureusement agité 15 secondes puis laissé au repos dans la glace 5 mn. La suspension est ensuite centrifugée à 12000 g, 4°C 15 mn. L'ARN se trouve exclusivement présent dans la phase aqueuse supérieure tandis que l'ADN et les protéines se retrouvent dans l'interface et dans la phase organique inférieure. Pour récupérer les acides nucléiques sous forme solide, la phase aqueuse est mélangée à un volume

d'isopropanol filtré, laissée à 4°C 15 mn puis centrifugée à 12000 g, 15 mn à 4°C. Le culot d'ARN est lavé avec une solution d'éthanol à 75 % pour éliminer les traces d'isopropanol et est centrifugé 8 mn à 12000 g et 4°C. Il est enfin séché sous vide 10 mn puis repris dans un volume connu d'eau DEPC.

Les ARN peuvent être conservés sous forme précipitée dans l'éthanol à -20°C ou sous forme congelée à -80°C dans de l'eau contenant du DEPC.

### II.2.2- Dosage des acides nucléiques.

Une fraction d'ARN totaux reprise dans de l'eau DEPC est passée en spectrophotométrie. Le blanc est réalisé sur de l'eau DEPC. Le rapport entre DO<sub>260</sub> et DO<sub>280</sub> est alors établi et la quantité d'ARN extrait est déterminée par la relation:  $D_{260} \times 40 \times \text{dilution}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ).

### II.2.3- Electrophorèse.

#### *a- Tampon d'électrophorèse.*

Le tampon utilisé est du Tris - Acétate 1X (TAE 1X). Cette solution est réalisée à partir de TAE 50X dont la composition est donnée dans la formule 5. Le pH final du TAE 1X est de 7,2.

#### *b- Minigel d'agarose à 0.8 %.*

Il sépare les fragments de 1 à 20 kilobases (kb).

Pour 100 ml de gel, 0,8 g d'agarose sont dissous dans 50 ml d'H<sub>2</sub>O autoclavée et mis dans le four à microondes. Lorsque tout l'agarose est bien dissous, 48 ml d'H<sub>2</sub>O autoclavée, 2 ml de tampon TAE 50X, et 2,5  $\mu\text{l}$  de bromure d'éthyidium (10 mg/ml) sont ajoutés. L'agarose est coulé chaud dans le moule et est laissé à refroidir 30 mn à la température du laboratoire.

## FORMULE 5 : TAE 50X.

Tris base : 242 g  
Acide acétique : 57,1 ml  
EDTA (pH= 8) 0,5 M : 100 ml  
Eau DEPC : quantité suffisante pour 1 l

## FORMULE 6 : Tampon échantillon (6X).

Xylène cyanol : 0,03 g  
Bleu de bromophénol : 0,03 g  
Glycérol : 3 ml  
Eau : 7 ml

### *c- Conditions d'électrophorèse.*

Le gel avec le support est placé dans la cuve à électrophorèse; le niveau du tampon doit se situer au-dessus. Les échantillons sont déposés dans les puits:

- ARN totaux:

1 à 2  $\mu\text{g}$  d'ARN à analyser sont mélangés à 1  $\mu\text{l}$  de tampon échantillon 6X (formule 6) et complété à 6  $\mu\text{l}$  par de l'eau DEPC.

- marqueurs de poids moléculaire:

1  $\mu\text{l}$  soit 250 ng de la solution de marqueurs de poids moléculaire sont ajoutés à 1  $\mu\text{l}$  de tampon échantillon (6X) et 5  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. La taille des fragments est de 21226 paires de bases (pb), 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 et 125.

Une fois les dépôts réalisés, une tension de 80 volts est appliquée entre les électrodes. La migration de 1H à 1H 30 peut être suivie grâce au tampon d'échantillon contenant du bleu de bromophénol, du glycérol et du xylène cyanol. Elle s'effectue de la cathode vers l'anode.

La migration peut être observée sous UV et une photographie est facilement réalisable.

## III- La transcription réverse.

### III.1- Principe.

#### III.1.1- Action de la transcriptase réverse.

La transcriptase réverse transcrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Comme toutes les polymérases, elle travaille dans le sens 5',3'. Pour démarrer, elle a besoin d'une extrémité 3'OH libre, sur laquelle elle vient fixer un désoxynucléotide par son extrémité 5', créant une liaison phosphodiester entre les deux désoxynucléotides (Figure 33).

La transcriptase réverse utilisée est dépourvue d'activité RNase H. Les RNases

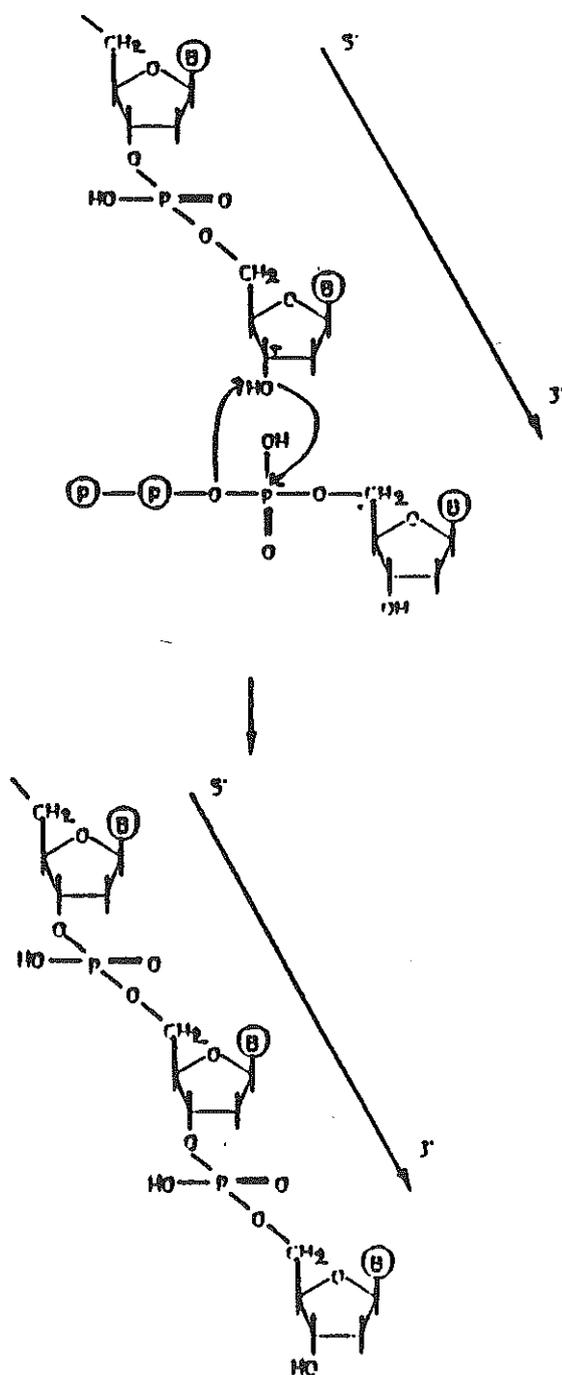


Figure 33 : Action de la transcriptase réverse.

H sont des enzymes capables de dégrader spécifiquement le brin d'ARN d'un duplex ARN-ADN.

### III.1.2- Origine de la transcriptase réverse.

La transcriptase réverse est un enzyme codé par le gène pol des rétrovirus. Elle leur permet de répliquer leur ARN génomique. La transcriptase réverse utilisée au laboratoire provient de cellules infectées par l'AMV (avian myeloblastosis virus). Plus récemment, une transcriptase extraite de cellules infectées par le virus de Moloney a été introduite sur le marché : son activité et sa stabilité semblent plus grandes.

### III.1.3- Utilisation de la transcriptase réverse.

Cette enzyme est utilisée chaque fois qu'une copie d'ARN sous forme d'ADN est nécessaire.

La technique est schématisée figure 34. Le substrat de la transcriptase réverse est l'ARN polyA (la très grande majorité des ARN messagers eucaryotes possèdent une queue constituée d'une longue séquence polyadénylique). Les ARNm sont incubés en présence de polydT courts, de transcriptase réverse et d'un mélange des 4 désoxyribonucléosides triphosphates. Le polydT s'hybride au polyA de l'ARNm et sert d'amorce pour la transcriptase, qui synthétise alors le brin complémentaire, sous forme d'ADN. Après la synthèse du premier brin, l'ARN est détruit à l'aide de la RNase H.

## III.2- Protocole.

Les manipulations sont réalisées à l'aide d'un thermobloc (PCR Dry Block, Techne Inc.) permettant d'effectuer les variations thermiques de manière automatique et programmée. Toutes les manipulations sont réalisées dans une sphère stérile pour éviter les contaminations par de l'ARN étranger (Cleansphère CA100, Safetech). L'opérateur porte des gants, les pipettes et pointes sont stériles

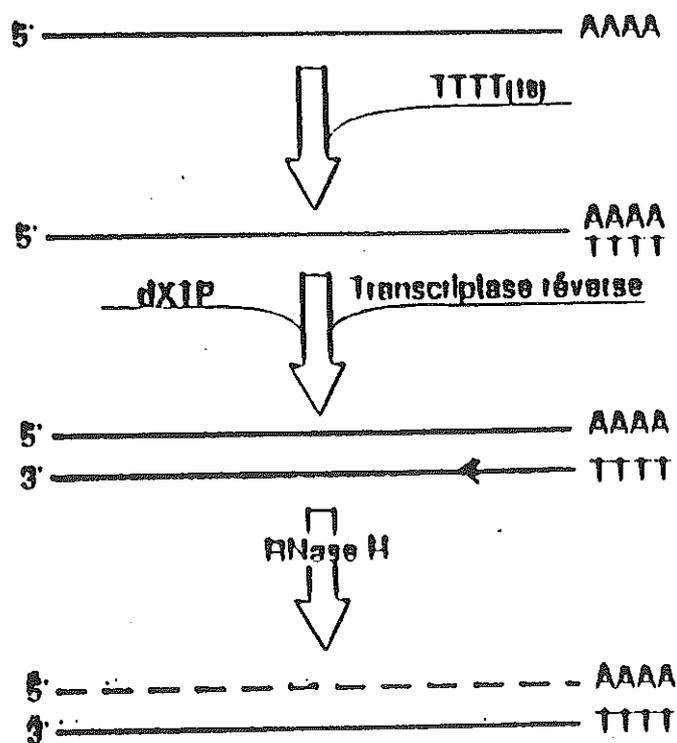


Figure 34 : Technique de transcription réverse.

et chaque pipette est réservée à un prélèvement particulier.

Le protocole utilisé est dérivé de celui du "Superscript Preamplification System" (Gibco-BRL cat. N°8089 SA).

Le coffret "Superscript Preamplification System" Gibco comprend : un ARN de contrôle, une solution tampon PCR 10 X (Tris HCl 200 mM, KCL 500 mM, BSA 10 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 25 mM), un mélange de dNTP (10 mM de chacun des désoxynucléotides : dGTP, dCTP, dTTP, dATP), DTT 0,1 M, la transcriptase réverse (200 U/μl), et une RNase H (2 U/μl).

### III.2.1- Amorçage.

La réaction est effectuée dans des microtubes stériles de 500 μl. Pour les échantillons biologiques, 1 à 5 μg d'ARN sont utilisés. Deux tubes contrôles sont préparés, avec l'ARN de contrôle du kit (1 μl c'est à dire 50 ng). Nous complétons à 13 μl avec l'eau DEPC.

Dans chaque tube, 1 μl d'oligodT (0,5 mg/ml) sont ajoutés; les réactifs sont mélangés doucement en tapotant avec l'index, centrifugés rapidement puis placés dans le thermobloc, incubés 10 mn à 70°C, refroidis 1 à 2 mn dans la glace et centrifugés rapidement.

### III.2.2- Transcription réverse.

Le mélange réactionnel suivant est préparé pour x+1 échantillons: 2 (x+1) μl de tampon PCR 10 X, (x+1) μl de dNTP 10 mM, 2 (x+1) μl de DTT 0,1 M et (x+1) μl de transcriptase réverse (200 U/μl). Le mélange (6μl) est distribué dans chaque tube. Les tubes sont centrifugés rapidement après agitation douce et incubés 10 mn à température du laboratoire. Ils sont ensuite placés 50 mn à 42°C, 5 mn à 90°C puis 10 mn dans la glace et centrifugés rapidement.

### III.2.3- Traitement par la RNase.

Pour détruire les ARN restants, 1μl RNase H (2 U/μl) est ajouté. Les

échantillons sont incubés 20 mn à 37°C puis 5 mn à 94°C et refroidis dans la glace. L'ADNc obtenu peut être stocké à -20°C.

#### IV- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE.

##### IV.1- Principe.

La technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour polymerase chain reaction) permet d'amplifier une séquence définie en plusieurs millions d'exemplaires.

Le principe de la méthode d'amplification d'ADN in vitro consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces oligonucléotidiques. Ces dernières permettent la copie du brin d'ADN qu'elles encadrent. Chaque couple d'amorce est composé:

- d'un oligomère de nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du segment d'ADN à amplifier
- d'un autre oligomère de nucléotides, complémentaire de l'extrémité 3' du segment antiparallèle.

La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates et d'ADN polymérase (Taq polymérase). Chaque amorce est allongée dans le sens 5',3' pour donner une séquence exactement complémentaire du brin copié. Il en résulte un doublement de la séquence considérée, puisque chaque brin est copié.

Les brins néosynthétisés servent eux-mêmes de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle schématisé figure 35. Un cycle comprend :

- un temps de dénaturation (séparation des brins d'ADN)(A);
- un temps d'hybridation des amorces(B);
- un temps d'élongation par la Taq polymérase(C).

Chaque étape dure 2 minutes et chaque cycle produit donc un doublement de la séquence comprise entre les deux amorces (Figure 36).

La répétition de ces trois étapes (dénaturation, hybridation, polymérisation) aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible. Au bout de N cycles, on obtient théoriquement  $2^N$  exemplaires du segment d'ADN dont les

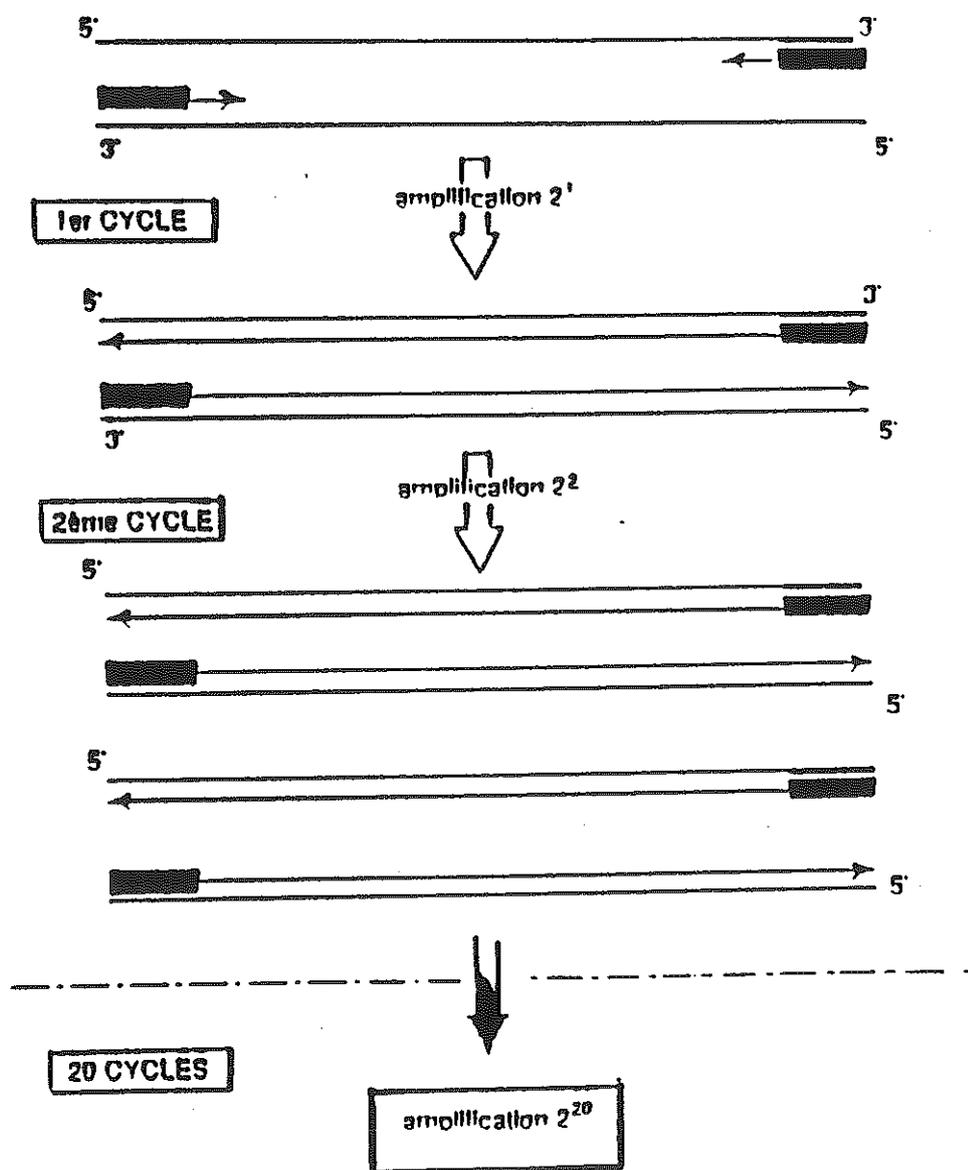


Figure 35 : Réaction de polymérisation en chaîne.

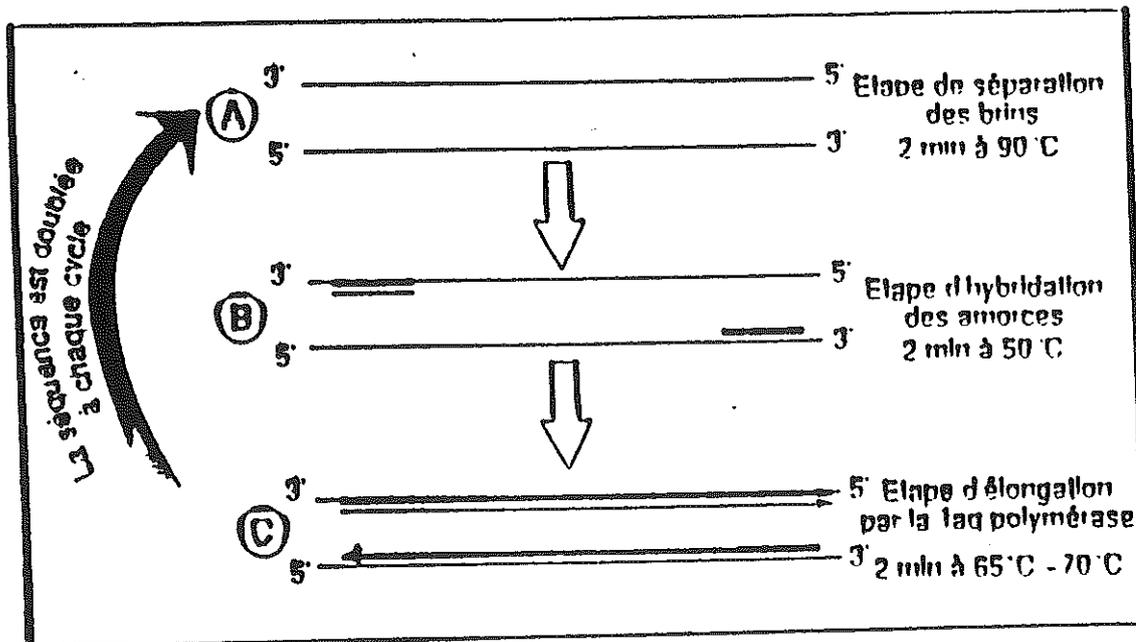


Figure 36 : Etapes caractérisant un cycle en PCR.

extrémités sont définies par les extrémités 5' des amorces utilisées. Le rendement moyen des réactions d'élongation est de l'ordre de 50%. En fin d'amplification, différentes espèces moléculaires sont obtenues dont une est largement majoritaire, correspondant au segment d'ADN amplifié.

Cette méthode d'amplification (PCR) est très simple à réaliser car elle ne nécessite aucune autre manipulation que des variations thermiques, tous les cycles étant réalisés dans un même tube. De plus l'utilisation d'une DNA polymérase thermorésistante, la Taq-polymérase (utilisée depuis 1988), évite d'avoir à rajouter l'enzyme à chaque cycle et augmente la spécificité de l'hybridation des amorces.

L'intérêt de la méthode est considérable car elle permet d'amplifier à volonté n'importe quelle séquence d'ADN à condition de disposer d'amorces adéquates c'est à dire de connaître la séquence considérée. L'amplification est rigoureusement spécifique si les amorces correspondent à des séquences uniques. Une amplification parasite n'est pas à redouter parce que la longueur de chaque amorce - 20 à 25 nucléotides - évite les hybridations non spécifiques. Différents facteurs peuvent influencer la réaction de polymérisation (température de la réaction, concentration de la matrice, composition du tampon, son pH et concentration en sels).

Une amplification non spécifique serait le résultat d'une double hybridation de part et d'autre d'un segment différent de celui que l'on cherche à amplifier (coïncidences extrêmement improbables).

#### IV.2- Protocole.

Les manipulations sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la transcription reverse. Les réactions sont réalisées dans des microtubes stériles de 500 µl. La moitié des échantillons biologiques provenant de la transcription reverse sont pris pour la PCR (10 µl). Il en est de même pour les contrôles. Deux contrôles sont réalisés :

- un contrôle positif avec les amorces de l'ADNc contrôle fournies avec le kit qui vont réagir avec l'ADNc contrôle (C+).

- un contrôle négatif avec les amorces de l'ADNc - 5 LOX qui ne doivent pas réagir avec l'ADNc contrôle (C-).

Les amorces de l'ADNc - 5 LOX utilisées sont les suivantes:

-Séquence de l'amorce 3' :

5'....ATC AGG ACG TTC ACG GCC GAG G....3'

-Séquence de l'amorce 5':

5'....CCA GGA ACA GCT CGT TTT CCT G....3'

#### IV.2.1- Préparation de l'amplification.

Pendant toute la manipulation, les tubes sont conservés dans la glace. Le mélange réactionnel suivant est réalisé pour (x+1) échantillons: 5(x+1) µl de tampon TAQ 10X, 1(x+1) µl de dNTP 10 mM, 27(x+1) µl d'eau stérile, 2,5(x+1) µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2,5(x+1) µl de solution de détergent à 1% et 0,25(x+1) µl de Taq polymérase Gibco (5 U/µl). 38 µl de ce mélange sont distribués dans les tubes:

- d'échantillons biologiques;
- de contrôles C+ et C-;
- du témoin : ADNc-5 LOX (5,6pg).

2 µl de chaque amorce de l'ADNc - 5 LOX (10 pmol/µl) sont ajoutés dans les échantillons biologiques, le témoin et le contrôle C- et 1 µl de chaque amorce de l'ADNc contrôle dans le contrôle C+.

Après agitation douce et centrifugation rapide, 100 µl d'huile minérale sont déposés dans chaque tube afin d'éviter l'évaporation des réactifs. Les tubes sont alors placés dans le bloc chauffant à température du laboratoire.

#### IV.2.2- Amplification.

La température est initialement élevée à 72°C pendant 2 mn. Démarrent alors les cycles:

- 94°C pendant 2 mn (dénaturation)

-62°C pendant 2 mn (hybridation des amorces)

-72°C pendant 2 mn (extension)

Trente cycles identiques sont réalisés au terme desquels la température est abaissée à 15°C.

#### IV.2.3- Vérification.

Si la séquence amplifiée par PCR est en quantité suffisante, elle peut être directement visualisée en électrophorèse. Un gel d'agarose 0,8% marqué par un agent fluorescent s'intercalant entre les bases des acides nucléiques (le bromure d'éthidium) est réalisé sur 1/10 des échantillons amplifiés (5µl); la migration est examinée sous U.V. . La présence de bandes face aux PM attendus est un témoin du bon déroulement de la PCR.

L'hybridation sur tache (dot blot) permet d'apprécier avec une sensibilité plus grande la présence et la qualité d'un transcrit donné.

##### *a-Principe du dot blot.*

Le procédé de dot blot consiste à réaliser un dépôt de l'échantillon d'ADN amplifié après son extraction sur une membrane de nylon et à l'hybrider directement avec une sonde.

##### *b- Extraction des produits amplifiés.*

Après avoir éliminé l'huile, 150 µl d'eau DEPC et 200 µl de phénol saturé en eau sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés à 1200 g, 5 mn à 21°C. A la phase aqueuse supérieure sont ajoutés 100 µl de phénol saturé en eau et 100 µl de chloroforme. Une nouvelle centrifugation est réalisée comme précédemment. La phase aqueuse est précipitée par 4 µl d'une solution de chlorure de sodium 5M et 500 µl d'éthanol puis centrifugée à 12000 g, 30mn à 4°C. Le précipité est lavé par 200µl d'éthanol à 70%, séché et repris dans 25 µl d'eau DEPC.

*c- Protocole du dot-blot. (Figure 37)*

- Dénaturation de l'ADN : L'ADN est dénaturé pendant 10 mn à 100°C puis laissé 5mn dans la glace. 1µl d'échantillon est déposé et la membrane séchée 1 H à 80°C.

- Préhybridation : La membrane de nylon est placée dans une boîte de pétri et incubée 1H 30 à 42°C en présence de 20 ml de solution d'hybridation pour 100 cm<sup>2</sup> de membrane dans le but de masquer les sites non spécifiques.

- Hybridation : Après avoir éliminé la solution d'hybridation, 2,5 ml pour 100 cm<sup>2</sup> de membrane de solution d'hybridation contenant la sonde d'ADN marquée par de la digoxigénine sont mis en contact avec la membrane pendant 10 mn à 95°C puis incubés toute la nuit à 42°C.

La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 5 mn avec 50 ml de tampons SSC 2X et SDS 0,1% pour 100 cm<sup>2</sup> de membrane et à nouveau deux fois 15 mn à 68°C avec SSC 0,1X et SDS 0,1%.

- Détection : La membrane est lavée 5 mn dans le tampon de lavage de détection, incubée 30 mn dans 100 ml de tampon 2 puis 30 mn dans le tampon 2 contenant 2µl pour 20 ml de fragment F'ab polyclonaux antidigoxigénine de mouton conjugués à une phosphatase alcaline (75 mU/ml). La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 15 mn avec 100 ml de tampon de lavage de détection et équilibrée 5 mn avec 20 ml de tampon 3. Elle est ensuite incubée 5 mn avec 10ml dans le tampon 3 contenant 10µl pour 1 ml de Lumigen PPD (10 mg/ml). L'excès de liquide est éliminé et la membrane est incubée 10 mn à 37°C.

La membrane est alors placée à température ambiante en sandwich contre un film qui est développé une heure plus tard.

Tampon d'hybridation (pour 100 ml)

Formamide : 50 ml

Tampon SSC 20X : 25 ml

Réactif bloquant à 10% : 20 ml

N-laurylsarcosine à 10% : 1 ml

Solution à 10% de sodium dodécyl sulfate : 0,2 ml

Eau autoclavée : 3,8 ml

Tampon SSC 20X

Chlorure de sodium 3 M

Citrate trisodique 0,3 M

pH : 7 (HCl 1M)

Tampon 1

Acide maléique 0,1 M

Chlorure de sodium 0,15 M

pH = 7,5 (NaOH)

Tampon de lavage de détection

Tween 20 : 1,357 ml

Tampon 1 : qsp 500 ml

Tampon 2

Solution stock du réactif bloquant : 20 ml

Tampon 1 : 80 ml

Tampon 3

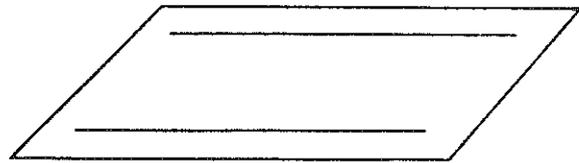
Tris, HCl : 0,1 M

NaCl : 0,1 M

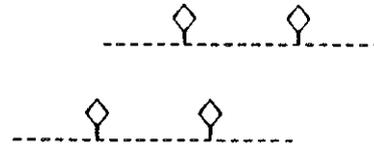
MgCl<sub>2</sub> : 0,05 M

pH = 9,5

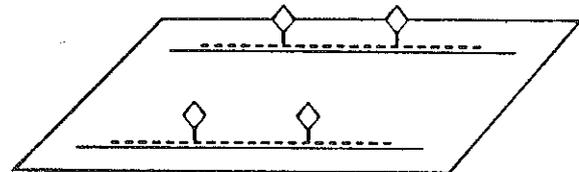
Membrane sur laquelle est fixé l'ADNc



+ ADNc de la 5 lipoxygénase  
marqué par de la digoxigénine



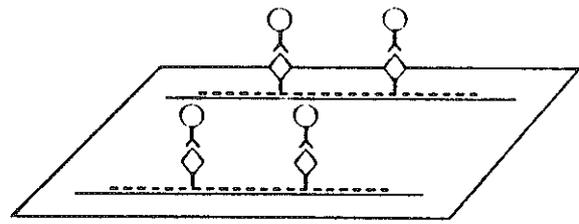
Hybridation



+ Anticorps anti-digoxigénine couplés  
à des phosphatases alcalines



Complexe Ac-Ag



+ Lumigen PPD

Réaction luminescente catalysée  
par les phosphatases alcalines

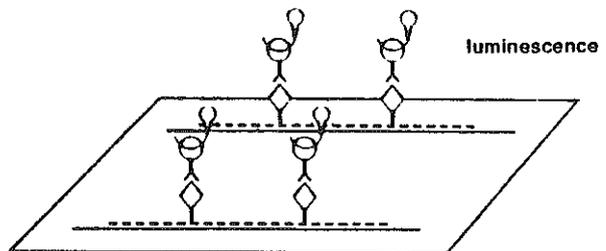


Figure 37 : Détection par dot-blot d'acide nucleiques.

## RESULTATS ET DISCUSSION.

### A/ OBTENTION DE MONOCYTES SANGUINS HUMAINS.

La séparation en gradient de densité réalisée par l'emploi de Nycoprep 1.068 sur du sang humain frais permet de séparer monocytes, plaquettes et quelques lymphocytes des autres constituants cellulaires du sang. Ceci est vérifié par un examen microscopique en présence de bleu de trypan et confirmé par coloration au May Grunwald Giemsa et par analyse des estérases non spécifiques.

Pour diminuer la contamination plaquettaire, nous avons tenté de séparer les monocytes des plaquettes en gradient de densité en présence de Nycoprep 1.063. Des lavages répétés du culot cellulaire à basse vitesse (120-140 g) ont donné de meilleurs résultats.

Toutefois, aucune de ces techniques n'a pu éliminer le phénomène dit de satellisme, c'est à dire l'interaction monocyte-plaquettes. Nous avons tenté pour y remédier, d'appliquer la méthode, si souvent décrite de Pawlowsky, fondée sur l'incubation des monocytes à 37°C pendant 10 à 15 mn en présence d'EDTA. Nous avons alors constaté une diminution du satellisme mais les résultats obtenus se sont avérés difficilement reproductibles.

Seuls, le recueil du sang dans des Diatubes (contenant de l'adénosine, de la théophylline, du dipyridamole et du citrate de sodium), la dilution et le lavage dans le CATCH (contenant approximativement les mêmes composants que le Diatube) nous ont permis de réduire considérablement ces interactions sans pour autant éliminer complètement la contamination plaquettaire: elle sera contrôlée ultérieurement par l'analyse des métabolites. C'est toutefois ce dernier protocole que nous avons retenu pour toute la suite de notre étude.

Le rendement en monocytes, obtenus par cette méthode, est assez faible:

Numération des monocytes prélevés sur 50 ml de sang (cellules)	Nombre des monocytes obtenus après extraction (cellules)	Rendement (%)
$17 \cdot 10^6$	$10^6$	5,9%
$23,5 \cdot 10^6$	$1,43 \cdot 10^6$	6,1%

Cela s'explique par les pertes engendrées par la technique de séparation en gradient de densité et par les lavages répétés à basse vitesse.

La viabilité cellulaire des monocytes obtenus par cette méthode est représentée dans le tableau suivant:

Nombre de monocytes obtenus après extraction (cellules)	Mortalité (cellules)	Pourcentage de viabilité (%)
$10^6$	17.600	98,2%
$1,38 \cdot 10^6$	15.000	97,5%
$2,16 \cdot 10^6$	32.200	98,5%

Presque tous les travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui sur les métabolites lipoxygénasiques libérés par le monocyte humain passent par des étapes d'adhérence (extraction et/ou culture) qui contribuent à l'activation des monocytes. Nous avons abordé le sujet en éliminant cette étape au cours de l'obtention des monocytes et en analysant au jour  $J_0$  nos échantillons. Nous ne pouvons pas pour autant affirmer que les cellules obtenues sont des monocytes ou des macrophages immatures engagés dans la voie de l'inflammation. En effet, le Nycoprep et les solutions antiagrégantes employées sont susceptibles de modifier

l'état physiologique des monocytes sanguins. En particulier, le dipyridamole est reconnu comme étant un inhibiteur de la 5 lipoxygénase. L'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains récepteurs de surface permettrait de confirmer que les cellules, dont nous avons établi le profil lipoxygénasique, sont bien des monocytes. Nous n'avons pas pu réaliser cette étude en raison de la trop faible quantité de monocytes obtenue après chaque purification.

## **B/ BIOLOGIE MOLECULAIRE.**

### **I- Analyse par spectrophotométrie et électrophorèse de l'extraction d'ARN totaux.**

L'extraction des ARN cellulaires totaux a été réalisée à partir de  $4 \cdot 10^6$  monocytes. Un exemple du type de spectre obtenu en spectrophotométrie est représenté sur la figure 38. La DO à 260 nm est égale à 0,0419, celle à 280 nm est de 0,0232. Le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$ , qui donne une idée de l'état de contamination protéique, est alors de 1,8. La quantité extraite d'ARN est de 167,6 µg/ml.

Il n'y a aucune différence entre un spectre d'ARN dégradés et celui d'ARN non dégradés. Il est donc impératif de vérifier la qualité des ARN extraits par électrophorèse sur gel d'agarose. Trois bandes doivent être visibles sous UV, par ordre de poids moléculaires croissants:

- la première correspond aux ARN ribosomiques (ARNr) 5 S et 5,8 S, ainsi qu'aux ARN de transfert (ARNt);
- la deuxième aux ARNr 18 S;
- et la troisième aux ARNr 28 S.

La figure 39 permet de resituer les différentes fractions d'ARN dans leur contexte biologique. Les ARNm ne représentent que 1% des ARN cellulaires. Ils ne sont donc pas visibles sur le gel.

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose d'un échantillon d'ARN totaux de monocytes humains est représenté sur la photo 1. La présence des trois bandes attendues confirme que les ARN extraits sont de bonne qualité. Ils peuvent être transformés en ADNc par reverse transcription.

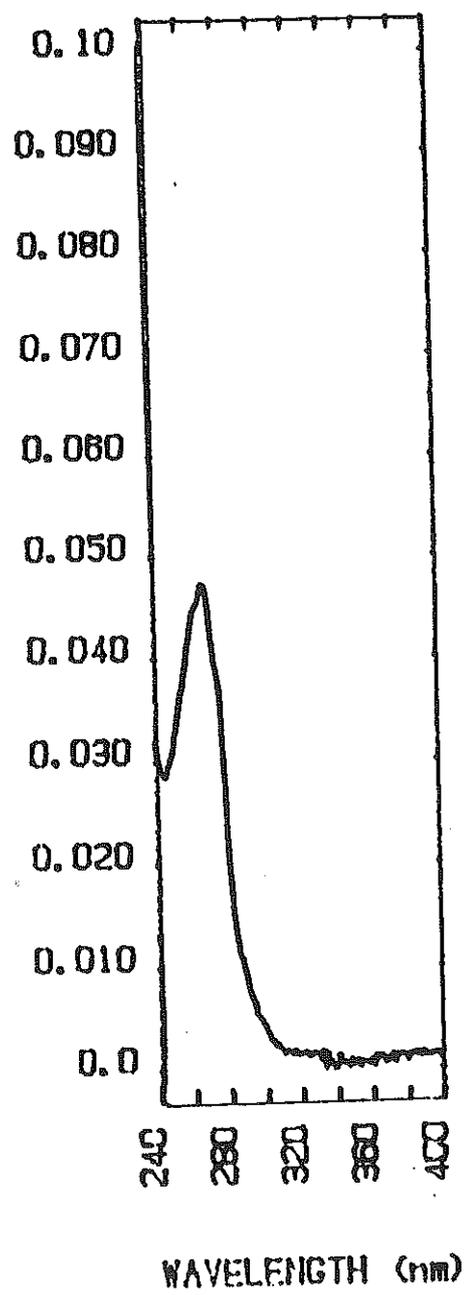


Figure 38 : Spectre UV d'ARN totaux.

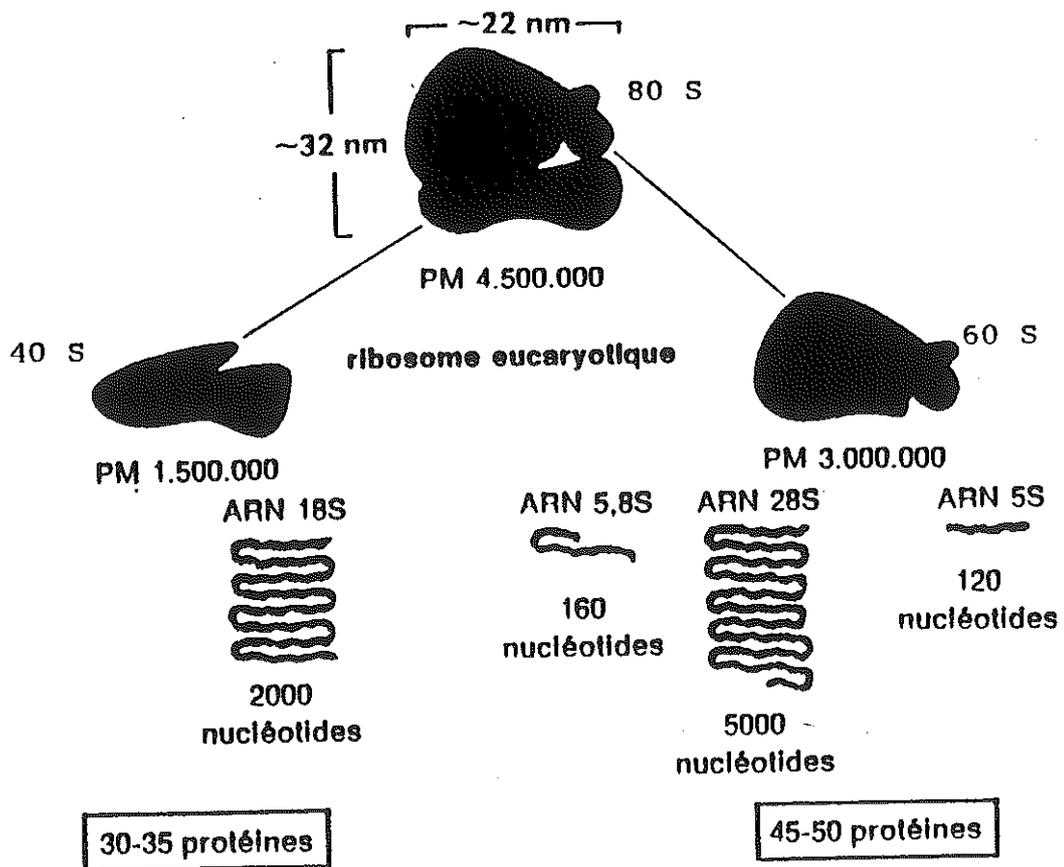


Figure 39 : Composition des ribosomes eucaryotiques typiques.

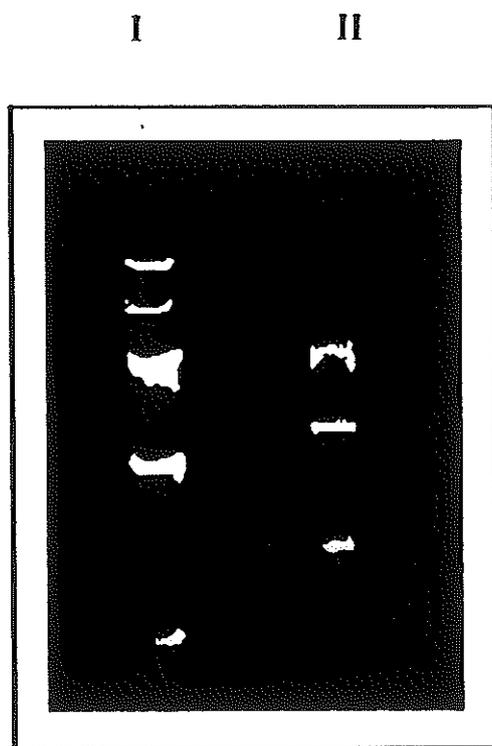


Photo 1 : Migration sur gel d'agarose après extraction des ARN totaux.  
I : Poids moléculaires.  
II : ARN cellulaires des monocytes humains.

## II- Mise en évidence de l'expression de la 5 lipoxygénase par PCR.

La PCR a été utilisée pour mettre en évidence une éventuelle expression de la 5 lipoxygénase dans les monocytes du sang circulant. Les ARNm des ARN extraits des monocytes ont été transcrits en ADNc par la transcriptase réverse, en utilisant des oligo dT comme amorce. La PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques du gène de la 5 lipoxygénase humaine. Elles sont complémentaires de zones situées sur deux exons différents, empêchant toute amplification à partir d'une éventuelle contamination génomique. Au niveau de l'ARNm, les amorces correspondent à des régions espacées de 475 bases. La présence d'ADNc de la 5 lipoxygénase se traduit donc par un amplifiat de 475 pb que l'on révèle par électrophorèse sur gel d'agarose. La photo 2 montre que l'ARNm de la 5 lipoxygénase est présent dans les cellules extraites du sang: monocytes et plaquettes. Le gène de la 5 lipoxygénase ne s'exprimant pas dans les plaquettes, la contamination lymphocytaire étant négligeable, on peut fortement supposer que cet ARNm vient des monocytes.

## III-Vérification par dot-blot.

De manière à vérifier la spécificité de l'amplification, nous avons réalisé un dot-blot avec une sonde spécifique de la 5 lipoxygénase humaine, marquée à la digoxygénine. Les produits de PCR migrant à 475 pb ont tous été marqués par cette sonde (photo 3). Nous pouvons donc dire que l'ADNc amplifié correspond à l'ARNm de la 5 lipoxygénase humaine et non pas à un ARNm ayant une séquence voisine qui aurait réagit avec les amorces utilisées en PCR.

## C/ANALYSE EN HPLC DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.

### I- Mise au point de la technique analytique.

Les métabolites analysés en HPLC ont une absorption maximale à 235 nm

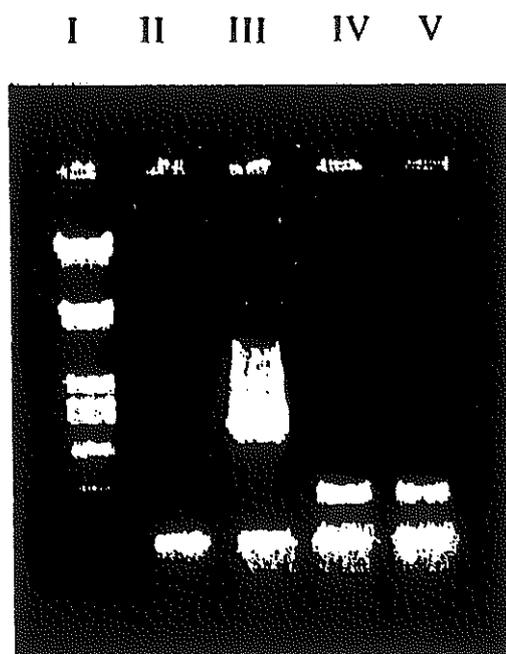


Photo 2 : Migration sur gel d'agarose après transcription réverse et PCR.

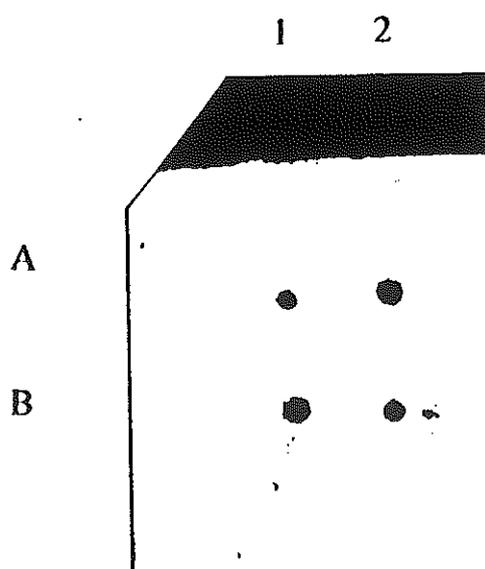
I : Poids moléculaires.

II : Contrôle négatif ( ADNc contrôle et amorces de l'ADNc de la 5 lipoxygénase).

III : Contrôle positif ( ADNc contrôle et amorces de l'ADNc de contrôle).

IV : Témoin positif (ADNc -5 lipoxygénase et amorces de l'ADNc de contrôle).

V : Echantillon (ADNc de monocytes humains et amorces de l'ADNc de contrôle).



**Photo 3 : Dot-blot après transcription réverse et PCR**

**A1 : ADNc de la 5 lipoxygénase;**

**A2 : Témoin de la PCR (ADNc -5 lipoxygénase et amorces de l'ADNc de contrôle).**

**B1 et B2 : ADNc de monocytes humains après PCR présentant sur gel d'agarose une bande amplifiée à 475 pb.**

(HETEs) et 280 nm (leucotriènes). Le système de détection dont nous disposons ne permet pas d'analyser simultanément à ces deux longueurs d'ondes.

Les colonnes possédant un double greffage C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> éluent avec le gradient utilisé certains HETEs et les peptidoleucotriènes dans la même région. Les figures 40 et 41 donnent les résultats obtenus en HPLC après le passage de standards. Dans le premier cas, sont injectés 100 ng de PGB<sub>2</sub>, standard interne, et approximativement 100 ng de peptidoleucotriènes. Ils sont détectés à 280 nm. Leur temps de rétention (tr) sont:

- 7,53 mn
- 11,31 mn
- 19,17 mn

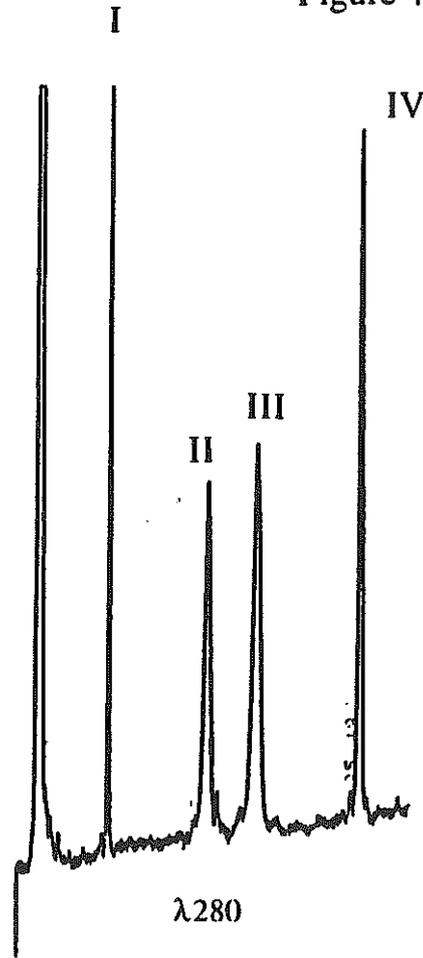
Dans le second cas, sont injectés 100 ng de PGB<sub>2</sub>, 100 ng de  $\Delta$ 6 trans-LTB<sub>4</sub> analysés à 280 nm (tr = 1,94) et approximativement 100 ng de HETEs. Ils sont détectés à 235nm. Leur temps de rétention sont:

- 15 HETE: 8,31 mn
- 12 HETE: 9,78 mn
- 5 HETE: 11,32 mn

Par contre, les colonnes possédant un greffage C<sub>18</sub> assurent avec le gradient employé une excellente séparation de la majorité des métabolites issus de la voie de la lipoxigénase comme en témoigne le passage de standards (Figure 42). Leur temps de rétention sont les suivants:

- I:  $\Delta$ 6 trans, 12-épi-LTB<sub>4</sub> : 1,12 mn
- II:  $\Delta$ 6 trans-LTB<sub>4</sub> : 1,47 mn
- III: LTB<sub>4</sub> : 1,91 mn
- IV: 15 HETE : 8,39 mn
- V: 12 HETE : 9,77 mn
- VI: 5 HETE : 11,2 mn
- VII: LTC<sub>4</sub> : 16,49 mn
- VIII: LTE<sub>4</sub> : 18,13 mn
- IX: LTD<sub>4</sub> : 23,43 mn
- X: 5-Lactone : 33,06 mn

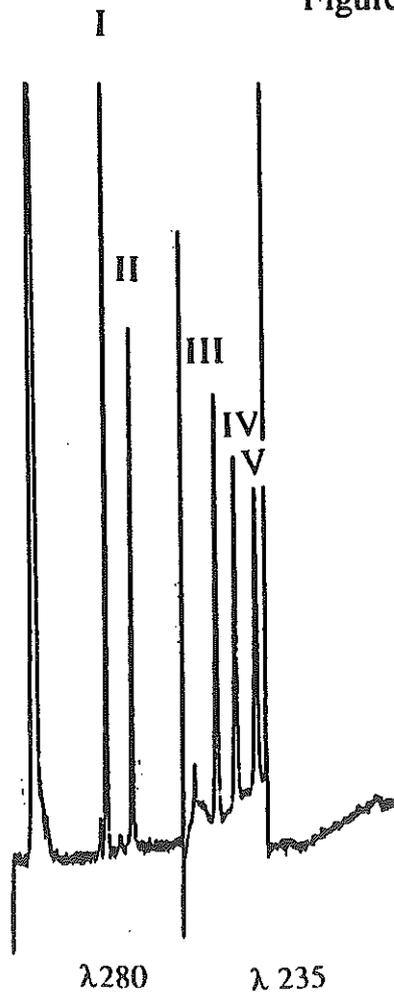
Figure 40 : Chromatogramme sur colonne C8-C18:



- I : PGB<sub>2</sub>,

- II, III, IV : leucotriènes 177  
peptidiques.

Figure 41 : Chromatogramme sur colonne C8-C18:



- I : PGB<sub>2</sub>,

- II : Δ6 trans-LTB<sub>4</sub>,

- III : 15 HETE,

- IV : 12 HETE,

- V : 5 HETE.

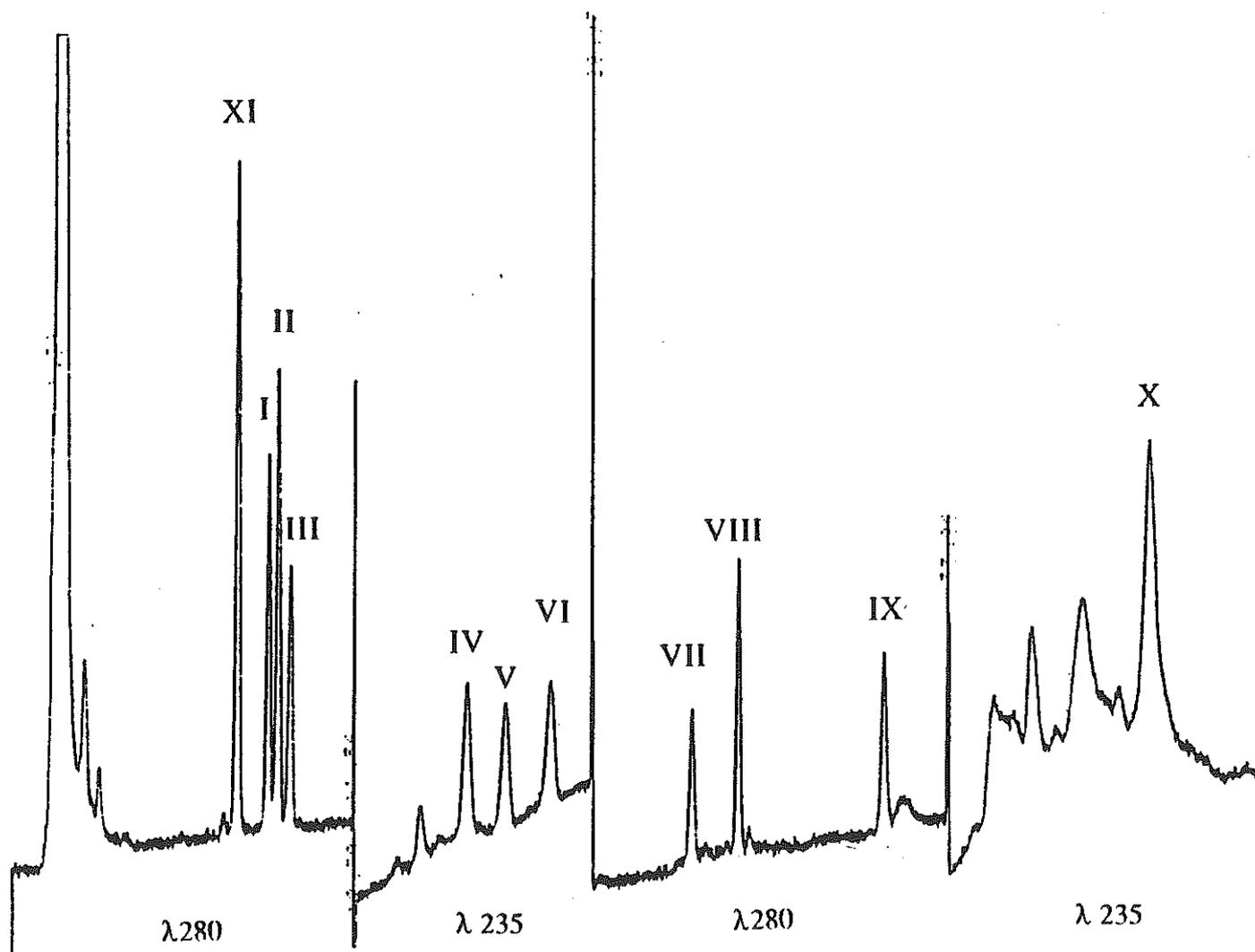


Figure 42 : Chromatogramme sur colonne C18

- XI : PGB<sub>2</sub>
- I : Δ6 trans, 12-épi LTB<sub>4</sub>
- II : Δ6 trans LTB<sub>4</sub>
- III : LTB<sub>4</sub>
- IV : 15 HETE
- V : 12 HETE
- VI : 5 HETE
- VII : LTC<sub>4</sub>
- VIII : LTE<sub>4</sub>
- IX : LTD<sub>4</sub>
- X : 5-Lactone
- XII : Acide arachidonique

C'est donc sur une colonne C<sub>18</sub> que nous avons analysé les échantillons biologiques. Notre méthode d'analyse par HPLC développée est facile à réaliser, rapide et répétitive. Elle n'implique aucune extraction, concentration ou dérivation, minimisant ainsi la perte et la détérioration des composés.

## II- Analyse d'échantillons incubés en présence d'AA froid.

Nous avons analysé en HPLC différents échantillons provenant de l'incubation de monocytes humains en présence d'acide arachidonique froid (15 µg) et d'ionophore (1 µg pour 1 ml de suspension cellulaire). Les deux voies exogène et endogène de la phospholipase A<sub>2</sub> sont alors stimulées. Nous n'avons obtenu aucun résultat. Nous avons mis en cause la sensibilité trop faible de détection des métabolites lipoxygénasiques. Cette trop faible sensibilité de détection est très certainement liée à la faible quantité de cellules dont nous disposions (5 .10<sup>5</sup> à 5 .10<sup>6</sup>). Nous aurions du observer en particulier un pic correspondant à la zone d'éluion du 12 HETE témoignant ainsi de la contamination plaquettaire de nos échantillons.

## III- Analyse de monocytes incubés en présence d'AA radiomarqué.

L'acide arachidonique radioactif ajouté dans le milieu réactionnel (0,25µCi) nous permet de détecter les métabolites produits par les monocytes dont la quantité est trop faible pour être repérée en UV.

Le recueil des fractions de l'éluat est réalisé grâce à l'addition de standards aux échantillons biologiques avant l'injection en HPLC. La radioactivité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. La figure 42 représente le chromatogramme des différents standards détectés en UV. Les fractions correspondant aux pics I à XII (sauf XI : PGB<sub>2</sub>) sont comptées.

Les monocytes exprimeraient différents types d'activité lipoxygénasique: les résultats sont présentés dans la figure 43.

1) Les monocytes possèdent, comme nous venons de le démontrer, un

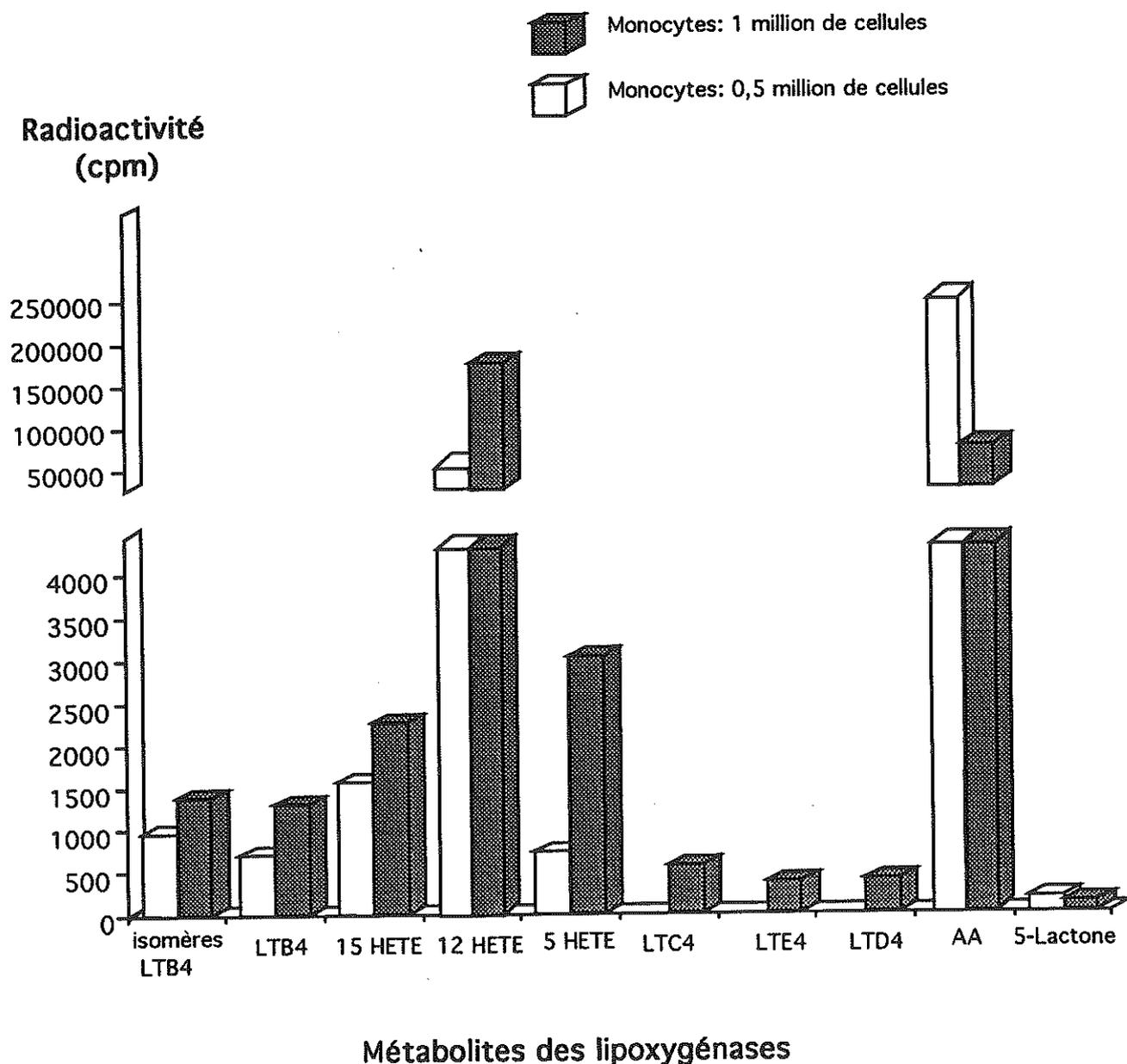


Figure 43: Profil de radioactivité des métabolites de la voie lipoxygénasique, obtenus par incubation de monocytes humains en présence d'acide arachidonique 1-C14 et d'ionophore A23187.

Isomères LTB4:  $\Delta^6$  trans-LTB4,  $\Delta^6$  trans-12 épi-LTB4

gène codant pour la 5 lipoxygénase et sont capables de le transcrire en ARNm. La détection de métabolites dihydroxylés de la 5 lipoxygénase (LTB<sub>4</sub> (pic III) et ses isomères d'hydrolyse non enzymatique: Δ<sup>6</sup> trans-LTB<sub>4</sub> (pic II) et Δ<sup>6</sup> trans-12 épi-LTB<sub>4</sub> (pic I)) et d'un métabolite réduit de cet même enzyme (pic VI: 5HETE) témoignent de la présence d'une 5 lipoxygénase active dans les monocytes. Ceci laisse supposer la formation de LTA<sub>4</sub>, la présence et l'intervention de la FLAP identifiée par immunoblot dans le surnageant de monocytes obtenus par élutriation (HOFFMAN T. et coll., 1991).

Le faible pourcentage de coups comptés au niveau des pics d'élution de LTC<sub>4</sub> (pic VII), LTD<sub>4</sub> (pic IX) et LTE<sub>4</sub> (pic VIII) est difficile à interpréter et peut être plutôt considéré comme un bruit de fond.

2) La présence en quantité prépondérante de 12 HETE (pic V) est le reflet d'une importante contamination plaquettaire. Toutefois, nous ne pouvons exclure la production de 12 HETE par les monocytes humains.

3) 15 HETE (pic IV) est aussi présent dans le surnageant cellulaire. Pour confirmer qu'il s'agit bien d'un métabolite issu de l'activité catalytique d'une 15 lipoxygénase et non d'un métabolite issu de l'activité catalytique d'une 12 ou d'une 5 lipoxygénase dégradée, il faudrait mettre en évidence dans les monocytes l'ARNm codant pour la 15 lipoxygénase comme nous l'avons fait pour la 5 lipoxygénase.

Nous constatons de plus que sur les deux échantillons étudiés, l'un contenant 10<sup>6</sup> cellules a utilisé plus d'acide arachidonique que l'autre contenant 5 10<sup>5</sup> (Figure 43). Ceci peut s'expliquer par:

- la qualité et la quantité des monocytes prélevés;
- la contamination plaquettaire variable d'un échantillon à l'autre. Le métabolisme de la lipoxygénase plaquettaire est plus important que celui des monocytes.

## CONCLUSION

Le monocyte tient une place prépondérante dans le développement des réactions inflammatoires et immunes. Parmi leurs multiples propriétés, ces cellules synthétisent et libèrent des eicosanoïdes issus des voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase. C'est en particulier une source importante de PGE<sub>2</sub> connue pour ses propriétés immunosuppressives.

Le métabolisme lipoxygénasique de ces cellules est, quant à lui, l'objet de ce travail. Nous avons isolé les monocytes humains du sang périphérique en ne passant par aucune étape d'adhérence pour limiter leur activation. En effet, l'adhérence des monocytes humains, en particulier au plastique ou au stroma endothélial, est reconnue comme l'un des événements prépondérants intervenant dans la modification de l'activité transcriptionnelle des monocytes. Elle s'accompagne en général d'une synthèse rapide par ces cellules de nombreux médiateurs surtout inflammatoires et de l'apparition du phénotype des macrophages. L'emploi d'anticorps dirigés contre certains récepteurs spécifiques de surface permettrait de confirmer que les cellules, sur lesquelles a porté notre étude, sont bien des monocytes et non pas des macrophages en cours de différenciation.

Nous avons ainsi mis en évidence dans ces cellules l'ARNm de la 5 lipoxygénase et avons confirmé ce résultat en révélant dans le surnageant cellulaire de monocytes incubés en présence d'acide arachidonique radiomarqué et d'ionophore, la présence de métabolites dihydroxylés et réduits produits sous l'action catalytique d'une 5 lipoxygénase. La synthèse et la libération par ces cellules de LTB<sub>4</sub> et de 5 HETE renforcent le rôle fondamental des monocytes dans l'inflammation et surtout dans l'immunosuppression.

Si une 15 lipoxygénase est exprimée par ces cellules comme le laisse supposer la présence de 15 HETE dans le surnageant cellulaire de monocytes incubés en présence d'acide arachidonique et d'ionophore, le monocyte sanguin serait alors

vraisemblablement impliqué dans l'oxydation des lipoprotéines et en particulier des LDL ("Low Density Lipoproteins").

Ce travail n'est que l'ébauche d'un vaste sujet de recherche. Il faudrait en effet confirmer nos résultats en travaillant sur des monocytes obtenus par élutriation, seule méthode permettant actuellement de limiter la contamination plaquettaire et susceptible de donner rapidement des quantités satisfaisantes de cellules. Il serait intéressant d'identifier la protéine 5 lipoxygénase dans ces cellules en utilisant des anticorps anti-5 lipoxygénase. Il faudrait mettre en évidence dans les monocytes l'ARNm codant pour la 15 lipoxygénase et la présence d'une protéine 15 lipoxygénase.

Alors s'ouvre une importante voie de recherche. Connaissant l'activité lipoxygénasique de ces cellules, il serait intéressant d'établir le profil lipoxygénasique de ces cellules, stimulées ou non, au cours du temps. La culture des monocytes serait réalisée dans des sacs de téflon qui limiteraient les phénomènes d'adhésion.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ABRAMSON S.L. and GALLIN J.I.**

IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes.  
*J. Immunol.* 1990, 144 : 625-630.

**ANDREESEN R., PICHT J. and LORH G.W.**

Primary cultures of human blood-borne macrophages grown on hydrophobic teflon membranes.  
*J. Immunol. Methods*, 1983, 56 : 294-304.

**ARRUDA S. and HO J.L.**

IL-4 receptor signal transduction in human monocytes is associated with protein kinase C translocation.  
*J. Immunol.*, 1992, 149 : 1258-1264.

**ARSLAN P., CORPS A.N., HESKETH T.R., METCALFE J.C. and POZZAN T.**

Cis-unsaturated fatty acids uncouple mitochondria and stimulate glycolysis in intact lymphocytes.  
*Biochem. J.*, 1984, 217 : 419-425.

**BABA A., SAKUMA S., OKAMOTO H., INOUE T. and IWATA H.**

Calcium induces membrane translocation of 12 lipoxygenase in rat platelets.  
*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 15790-15795.

**BACKE E., SCHWARTING R., GERDES J., ERNST M. and STEIN H.**  
Ber-Mac 3: a new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen.

*J. Clin. Pathol.*, 1991, 44 : 936-945.

**BALTER M.S., TOEWS G.B. and PETERS-GOLDEN M.**

Different patterns of arachidonate metabolism in autologous human blood monocytes and alveolar macrophages.  
*J. Immunol.*, 1989, 142 : 602-608.

**BASHEERUDDIN K., RECHTORIS C., MAZZONE T.**

Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 1992, 267 : 1219-1224.

**BATT A.M. et LIVERTOUX M.H.**

La biotransformation des médicaments et des toxiques.  
*Moniteur Internat*, 1991, 21 : 7-12.

**BECKER S., WARREN M.K. and HASKILL S.**

Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free culture.

*J. Immunol.*, 1987, 139 : 3703-3709.

**BEDNAR M.M., SCHWARTZMAN M., IBRAHAM N.G., McGIFF J.C. and MULLANE K.M.**

Conversion of arachidonic acid to two novel products by a cytochrome P 450-dependent mixed-function oxidase in polymorphonuclear leukocytes.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 123 : 581-588.

**BELL R.L., KENNERLY D.A., STANFORD N. and MAJERUS P.W.**

Diglyceride lipase : a pathway for arachidonate release from human platelets.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 3238-3241.

**BERNSTROM K. and HAMMARSTROM S.**

A novel leukotriene formed by transpeptidation of leukotriene E.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 109 : 800-804.

**BERRIDGE M.J.**

Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.

*Biochem. J.*, 1984, 220 : 345-360.

**BIGBY T.D. and HOLTZMAN M.J.**

Enhanced 5-lipoxygenase activity in lung macrophages compared to monocytes from normal subjects.

*J. Immunol.*, 1987, 138 : 1546-1550.

**BIGBY T.D. and MESLIER N.**

Transcellular lipoxygenase metabolism between monocytes and platelets.

*J. Immunol.*, 1989, 143 : 1948-1954.

**BILLAH M.M., LAPETINA E.G. and CUATRECASAS P.**

Phospholipase A<sub>2</sub> activity specific for phosphatidic acid.

*J. Biol. Chem.*, 1981, 256 : 5399-5403.

**BOCKMAN R.S.**

Prostaglandin production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages : synthesis dependent on in vitro culture conditions.

*Prostaglandins*, 1981, 21 : 9-25.

**BOREL J.P., RANDOUX A., MAQUART F.X., LE PEUCH C. and VALEYRE J.**

In *Biochimie Dynamique*, Ed Maloine Decarie, Paris Montréal, 1987.

**BORGEAT P. and SAMUELSSON B.**

Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes : unstable intermediate in formation of dihydroxy acids.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 3213-3217.

**BORGEAT P., FRUTEAU de LACLOS B., RABINOVITCH H., PICARD S., BRAQUET P., HEBERT J. and LAVIOLETTE M.**

Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C<sub>4</sub> on ionophore A23187 challenge.

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984, 74 : 310-315.

**BORGEAT P., NADEAU M. SALARI H., POUBELLE P. and FRUTEAU de LACLOS B.**

Leukotrienes : biosynthesis, metabolism and analysis.

*Advances in Lipid Research*, 1985, 21 : 47-77.

**BOTTAZZI B., POLENTARUTTI N., ACERO R., BALSARI A., BORASCHI D., GHEZZI P., SALMONA M. and MANTOVANI A.**

Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants.

*Science*, 1983, 220 : 210-212.

**BRAY R.A. and BRAHMI Z.**

Role of lipoxygenation in human natural killer cell activation.

*J. Immunol.*, 1986, 136 : 1783-1790.

**BRENNER R.R.**

The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals.

*Mol Cell Biochem*, 1974, 3 : 41-52

**BRYANT R.W., BAILEY J.M., SCHEWE T. and RAPOPORT S.M.**

Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid.

*J. Biol. Chem.*, 1982, 257 : 6050-6055.

**BURR G.O. and BURR M.M.**

On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition.

*J. Biol. Chem.*, 1930, 86 : 587-621.

**BURRALL B.A., CHEUNG M., CHIU A. and GOETZL E.J.**

Enzymatic properties of the 15 lipoxygenase of human cultured keratinocytes.

*J. Invest. Dermatol.*, 1988, 91 : 294-297.

**CAPDEVILLA J., CHACOS N., WERRINGLOER J., PROUGH R. and ESTABROOK R.**

Liver microsomal cytochrome P-450 and oxidative metabolism of arachidonic acid.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 78 : 5362-5366.

**CAPDEVILLA J., SNYDER G. and FALCK J.R.**

Arachidonic acid epoxigenase: a new member of the arachidonic acid cascade.

In *Microsomes and Drug Oxidations*, ed Bobois, Caldwell, Dematteis and Elcombe. Taylor and Francis, Philadelphia, 1985, 88-94.

**CAPDEVILLA J., YADAGIRI P., MANNA S. and FALCK J.R.**

Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P-450.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 141 : 1007-1011.

**CARROLL M.A., SCHWARTZMAN M., CAPDEVILLA J. FALCK J.R. and McGIFF J.C.**

Vasoactivity of arachidonic acid epoxides.

*Eur. J. Pharmacol.*, 1987, 138 : 281-283.

**CASHMAN J.R.**

Leukotriene biosynthesis inhibitors.

*Pharmac. Res. Rev.*, 1985, 253-261.

**CASHMAN J.R., LAMBERT C. and SIGAL E.**

Inhibitor of human leukocyte 5-lipoxygenase by 15-HPETE and related eicosanoids.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 155 : 38-44.

**CHABLE-RABINOVITCH H. et RIGAUD M.**

Oxygène et lipides

Dans : *Biologie des lipides chez l'homme, de la physiologie à la pathologie*. Ed. E. M. Inter, Paris, 1988, 114-122.

**CHACOS N., CAPDEVILLA J., FALCK J.R., MANNA S., MARTIN-WIXSTROM C., GILL S., HAMMOCK J. and ESTABROOK R.**

The reaction of arachidonic acid epoxides (epoxyeicosatrienoic acids) with a cytosolic epoxide hydrolase.

*Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 223 : 639-648.

**CHAPKIN R.S., SOMERS S.D. and ERICKSON K.L.**

Inability of murine peritoneal macrophages to convert linoleic acid into arachidonic acid : evidence of chain elongation.

*J. Immunol.*, 1988, 140 : 2350-2355.

**CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N.**

Single-step method of RNA isolation by acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction.

*Analytical Biochemistry*, 1987, 162 : 156-159.

**CHOUAIB S. WELTE K., MERTELSMANN R. and DUPONT B.**

Prostaglandin E<sub>2</sub> acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation : inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression.

*J. Immunol.*, 1985, 135 : 1172-1179.

**CLOHISY D.R., BAR-SHAVIT Z., CHAPPEL J.C., TEITELBAUM S.L.**

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor.

*J. Biol. Chem.*, 1987, 262 : 15922-15929.

**COFFMAN R.L., OHARA J., BOND M.W., CARTY J., ZLOTNICK A. and PAUL W.E.**

B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells.

*J. Immunol.*, 1986, 136 : 4538-4541.

**COGNY - VAN WEYDEVELT F.**

Médiateurs de l'inflammation synthétisés par les macrophages. Hétérogénéité cellulaire en terme de synthèse d'interleukine 1 et d'eicosanoïdes.

Mémoire en vu de l'obtention de la médaille d'or de l'internat du CHRU de Limoges. 1987.

**COLOTTA F., BORRE A., WANG J.M., TATTANELLI M., MADDALENA F., POLENTARUTTI N., PERI G. and MANTOVANI A.**

Expression for a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes.

*J. Immunol.*, 1992, 148 : 760-765.

**CONRAD D.J., KUHN H., MULKINS M., HIGHLAND E. and SIGAL E.**

Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89 : 217-221.

**COREY E.J., WRIGHT S.W. and MATSUDA S.P.T.**

Stereochemistry and mechanism of the biosynthesis of leukotriene A<sub>4</sub> from 5(S)-hydroperoxy-6(E),8,11,14(Z)-eicosatetraenoic acid. Evidence for an organoiron intermediate.

*J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111: 1452-1455.

**COUTURIER C., HAEFFNER-CAVAILLON N., CAROFF M., KAZATCHKINE M.D.**

Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes.

*J. Immunol.*, 1991, 147 : 1899-1904.

**CROOKE S.T., SARAU H., SAUSSY D. WINKLER J. and FOLEY J.**  
Signal transduction processes for the LTD<sub>4</sub> receptor.

*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 127-137.

**CUNNANE S.C., KEELING P.W.N., THOMPSON R.P. and CRAWFORD M.A.**

Linoleic acid and arachidonic acid metabolism in human peripheral blood leukocytes : comparison with the rat.

*Br. J. Nutr.*, 1984, 51 : 209-217.

**CZOP J.K. and AUSTEN K.F.**

Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their β-glucan receptor during phagocytosis.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82 : 2751-2755.

**DAHLEN S.E., BJORK J., HEDQVIST P., ARFORS K.E., HAMMARSTROM S., LINDGREN J.A. and SAMUELSSON B.**

Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in post capillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response.

*Proc Natl. Acad. Sci.*, 1981, 78 : 3887-3891.

**DAHLEN S.E., BJORCK T., KUMLIN M., GRANSTROM E. and HEDQVIST P.**

Studies of leukotrienes as mediators in the human lung in vitro.

*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 193-200.

**DAYRENS P., IVANOFF B. et FONTANGES R.**

Aspect actuel de l'inflammation. 1/ Le processus inflammatoire.  
Sem. Hôp. Paris, 1980, 56 : 791-796.

**DEGROOT J.J.M.C., GARSSEN G.J., VELDINK G.A.,  
VLIEGENTHART J.F.G. and BOLDINGH J.**

On the interaction of soybean lipoxygenase-1 and 13-L-hydroperoxylinoleic acid involving yellow and purple coloured enzyme species.  
*FEBS Letters*, 1975, 56 : 50-54.

**DELEBASSEE S., COGNY-VAN WEYDEVELT F. and GUALDE N.**

Effect of arachidonic acid metabolites on thymocyte tolerance.  
*Ann. NY Acad. Sci.*, 1988, 524 : 227-239.

**DENNIS E.A.**

Modification of the arachidonic acid cascade through phospholipase A<sub>2</sub> dependent mechanisms.

*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 217-223.

**DEWITT D.L., EL-HARITH E.A., KRAMER S.A., ANDREWS M.J.,  
YAO E.F., ARMSTRONG R.L. and SMITH W.L.**

The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases.

*J. Biol. Chem.*, 1990, 265 : 5192-5198.

**DHO S., GRINSTEIN S., CORCY E.J., SU W.G. and PACE-ASCIAK C.R.**

Hepoxilin A<sub>3</sub> induces changes in cytosolic calcium, intracellular pH and membrane potential in human neutrophils.

*Biochem. J.*, 1990, 266 : 63-68.

**DIETZ R., NASTAINCZYK W. and RUF H.H.**

Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G<sub>2</sub>.

*Eur. J. Biochem.*, 1988, 171 : 321-328.

**DINARELLO C.A., MARNOY S.O. and ROSENWASSER L.J.**

Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte activating factor.

*J. Immunol.*, 1983, 130 : 890-895.

**DIXON R.A.F., JONES R.E., DIEHL R.E., BENNETT C.D., KARGMAN S. and ROUZER C.A.**

Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85 : 416-420.

**DRAZEN J.M., AUSTEN K.F., LEWID R.A., CLARK D.A., GOTO G., MARFAT A. and COREY E.J.**

Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77 : 4354-4358.

**DUFF G.W.**

Is fever beneficial to the host: a clinical perspective.  
*Yale J. Biol. Med.*, 1986, 59 : 125-130.

**DUNHAM W.R., CARROLL R.T., THOMPSON J.F., SANDS R.H. and FUNK M.O.**

The initial characterization of the iron environment in lipoxygenase by Mössbauer spectroscopy.

*Eur. J. Biochem.*, 1990, 190 : 611-617.

**DVORAK A.M., DVORAK H.F., PETERS S.P., SCHULMAN E.S., MacGLASHAM D.W., PYNE K., HARVEY V.S., GALLI S.J. and LICHTENSTEIN L.M.**

Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells.

*J. Immunol.*, 1983, 131 : 2965-2976.

**EDENIUS C., KUMLIM M., BJORK T., ANGGARD A. and LINDGREN J.A.**

Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue.

*FEBS Letters.*, 1990, 272 : 25-28.

**EDENIUS C., STENKE L. and LINDGREN J.A.**

On the mechanism of transcellular lipoxin formation in human platelets and granulocytes.

*Eur. J. Biochem.*, 1991, 199 : 401-409.

**EKLUND B. and CARLSON L.A.**

Central and peripheral circulatory effects and metabolic effects of different prostaglandins given I.V. to man.

*Prostaglandins*, 1980, 20 : 333-347.

**EL BOUSTANI S., DESCOMPS B., MONNIER L., WARNANT J., MENDY F. and CRASTES de PAULET A.**

In vivo conversion of dihomo- $\gamma$ -linolenic acid into arachidonic acid in man.  
*Prog. Lip. Res.*, 1986, 25 : 67-71.

**ESSNER R., RHOADES K., Mc BRIDE W., MORTON D.L. and ECONOMOU J.S.**

IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes.  
*J. Immunol.*, 1989, 142 : 3857-3861.

**FARRAR W.L. and HUMES J.L.**

The role of arachidonic acid metabolism in the activities of interleukin 1 and 2.  
*J. Immunol.*, 1985, 135 : 1153-1159.

**FENTON M.J., BURAS J.A. and DONNELLY R.P.**

IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes.  
*J. Immunol.*, 1992, 149 : 1283-1288.

**FERRERI N.R., HOWLAND W.C. and SPIEGELBERG H.L.**

Release of leukotrienes C<sub>4</sub> and B<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgA and IgE.  
*J. Immunol.*, 1986, 136 : 4188-4193.

**FITZPATRICK F.A. and MURPHY R.C.**

Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid : formation and biological actions of "epoxygenase"- derived eicosanoids.  
*Pharmacol. Rev.*, 1989, 40 : 229-241.

**FITZSIMMONS B.J., ADAMS J., EVANS J.F., LEBLANC Y. and ROKACH J.**

The lipoxins : stereochemical identification and determination of their biosynthesis.  
*J. Biol. Chem.*, 1985, 260 : 13008-13012.

**FLO R.W., NAESS A., LUND-JOHANSEN F., MAEHLE B.O., SJURSEN H., LEHMANN V. and SOLBERG C.O.**

Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies.  
*J. Immunol. Methods*, 1991, 137 : 89-94.

**FORD-HUTCHINSON A.W.**

FLAP : a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes.  
*TIPS*, 1991 a, 121 : 68-70.

**FORD-HUTCHINSON A.W.**

Arachidonate 15-lipoxygenase : characteristics and potential biological significance.

*Eicosanoids*, 1991 b, 4 : 65-74.

**FUNK C.D., GUNNE H., STEINER H., IZUMI T. and SAMUELSSON B.**

Native and mutant 5-lipoxygenase expression in a baculovirus/insect cell system.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 : 2592-2596.

**FUNK C.D., FUNK L.B., FITZGERALD G.A. and SAMUELSSON B.**

Characterization of human 12-lipoxygenase genes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89 : 3962-3966.

**GAGNON L., FILION L.G., DUBOIS C. and ROLA-PLIESZCZYNSKI M.**

Leukotrienes and macrophage activation : augmented cytotoxic activity and enhanced interleukin 1, tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production.

*Agents Actions*, 1989, 26 : 141-147.

**GALLI S.J., DVORAK A.M., PETERS S.P., SCHULMAN E.S., MacGLASHAN D.W., ISOMURA T., PYNE K., HARVEY V.S., HAMMEL I., LICHTENSTEIN L.M. and DVORAK H.F.**

Lipid bodies : widely distributed cytoplasmic structures that represent preferential nonmembrane repositories of exogenous [<sup>3</sup>H]arachidonic acid incorporated by mast cells, macrophages and other cell types.

*Prost. Leuk. and Lipoxins*, 1985, 22 : 221-239.

**GARDINER P.J.**

Classification of prostanoid receptors.

*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 110-118.

**GOETZL E.J.**

Selective feed-back inhibition of the 5-lipoxygenation of arachidonic acid in human T-lymphocytes.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 111 : 344-350.

**GOLDMAN D.W. and GOETZL E.J.**

Selective transduction of human polymorphonuclear leukocyte functions by subsets of receptors for leukotriene B<sub>4</sub>.

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984, 74 : 373-377.

**GOLDYNE M.E. and STOBO J.D.**

Synthesis of prostaglandins by subpopulations of human peripheral blood monocytes.

*Prostaglandins*, 1979, 18 : 687-695.

**GOLDYNE M.E., BURNISH G.F., POUBELLE P. and BERGEAT P.**

Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes. Lipoxygenase related pathways.

*J. Biol. Chem.*, 1984, 259 : 8815-8819.

**GOODWIN J.S., WIIK A., LEWIS M., BANKHURST A.D. and WILLIAMS R.C.**

High-affinity binding sites for prostaglandin E on human lymphocytes.

*Cell Immunol.*, 1979, 43 : 150-159.

**GORDON S., KESHAV S. and CHUNG L.P.**

Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity.

*Curr. Opin. Immunol.*, 1988, 1 : 26-35.

**GRANSTROM E. and KUMLIN M.**

Metabolism of prostaglandins and lipoxygenase products: relevance for eicosanoid assay.

In *Prostaglandins and Related Substances : a practical approach*. Ed IRL press, Oxford, 1987, 5-27.

**GUALDE N., RIGAUD M. and BACH J.F.**

Stimulation of prostaglandin synthesis by the serum factor (FTS).

*Cell Immunol.*, 1982, 70 : 362-368.

**GUALDE N., CHABLE-RABINOVITCH H., MOTTA C., DURAND J., BENEYTOUT J.L. and RIGAUD M.**

Hydroperoxyeicosatetraenoic acids-potent inhibitors of lymphocyte responses.

*Biochim. Biophys. Acta*, 1983 a, 750 : 429-433.

**GUALDE N., RIGAUD M. and GOODWIN J.S.**

Induction of suppressor cells from human peripheral blood T cells by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE).

*Clin. Res.*, 1983 b, 31 : 490A.

**GUALDE N. ATLURU D. and GOODWIN J.S.**

Effect of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on proliferation of human T cells and T cells subsets.

*J. Immunol.*, 1985, 134 : 1125-1129.

**GUALDE N.**

La réaction inflammatoire : une défense agressive.  
*La Recherche*, 1986, 17 : 623-635.

**HADJIGAPIOU C. and SPECTOR A.A.**

12-Hydroxy eicosatetraenoic acid reduces prostaglandin production by endothelial cells.  
*Prostaglandins*, 1986, 31 : 1135-1144.

**HAEGGSTROM J., MEIJER J. and RADMARK O.**

Leukotriene A<sub>4</sub>. Enzymatic conversion into 5,6-dihydroxy-7,9,11,14-eicosatetraenoic acid by mouse liver cytosolic epoxide hydrolase.  
*J. Biol.Chem.*, 1986, 261 : 6332-6337.

**HAMBERG M. and SAMUELSSON B.**

Novel transformation of arachidonic acid in human platelets.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71 : 3400-3405.

**HAMBERG M. and HAMBERG G.**

On the mechanism of the oxygenation of arachidonic acid by human platelet lipoxygenase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 95 : 1090-1097.

**HAMILTON J.A., WHITTY G.A., ROYSTON A.K.M., CEBON J. and LAYTON J.E.**

Interleukin -4 suppresses granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in stimulated human monocytes.  
*Immunology*, 1992, 76 : 566-571.

**HANSSON A., SERHAN C.N., HAEGGSTROM J., INGELMAN - SUNDBERG M. and SAMUELSSON B.**

Activation of protein kinase C by lipoxin A and other eicosanoids. Intracellular action of oxygenation products of arachidonic acid.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 134 : 1215-1222.

**HART P.H., JONES C.A. and FINLAY-JONES J.J.**

Interleukin-4 suppression of monocyte tumour necrosis factor- $\alpha$  production. Dependence on protein sythesis but not cyclic AMP production.  
*Immunology*, 1992, 76 : 560-565.

**HASKILL S., JOHNSON C., EIERMAN D., BECKER S. and WARREN K.**

Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-endogenes.  
*J. Immunol.*, 1988, 140 : 1690-1694.

**HENRY J.C.**

Les prostaglandines.

*Inf. Scientif. Biol.*, 1988, 14 :121-131.

**HEYWORTH C.M., VALLANCE S.J., WHETTON A.D. and DEXTER T.M.**

The biochemistry and biology of myeloid haemopoietic cell growth factors.

*J. Cell. Sci. Suppl.*, 1990, 13 : 57-74.

**HIRATA F.**

Molecular mechanisms of the modulation of phospholipid metabolism by glucocorticoids.

In *Prostaglandins Leukotrienes and Lipoxins*, BAILEY J.M., Ed. Plenum, New York, 1985, 119-124.

**HOFFMAN T., LIZZIO E.F., SUISSA J., ROTROSEN D., SULLIVAN J.A., MANDELL G.L. and BONVINI E.**

Dual stimulation of phospholipase activity in human monocytes. Role of calcium-dependent and calcium-independent pathways in arachidonic acid release and eicosanoid formation.

*J. Immunol.*, 1988, 140 : 3912-3918.

**HOFFMAN T., BRANDO C., LIZZIO E.F., LIM LEE Y., HANSEN M., TRIPATHI A.K., TAPLITS M., PURI J., BONVINI E., ABRAHAMSEN T.G., CARTER C.S., REID G.K. and EVANS J.**

Calcium-dependent eicosanoid metabolism by concanavalin A-stimulated human monocytes in vitro. Synergism with phorbol ester indicates separate regulation of leukotriene B<sub>4</sub> synthesis and release.

*J. Immunol.*, 1991, 146 : 692-700.

**HOLTZMAN M.J., PRYDE L.L. and TURK J.**

Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease.

*Am. Rev. Resp. Dis.*, 1991, 143 : 188-203.

**HORIGUCHI J., WARREN M.K. and KUFÉ D.**

Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

*Blood*, 1987, 69 : 1259-1261.

**HOWARD M., FARRAR J., HILFIKER M., JOHNSON B., TAKATSU K., HAMAOKA T. and PAUL W.E.**

Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2.

*J. Exp. Med.*, 1982, 155 : 914-923.

**HUDACK S.A., GOLLNICK S.O., CONRAD D.H. and KEHRY M.R.**  
Murine B cell stimulatory factor 1 (Interleukin 4) increases expression of the Fc Receptor for IgE on mouse B cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84 : 4606-4610.

**HU-LI J., SHEVACH E.M., MIZUGUCHI J., OHARA J., MOSMANN T. and PAUL W.E.**  
B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes.  
*J. Exp. Med.*, 1987, 165 : 157-172.

**HUMES J.L., OPAS E.E., GALAVAGE M., SODERMAN D. and BONNEY R.J.**  
Regulation of macrophage eicosanoid production by hydroperoxy- and hydroxy-eicosatetraenoic acids.  
*Biochem. J.*, 1986, 233 : 199-206.

**ISHII S., NOGUCHI M., MIYANO M., MATSUMOTO T. and WOMA M.**  
Mutagenesis studies on the amino acid residues involved in the iron-binding and the activity of human 5-lipoxygenase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 182 : 1482-1490.

**JAKOBSSON P.J., ODLANDER B. and CLAESSION H.E.**  
Effects of monocyte-lymphocyte interaction on the synthesis of leukotriene B<sub>4</sub>.  
*Eur. J. Biochem.*, 1991, 196 : 395-400.

**JAKOBSSON P.J., STEINHILBER D., ODLANDER B., RADMARK H.E. and CLAESSION H.E.**  
On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89 : 3521-3525.

**JOHNSTON R.B.**  
Monocytes and macrophages.  
*New Engl. J. Med.*, 1988, 318 : 747-752.

**KARTHEIN R., DIETZ R., NASTAINCZYK W. and RUF H.H.**  
Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction.  
*Eur. J. Biochem.*, 1988, 171 : 313-320.

**KHANSARI N., CHOU Y.K. and FUDENBERG H.H.**  
Human monocyte heterogeneity : interleukin 1 and prostaglandin E<sub>2</sub> production by separate subsets.  
*Eur. J. Immunol.*, 1985, 15 : 48-51.

**KISS Z.**

Determination of phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine.  
*Lipids*, 1991, 26: 321-323.

**KRAGBALLE K., DUELL E.A. and VOORHES J.J.**

Selective decrease of 15-hydroxy eicosatetraenoic acid formation in uninvolved psoriatic dermis.  
*Arch. Dermatol.*, 1986, 122: 877-880.

**KRAMER R.M., JOHANSEN B., HESSION C. and BLAKE-PEPINSKY A.**

Characterization of secretable phospholipase A<sub>2</sub> from human platelets.  
*Adv. Prost. Throm. Leuk. Res.*, 1990, 20: 79-86.

**KRAMER R.M., ROBERTS E.F., MANETTA J. and PUTNAM J.E.**

The Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> is a 100-kDa protein in human monoblasts U 937 cells.  
*J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 5268-5272.

**KRELL R.D., AHARONY D., BUCKNER C.K. and KUSNER E.J.**

Peptide leukotriene receptors and antagonists.  
*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20: 119-126.

**KREUTZ M., KRAUSE S.W., HENNEMAN B., REHM A. and ANDREESEN R.**

Macrophage heterogeneity and differentiation defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro.  
*Res. Immunol.*, 1992, 143: 107-115.

**KUHN H., HOLZHUTTER H.G., SCHEWE T., HIEBSCH C. and RAPOPORT S.M.**

Mechanism of inactivation of lipoxygenase by acetylenic fatty acids.  
*FEBS Letters*, 1984, 139: 577-583.

**KUHN K., TANKRED S. and RAPOPORT S.**

The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes.  
In : MEISTEIR A., *Advances in Enzymology and related areas of molecular biology*, Wiley et Sons, New York, 1986, 58: 273-311.

**KUHN H., SPRECHER H. and BRASH A.R.**

On singular or dual positional specificity of lipoxygenases : the number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme.

*J. Biol. Chem.*, 1990 a, 265 : 16300-16305.

**KUHN H., BELKNER J., WIESNER R. and BRASH A.R.**

Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase.

*J. Biol. Chem.*, 1990 b, 265 : 18351-18361.

**KUJUBU D.A., FLETCHER B.S., VARNUM B.C., LIM R.W. and HERSCHMAN H.R.**

TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue.

*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 12866-12872.

**KULMACZ R.J., TSAI A.L. and PALMER G.**

Heme spin states and peroxide - induced radical species in prostaglandin H synthase.

*J. Biol. Chem.*, 1987, 262 : 10524-10531.

**KUNKEL S.L., CHENSUE S.W. and PHAN S.H.**

Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production.

*J. Immunol.*, 1986, 136 : 186-192.

**LAGES B., MALMSTEN C., WEISS H.J. and SAMUELSSON B.**

Impaired platelet response to thromboxane A<sub>2</sub> and defective calcium mobilisation in a patient with a bleeding disorder.

*Blood*, 1981, 57 : 545-552.

**LANIADO-SCHWARTZMAN M., DAVIS K., McGIFF J., LEVERE R. and ABRAHAM N.**

Purification and characterization of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid epoxygenase from human liver.

*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 2536-2542.

**LE BARON F. et DUTHILLEUL P.**

Lignée granulocytaire et lignée des phagocytes mononucléés: cytologie et cytochimie.

*Moniteur Internat*, 1987, 1 : 23-26.

**LEE C.W., LEWIS R.A., COREY E.J., BARTON A., OH H., TAUBER A.I. and AUSTEN K.F.**

Oxidative inactivation of leukotriene C<sub>4</sub> by stimulated human polymorphonuclear leukocytes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79: 4166-4170.

**LEE C.W., LEWIS R.A., COREY E.J. and AUSTEN K.F.**

Conversion of leukotriene D<sub>4</sub> to leukotriene E<sub>4</sub> by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leukocytes.

*Immunology*, 1983, 48: 27-35.

**LEGROS G.S., LE GROS J.E. and WATSON J.D.**

The induction of lymphokine synthesis and cell growth in IL-3 dependent cell lines using antigen-antibody complexes.

*J. Immunol.*, 1987, 139: 422-428.

**LEFKOWITZ R.J., MULLIKIN D., WOOD C.L., GORE T.B. and MUKHERJEE C.**

Regulation of prostaglandin receptors by prostaglandins and guanine nucleotides in frog erythrocytes.

*J. Biol. Chem.*, 1977, 252: 5295-5303.

**LEWIS R.A. and FRANK-AUSTEN K.**

Molecular determinants for functional responses to the sulfidopeptide leukotrienes: metabolism and receptor subclasses.

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984, 74: 369-372.

**LEWIS R.A., FRANK-AUSTEN K. and SOBERMAN R.J.**

Leukotrienes and other products of 5-lipoxygenase pathway.

*New Eng. J. Med.*, 1990, 323: 645-655.

**LOCKSLEY R.M. and KLEBANOFF S.J.**

Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa.

*J. Cell Biochem.*, 1983, 22: 173-185.

**LONDON L. and McKEARN J.P.**

The dual regulatory role of interleukin 4 is mediated through a direct effect on the target cell.

*Exp. Hematol.*, 1990, 18: 1059-1063.

**LU A.Y.H. and WEST S.B.**

Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450.

*Pharmacol. Rev.*, 1980, 31: 277-295.

**MAAS R.L., BRASH A.R. and OATES J.A.**

A second pathway of leukotriene biosynthesis in porcine leukocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78 : 5523-5527.

**MACLOUF J., FRUTEAU DE LACLOS B. and BERGEAT P.**

Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy eicosatetraenoic acid.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79 : 6042-6046.

**MALCOM K., FALCK J.R. and FITZPATRICK F.A.**

Novel eicosanoids generated by cytochrome P-450 : effects on platelet aggregation and protein phosphorylation.  
*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 87-94.

**MALE D., CHAMPION B., COOKE A.**

Inflammation.

Dans *Immunologie : le système immunitaire et sa régulation*. W.H. FRIDMAN, Eds. Medsi/McGraw-Hill, 1987, 15 : 15.1-15.12.

**MALMSTEN C.L.**

Leukotrienes : mediators of inflammation and immediate hypersensitivity reactions.

*CRC Crit. Rev. Immunol.*, 1984, 4 : 307-334.

**MARCUS A., SAFIER B., ULLMAN H., BROEKMAN M., ISLAM N., OGLESBY T. and GORMAN R.**

12(S)-20-Dihydroxyeicosatetraenoic acid : a new eicosanoid synthesized by neutrophils from 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid produced by thrombin or collagen stimulated platelets.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 : 903-907.

**MARON Z., SHELFHAMER J.H., BACH M.K., MORTON D.R. and KALINER M.**

Slow-reacting substances, leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>, increase the release of mucus from human airways in vitro.

*Am. Rev. Respir. Dis.*, 1982, 126 : 449-451.

**MARTIN A., AUDRAN R., COLLET B., LANCIEN G. and TOUJAS L.**

Monoclonal antibody AMH 152 reacts with human monocytes in culture and with inflammatory macrophages.

*Res. Immunol.*, 1992, 143 : 39-47.

**MASSON R.R. and WEINER R.S.**

Application of the Beckman JE6-B Elutriator System in the isolation of human monocyte subpopulations.

*Scand. J. Heamatol.*, 1985, 34 : 5-8.

**MAUER U., BURGER R., VON STELDERN D., BITTER-SUERMAN D. and HADDING U.**

Expression of Ia antigens on macrophages is reduced after stimulation with homologous C3b.

*J. Immunol.*, 1984, 132 : 2802-2806.

**MAYER B., MOSER R., GLEISPACH H. and KUKOVETZ W.R.**

Possible inhibitory function of endogenous 15-hydroperoxy eicosatetraenoic acid on prostacyclin formation in bovine aortic endothelial cells.

*Biochem. Biophys. Acta*, 1986, 875 : 641-654.

**MERLIE J.P., FAGAN D., MUDD J. and NEEDLEMAN P.**

Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase).

*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 3550-3553.

**METCALF D.**

Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular and clinical aspects.

*Science*, 1991, 254 : 529-533.

**MIDOUX P., PETIT C., PELLEN P., TOUJAS L., MONSIGNY M. and ROCHE A.C.**

Macrophage antigens associated with adhesion: identification by a monoclonal antibody specific for Lewis lung carcinoma cells.

*Exp. Cell Res.*, 1989, 183 : 168-178.

**MILLER L.J., BAINTON D.F., BORREGAARD N. and SPRINGER T.A.**

Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p 150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface.

*J. Clin. Invest.*, 1987, 80 : 535-544.

**MINKES M., STANFORD N., CHI M.M. ROTH G.J. RAZ A., NEEDLEMAN P. and MAJERUS P.W.**

Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate inhibits the availability of arachidonate to prostaglandin synthetase in human platelet suspensions.

*J. Clin. Invest.*, 1977, 59 : 449-454.

**MONCADA S., FLOWER R.J. and VANE J.R.**

Prostaglandins, prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub>.

In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman L.S., Gilman A., New York, Macmillan, 1980, 668-681.

**MOORES K.E. and MERRITT J.E.**

Lipoxin A<sub>4</sub> elevates cytosolic calcium in human neutrophils.

*Eicosanoids*, 1991, 4 : 89-94.

**MUALLEM S., MERRIT B.S., GREEN J., KLEEMAN C.R. and YAMAGUCHI D.T.**

Classification of prostaglandin receptors based on coupling to signal transduction systems.

*Biochem. J.*, 1989, 263 : 769-774.

**MUSSON R.A.**

Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzyme and nonspecific esterase activity.

*Am. J. Pathol.*, 1983, 111 : 331-340.

**NATHAN C.F.**

Secretory products of macrophages.

*J. Clin. Invest.*, 1987, 79 : 319-326.

**NAVARATNAM S., FEITERS M.C., AL-HAKIM M., ALLEN J.C., VELDINK G.A. and VLIEGENTHART J.F.G.**

Iron environment in soybean lipoxygenase-1.

*Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 956 : 70-76.

**NEEDLEMAN P., RAZ A., MINKES M.S., FERRENDELLI J.A. and SPRECHER H.**

Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane synthesis and unique biological properties.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76 : 944-948.

**NELSON M.J., BATT D.G., THOMPSON J.S. and WRIGHT S.W.**

Reduction of the active-site iron by potent inhibitors of lipoxygenases.

*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 8225-8229.

**NICHOLS R.C. and VANDERHOECK J.Y.**

5-hydroxyeicosanoids selectively stimulate the human neutrophil 15-lipoxygenase to use endogenous substrate.

*J. Exp. Med.*, 1990, 171 : 136-175.

**NISHIZUKA Y.**

The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.

*Nature*, 1988, 334 : 661-665.

**NOELLE R., KRAMMER P.H., OHARA J., UHR J.W. and VITETTA E.S.**

Increased expression of Ia antigens on resting B cells. An additional role for B-cell growth factors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 : 6149-6153.

**NORRIS D.A., MORRIS R.M., SANDERSON R.J. and KOHLER P.F.**

Isolation of functional subsets of human peripheral blood monocytes.

*J. Immunol.*, 1979, 123 : 166-172.

**ODINK K., CERLETTI N., BRUGGEN J., CLERC R.G., TARCSAY L., ZWALDO G., GERHARDS G., SCHLEGEL R. and SORG C.**

Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis.

*Nature*, 1987, 330 : 80-82.

**OHARA J. and PAUL W.E.**

Up regulation of interleukin 4 / B-cell stimulatory factor 1 receptor expression.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85 : 8221-8225.

**OKITA R., SOBERMAN R., BERGHOLTE J., MASTERS B.S., HAYES R. and MURPHY R.C.**

$\omega$ -Hydroxylation of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by lung microsomes from pregnant rabbits.

*Mol. Pharmacol.*, 1988, 32 : 706-709.

**OLIW E.H. and OATES J.A.**

Rabbit renal cortical microsomes metabolize arachidonic acid to trihydroxyeicosatrienoic acids.

*Prostaglandins*, 1981, 22 : 863-871.

**OLIW E.**

Isolation and chemical conversion of two novel prostaglandin endoperoxides : 5(6)-epoxy-PGG<sub>1</sub> and 5(6)-epoxy-PGH<sub>1</sub>.

*FEBS Letters*, 1984, 172 : 279-293.

**ORNING L., KAIJSER L. and HAMMARSTROM S.**

In vivo metabolism of leukotriene C<sub>4</sub> in man: urinary excretion of leukotriene E<sub>4</sub>.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 130 : 214-220.

**PACE-ASCIAK C.R. and MARTIN J.M.**

Hepoxiline, a new family of insulin secretagogues formed by intact rat pancreatic islets.

*Prostaglandins Leukotrienes Med.*, 1984, 16: 173-180.

**PACE-ASCIAK C.R. and ASOTRA S.**

Biosynthesis, catabolism and biological properties of HPETEs, hydroperoxide derivatives of arachidonic acid.

*Free Radic. Biol. Med.*, 1989, 7: 409-433.

**PAGEL W.R., SACHS R.J., MARNETT L.J., DEWITT D.L., DAY J.A. and SMITH W.L.**

Immunochemical evidence for the involvement of prostaglandin H synthase in hydroperoxide - dependent oxidations by ram seminal vesicle microsomes.

*J. Biol. Chem.*, 1983, 258: 6517-6523.

**PANOSSIAN A., HAMBERG M. and SAMUELSSON B.**

On the mechanism of biosynthesis of leukotrienes and related compounds.

*FEBS Letters*, 1982, 150: 511-513.

**PARKER C.W., KOCH D., HUBER M.M. and FALKENHEIN S.F.**

Formation of the cysteinyl form of slow reacting substance (Leukotriene E<sub>4</sub>) in human plasma.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 97: 1038-1046.

**PASSWELL J.H., DAYER J.M. and MERLER E.**

Increased prostaglandin production by human monocytes after membrane receptor activation.

*J. Immunol.*, 1979, 123: 115-120.

**PATRONO C., PUGLIESE F., CIABATTONI G., PATRIGNANI P., MASERI A., CHERCHIA S., PESKAR B.A., CINOTTI G.A., SIMONETTI B.M. and PIERUCCI A.**

Evidence of a direct stimulatory effect of prostacyclin on renin release in man.

*J. Clin. Invest.*, 1982, 69: 231-239.

**PAWLOWSKI N.A., KAPLAN G., HAMILL A.L., COHN Z.A. and SCOTT W.A.**

Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures.

*J. Exp. Med.*, 1983, 158: 393-412.

**PELTIER A.P.**

Physiopathologie de l'inflammation et ses implications pour l'utilisation et les perspectives d'avenir des AINS.

*La Revue du Praticien*, 1987, 41 : 2463-2469.

**PERCIVAL M.D.**

Human 5-lipoxygenase contains an essential iron.

*J. Biol. Chem.*, 1991, 266 : 10058-10061.

**PERNAS P., MASLIAH J., OLIVIER J.L. et BEREZIAT G.**

Les phospholipases A<sub>2</sub> cellulaires, relations structures-fonction.

*C.R. Soc. Biol.*, 1991, 185 : 21-30.

**PETERS S.P., SIEGEL M.I., SOBOTKA A.K. and LICHTENSTEIN L.M.**

Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils.

*Nature*, 1981, 292 : 455-457.

**PETERS-GOLDEN M. and SHELLY C.**

Inhibitory effect of exogenous arachidonic acid on alveolar macrophage 5-lipoxygenase metabolism. Role of ATP depletion.

*J. Immunol.*, 1988, 140 : 1958-1966.

**PETTIPHER E.R. and WHITTLE B.J.R.**

Prostaglandins.

In *Encyclopedia of Immunology*, Eds Roitt I.M., Delves P.J., Academic Press, 1992, 1279-1282.

**PLANT M., PIERCE J.H., WATSON C.J., HANLEY-HYDE J., NORDAN R.P. and PAUL W.E.**

Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FCεRI or to calcium ionophores.

*Nature*, 1989, 339 : 64-67.

**PONDER J.W. and RICHARDS F.M.**

Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes.

*J. Mol. Biol.*, 1987, 193 : 775-791.

**PONZONI M., MONTALDO P.G. and CORNAGLIA-FERRARIS P.**

Stimulation of receptor - coupled phospholipase A<sub>2</sub> by interferon-γ.

*FEBS Letters*, 1992, 310 : 17-21.

**POWELL W.S.**

Properties of leukotriene B<sub>4</sub> 20-hydroxylase from polymorphonuclear leukocytes.

*J. Biol. Chem.*, 1984, 259 : 3082-3089.

**POWELL W.S.**

High- pressure liquid chromatography in the analysis of arachidonic acid metabolites.

In *Prostaglandins and Related Substances: a practical approach*. Ed IRL press, Oxford, 1987, 75-98.

**PULFORD K.A.F., RIGNEY E.M., MICKLEM K.J., JONES M., STROSS W.P., GATTER K.C. and MASON D.Y.**

KP1 : a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections.

*J. Clin. Pathol.*, 1989, 42 : 414-421.

**RABINOVITCH-CHABLE H.**

Métabolisme oxygéné d'acides gras polydésaturés par le macrophage péritonéal de souris (identification d'acides gras monohydroxyés et hydroxyépoxyés).

Thèse de Doctorat es Science Pharmaceutiques, N° 179, Université C. Bernard, Lyon I, 1981.

**RADMARK O., SHIMIZU T., JORNVAL H. and SAMUELSSON B.**

Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human leukocytes : purification and properties.

*J. Biol. Chem.*, 1984, 259 : 12339-12345.

**REGOLI D. and BARABE J.**

Pharmacology of bradykinin and related kinins.

*Pharmacol. Reviews*, 1980, 32 : 1-46.

**RIENDEAU D. and LEBLANC Y.**

Modulation of rat polymorphonuclear leukocyte 5 lipoxygenase activity by 5-hydroperoxy eicosatetraenoic acid and NADH-dependent flavin inhibition.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 141 : 534-540.

**ROBERT A.**

Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins.

*Adv. Prost. Thromb. Res.*, 1976, 2 : 507-520.

**ROLA-PLESZCZYNSKI M.**

Differential effects of leukotriene B<sub>4</sub> on T<sub>4</sub><sup>+</sup> and T<sub>8</sub><sup>+</sup> lymphocyte phenotype and immunoregulatory functions.

*J. Immunol.*, 1985, 135 : 1357-1360.

**ROLA-PLESZCZYNSKI M.**

Arachidonic acid and the leukotrienes.

In *Encyclopedia of Immunology*, Eds Roitt I.M., Delves P.J., Academia press, 1992, 155-158.

**ROSSI A.G. and O'FLAHERTY J.T.**

Prostaglandin binding sites in human polymorphonuclear neutrophils.

*Prostaglandins*, 1989, 37 : 641-653.

**ROUZER C.A. and SAMUELSSON B.**

On the nature of 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes : enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82 : 6040-6044.

**ROUZER C.A., MATSUMOTO T. and SAMUELSSON B.**

Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> synthetase activities.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83 : 857-861.

**ROUZER C.A. and KARGMAN S.**

Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187.

*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 10980-10988.

**RYAN G.B. and SPECTOR W.G.**

Macrophages turnover in inflamed connective tissue.

*Proc. Roy. Soc. B.*, 1970, 175 : 269-292.

**SAMUELSSON B.**

Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.

*Adv. Prost. Leuk. Res.*, 1983, 11 : 1-13.

**SAMUELSSON B., DAHLEN S.E., LINDGREN J.A., ROUZER C.A. and SERHAN C.N.**

Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects.

*Science*, 1987, 237 : 1171-1176.

**SCHAD V.C. and PHIPPS R.P.**

Two signals are required for accessory cells to induce B cell unresponsiveness: tolerogenic Ig and prostaglandin.

*J. Immunol.*, 1988, 141 : 79-84.

**SCHAFFER A.I., COOPER B., O'HARA D. and HANDIN R.I.**  
Identification of platelet receptors for prostaglandin I<sub>2</sub> and D<sub>2</sub>.  
*J. Biol. Chem.*, 1979, 254 : 2914-2917.

**SCHEWE T., RAPOPORT S.M. and KUHN H.**  
Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenase.  
*Advance in enzymology and related areas of molecular biology*, 1986, 58 : 191-272.

**SCHICK P.K., SCHICK B.P., FOSTER K. and BLOCK A.**  
Arachidonate synthesis and uptake in isolated guinea-pig megakaryocytes and platelets.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 795 : 341-347.

**SCHNYDER J., DEWALD B. and BAGGIOLINI M.**  
Effects of cyclooxygenase inhibitors and prostaglandin E<sub>2</sub> macrophage activation in vitro.  
*Prostaglandins*, 1979, 22 : 411-416.

**SCOTT T. and EAGLESON M.**  
*Concise Encyclopedia Biochemistry* - 2<sup>nd</sup> eds. Eds Scott, Eagleson - Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1988.

**SEILHAMER J.J., PRUZANSKI W., VADAS P., PLANT S., MILLER J.A., KLOSS J. and JONHSON L.K.**  
Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid.  
*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 5335-5338.

**SERHAN C.N., SHEPPARD K.A. and FIORE S.**  
Lipoxin formation : evaluation of the role and actions of leukotriene A<sub>4</sub>.  
*Adv., Prost. Thromb., Leuk. Res.*, 1990, 20 : 54-62.

**SHAK S. and GOLDSTEIN I.**  
 $\omega$ -oxidation is the major pathway for the catabolism of leukotriene B<sub>4</sub> in human polymorphonuclear leukocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 1984, 259 : 10181-10187.

**SHIBATA D., STECZKO J., DIXON J.E., ANDREWS P.C., HERMODSON M. and AXELROD B.**  
Primary structure of soybean lipoxygenase L-2.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 6816-6821.

**SIEGEL M.I., McCONNELL R.T., ABRAHAM S.L., PORTER N.A. and CUATRECASAS P.**

Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and cyclooxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 89 : 1273-1280.

**SIGAL E.**

The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism.  
*Am. J. Physiol.*, 1991, 260 : L13-L28.

**SILVERSTEIN R.L. and NACHMAN R.L.**

Thrombospondin binds to monocyte-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion.  
*J. Clin. Invest.*, 1987, 79 : 867-874.

**SLOANE D.L., LEUNG R., CRAIK C.S. and SIGAL E.**

A primary determinant for lipoxygenase positional specificity.  
*Nature*, 1991, 354 : 149-152.

**SLUITER W., HULSING-HESELINK E., ELZENGA-CLAASEN I., VAN HEMSBERGEN-OOMENS L.W.M., VAN DER VOORT VAN DER KLEIJ-VAN ANDEL A. and VAN FURTH R.**

Macrophages as origin of factor increasing monocytopoiesis.  
*J. Exp. Med.*, 1987, 166 : 909-922.

**SMITH W.L. and GARCIA-PEREZ. A.**

A two-receptor model for the mechanism of action of prostaglandins in the renal collecting tubule.  
In, *Prostaglandins, Leukotrienes and lipoxins*, Bailey J.M. Ed. Plenum, New York, 1985 : 35-45.

**SMITH W.L., DEWITT D.L., KRAEMER S.A., ANDREWS M.J., HLA T., MACIAG T. and SHIMOKAWA T.**

Structure - function relationships in sheep, mouse and human prostaglandin endoperoxide G/H synthases.  
*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 14-21.

**SNYDER F.**

Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor: a novel class of acetylated ether-linked choline-phospholipids.  
*Med. Res. Rev.*, 1985, 5 : 107-140.

**SNYDER F.**

In: *Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators*. Plenum, New York, 1987.

**SOBERMAN R.J., HARPER T.W., BETTERIDGE D., LEWIS R.A. and AUSTEN K.F.**

Characterization and separation of the arachidonic acid 5-lipoxygenase and linoleic acid omega-6 lipoxygenase (arachidonic acid 15-lipoxygenase) of human polymorphonuclear leukocytes.

*J. Biol. Chem.*, 1985 a, 260 : 4508-4515.

**SOBERMAN R.J., HARPER T.W., MURPHY R.C. and AUSTEN K.F.**  
Identification and functional characterization of leukotriene B<sub>4</sub> 20-hydroxylase of human polymorphonuclear leukocytes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985 b, 82 : 2292-2295.

**SOBERMAN R.J., SUTYAK J.P., OKITA R.T., WENDELBORN D.F., ROBERTS L.J. III, and AUSTEN K.F.**

The identification and formation of 20-aldehyde leukotriene B<sub>4</sub>.

*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 7996-8002.

**SPANNHAKE E.W.M., HYMAN A.L. and KADOWITZ P.J.**  
Bronchoactive metabolites of arachidonic acid and their role in airway function.

*Prostaglandins*, 1981, 22 : 1013-1026.

**SPECTOR W.G., HEESOM N. and STEVENS J.E.**

Factors influencing chronicity in inflammation of rat skin.

*J. Path. Bact.*, 1968, 96 : 203-213.

**SPORN P.H., MARSHALL T.M. and PETERS-GOLDEN M.**

Differential dependence on protein kinase C of arachidonic acid metabolism stimulated by hydrogen peroxide and by zymosan in the alveolar macrophage.

*Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1047 : 187-191.

**STENE D.O. and MURPHY R.C.**

Metabolism of leukotriene E<sub>4</sub> in isolated rat hepatocytes : identification of  $\beta$ -oxidation products of sulfidopeptide leukotrienes.

*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 2773-2778.

**STUEHR D.J. and MARLETTA M.A.**

Induction of nitrite/nitrate synthetis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon-gamma.

*J. Immunol.*, 1987, 139 : 518-525.

**SUTYAK J., AUSTEN K.F. and SOBERMAN R.J.**

Identification of an aldehyde dehydrogenase in the microsomes of human polymorphonuclear leukocytes that metabolizes 20-aldehyde leukotriene B<sub>4</sub>.

*J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 14818-14823.

**TATE S.S. and MEISTER A.**

$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase : catalytic, structural and functional aspects.  
*Moll. Cell. Biochem.*, 1981, 39 : 357-368.

**TE VELDE A.A., KLOMP J.P.G., YARD B.A., DE VRIES J.E. and FIGDOR C.G.**

Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4.  
*J. Immunol.*, 1988, 140 : 1548-1553.

**TE VELDE A.A., HUIJBENS J.F., DE VRIES J.E. and FIGDOR C.G.**  
IL-4 decreases Fc $\gamma$ R membrane expression and Fc $\gamma$ R mediated cytotoxic activity of human monocytes.

*J. Immunol.*, 1990, 144 : 3046-3051.

**THOMPSON P.A., JELINEK D.F. and LIPSKY P.E.**

Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E<sub>2</sub>.  
*J. Immunol.*, 1984, 133 : 2446-2453.

**TORNHAMRE S., GIGOU A., EDENIUS C., LELLOUCHE J.P. and LINDGREN J.A.**

Conversion of 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acids: A novel pathway for lipoxin formation by human platelets.  
*FEBS Letters.*, 1992, 304 : 78-82.

**UEDA N., YOKOYAMA C., YAMAMOTO S., FITZSIMMONS B.J., ROKACH J., OATES J.A. and BRASH A.R.**

Lipoxin synthesis by arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 149 : 1063-1069.

**UEDA N. and YAMAMOTO S.**

The 6 R-oxygenase activity of arachidonate 5-lipoxygenase purified from porcine leukocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 1937-1941.

**UGOLINI V., NUNEZ G., SMITH R.G., STASTNY P. and CAPRA J.D.**

Initial characterization of monoclonal antibodies against human monocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77 : 6764-6768.

**ULLRICH V. and HECKER M.**

A concept for the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis.  
*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1990, 20 : 95-101.

**UNANUE E.R. and ALLEN P.M.**

The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells.

*Science*, 1987, 236 : 551-557.

**VADAS P. and PRUZANSKI W.**

Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease.

*Lab. Invest.*, 1986, 55 : 391-404.

**VAN DEN-BOSCH H.**

Intracellular phospholipases A.

*Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 604 : 191-246.

**VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W. and BAILEY J.M.**

15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid: a potent and selective inhibitor of platelet-lipoxygenase.

*J. Biol. Chem.*, 1980 a, 255 : 5996-5998.

**VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W. and BAILEY J.M.**

Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid.

*J. Biol. Chem.*, 1980 b, 255 : 10064-10066.

**VANE J.R. and FERREIRA S.H.**

Inflammation.

In : *Handbook of experimental pharmacology*. VANE J.R., FERREIRA S.H., eds. New York, 1978, 87.

**VAN FURTH R. and SLUITER W.**

Distribution of blood monocytes between a marginating and circulating pool.

*J. Exp. Med.*, 1986, 163 : 474-479.

**VAN HAL P.T.W., HOPSTAKEN-BROOS J.P.M., WIJKHUIJS J.M.,  
TE VELDE A.A., FIGDOR C.G. and HOOGSTEDEN H.C.**

Regulation of aminopeptidase-N (CD13) and FcεR IIb (CD23) expression by IL-4 depends on the stage of maturation of monocytes/macrophages.

*J. Immunol.*, 1992, 149 : 1395-1401.

**VAN KRUIJF J.M.G., SEVENIAN A., HANDLEMAN G.J. and  
DRATZ E.A.**

A new role for phospholipase A<sub>2</sub>: protection of membrane from lipid peroxidation damage.

*Trends. Biochem. Sci.*, 1987, 12 : 31-34.

VANNIER E., MILLER L.C. and DINARELLO C.A.

Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: Interleukine 4 suppresses interleukin 1 production by up regulated gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 4076-4080.

VAN ROLLINS M., BAKER R.C., SPRECHER H.W. and MURPHY R.C.

Oxidation of decosahexaenoic acid by rat liver microsomes fortified with NADPH.

*J. Biol. Chem.*, 1984, 259: 5776-5783.

VERCELLI D., JABARA H.H., CUNNINGHAM-RUNDLES C., ABRAMS J.S., LEWIS D.B., MEYER J., SCHNEIDER L.C., LEUNG D.Y. and GEHA R.S.

Regulation of immunoglobulin (Ig)E synthesis in the hyper-IgE syndrome.

*J. Clin. Invest.*, 1990, 85: 1666-1671.

VICK B.A. and ZIMMERMAN D.C.

Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway.

In: *The Biochemistry of Plants : A comprehensive Treatise*. Eds Stumpf and Conn, Academic Press Inc., 1987, 9: 53-90.

VISSERS M.C.M., JESTER S.A. and FANTONE J.C.

Rapid purification of human peripheral blood monocytes by centrifugation through Ficoll-Hypaque and Sepracell-MN.

*J Immunol Methods*, 1988, 110: 203-207.

VITETTA E.S., OHARA J., MYERS C.D., LAYTON J.E., KRAMMER P.H. and PAUL W.E.

Serological, biochemical and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1.

*J. Exp. Med.*, 1985, 162: 1726-1731.

VON EULER U.S.

On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and certain animals. (Prostaglandin and vesiglandin).

*J. Physiol.*, 1936, 88: 213-234.

WAGTEVELD A.J., ZANTEN A.K., ESSELINK M.T., RUUD HALIE M. and VELLENGA E.

Expression and regulation of IL-4 receptors on human monocytes and acute myeloblastic leukemic cells.

*Leukemia*, 1991, 5: 782-788.

**WALSTRA P., VERHAGEN J., VELDINK G.A. and Vliegenthart J.F.G.**

12-lipoxygenase from bovine polymorphonuclear leukocytes on enzyme with leukotriene A<sub>4</sub> synthase activity.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 149 : 258-265.

**WATANABE Y. and JACOB C.O.**

Regulation of MHC class II antigen expression-opposing effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on IFN- $\gamma$ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell.

*J. Immunol.*, 1991, 146 : 899-905.

**WETTERHOLM A., HAEGGSTROM J., HAMBERG M., MEIJER J. and RADMARK O.**

14,15-Dihydroxy - 5,8,10,12-eicosatetraenoic acid. Enzymatic formation from 14,15-leukotriene A<sub>4</sub>.

*Eur J. Biochem.*, 1988, 173 : 531-536.

**WHITE R.E. and COON M.J.**

Oxygen activation by cytochrome P450.

*Annu. Rev. Biochem.*, 1980, 49 : 315-356.

**WILLIAMS J., JOHNSON S., MASCALI J.J., SMITH H., ROSENWASSER L.J. and BORISH L.**

Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects.

*J. Immunol.*, 1992, 149 : 2823-2829.

**WILLIAMS J.D., CZOP J.K. and AUSTEN K.F.**

Release of leukotrienes by human monocytes on stimulation of their phagocytic receptor for particulate activators.

*J. Immunol.*, 1984, 132 : 3034-3040.

**WILLIAMS J.D., ROBIN J.L., LEWIS R.A., LEE T.H. and AUSTEN K.F.**

Generation of leukotrienes by human monocytes pretreated with cytochalasin B and stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.

*J. Immunol.*, 1986, 136 : 642-648.

**WILSON D.E. and KAYMAKCALAN H.**

Prostaglandins : gastrointestinal effects and peptic ulcer disease.

*Med. Clin. North. Am.*, 1981, 65 : 773-787.

**WRIGHT G., WEISS J., KIM K.S., WERHEIJ H. and ELSBACH P.**

Bacterial phospholipid hydrolysis enhances the destruction of E. Coli ingested by rabbit neutrophils. Role of cellular and extracellular phospholipases.

*J. Clin. Invest.*, 1990, 85 : 1925-1935.

**YAMAMOTO S., UEDA N., YOKOYAMA C., KANEKO S., SHINJO F., YOSHIMOTO T., OATES J.A., BRASH A.R., FITZSIMMONS B.J. and ROKACH J.**

Dioxygenase and leukotriene A synthase activities of arachidonate 5 lipoxygenase and 12 lipoxygenase purified from porcine leukocytes.

*Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.*, 1987, 17 : 55-59.

**YOKOTA T., ARAI N., DE VRIES J., SPITS H., BANCHEREAU J., ZLOTNIK A., RENNICK D., HOWARD M., TAKEBE Y. and MIYATAKE S.**

Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells.

*Immunol. Rev.*, 1988, 102 : 137-187.

**YOSHIMOTO T., SOBERMAN R.J., SPUR B. and AUSTEN K.F.**

Properties of highly purified leukotriene C<sub>4</sub> synthase of guinea pig lung.

*J. Clin. Invest.*, 1988, 81 : 866-871.

**ZOR U., HER E., HARELL T., FISCHER G., NAOR Z., BRAQUET P., FERBER E. and REISS N.**

Arachidonic acid release by basophilic leukemia cells and macrophages stimulated by Ca<sup>2+</sup> ionophores, antigen and diacyl-glycerol : essential role for protein kinase C and prevention by glucocorticosteroids.

*Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1091 : 385-392.

**ZWALDO G., BROCKER E.B., VON BASSEWITZ D.B., FEIGE U. and SORG C.**

A monoclonal antibody to a differentiation antigen present on mature human macrophages and absent from monocytes.

*J. Immunol.*, 1985, 134 : 1487-1492.

**ZWALDO G., SCHLEGEL R. and SORG C.**

A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues.

*J. Immunol.*, 1986, 137 : 512-518.

## ANNEXE : LISTE DES ABBREVIATIONS.

AA	Acide arachidonique.
Ac	Anticorps.
ADCC	Cytotoxicité dépendante des anticorps.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire.
ADP	Adénosine-5' - diphosphate.
Ag	Antigène.
AMPc	Adénosine-3',5' - monophosphate.
ARN	Acide ribonucléique.
ARNm	Acide ribonucléique messenger.
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique.
ARNt	Acide ribonucléique de transfert.
ATP	Adénosine-5' - triphosphate.
CATCH	Solution antiagrégante (Formule 1, page 123).
CCM	Chromatographie sur couche mince.
CDP	Cytidine diphosphate.
CFU	Unité de formation des colonies.
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité.
CMP	Cytidine monophosphate.
Co A	Coenzyme A.
Con A	Concanavoline A.
CR1	Récepteur pour le fragment C3b.
CSF	Facteur stimulant les colonies.
DAG	Diacylglycérol.
DEPC	Diéthylpyrocarbonate.
DGLA	Acide dihomo- $\gamma$ -linoléique.
diHETE	Acide dihydroxyeicosatétraénoïque.
diHPETE	Acide dihydroperoxyeicosatétraénoïque.
dNTP	Désoxynucléotides.
DO	Densité optique.
DTT	Dithiothréitol.
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique.
EET	Acide époxyeicosatriénoïque.
EPA	Acide timnodonique.
FcR	Récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines.
FLAP	Protéine activatrice de la 5 lipoxygénase.
FMLP	N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine.
G-CSF	Facteur favorisant la différenciation en granulocytes.

GM-CSF	Facteur favorisant la différenciation en granulocytes/monocytes.
GMPc	Guanosine-3',5'-monophosphate.
GTP	Guanosine-5'-triphosphate.
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque.
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque.
HPLC	Chromatographie liquide haute pression.
HPOD	Acide hydroperoxyoctadécadiénoïque.
Hx	Hépoixiline.
Ig	Immunoglobulines.
IL	Interleukine.
INF	Interféron.
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphate.
kb	Kilobase.
LDL	"Low Density Lipoprotein".
LOX	Lipoxygénase.
LPS	Lipopolysaccharide.
LT	Leucotriène.
MCP	Protéine chimiotactique pour les monocytes.
M-CSF	Facteur favorisant la différenciation en monocytes.
Met	Méthionine.
MGG	May Grunwald Giemsa.
N/C	Rapport nucléaire-cytoplasmique.
NK	Cellules tueuses.
PA	Acide phosphatidique.
PAF	Facteur activateur des plaquettes.
PBS	Solution saline de phosphate (Formule 2, page 123).
PC	Phosphatidylcholine.
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne.
PE	Phosphatidyléthanolamine.
PG	Prostaglandine.
PIP	Phosphatidylinositol-4-phosphate.
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate.
PKC	Protéine kinase C.
PL(A <sub>2</sub> )	Phospholipase (A <sub>2</sub> ).
PM	Poids moléculaire.
PMA	Phorbol myristate acétate.
PMNL	Polymorphonucléaire leucocyte.
PS	Phosphatidylsérine.
RNase	Ribonucléase.
RPM	Résonance paramagnétique.
SDS	Sodium dodécyl sulfate.
SRS-A	"Slow reacting substance of anaphylaxis".
SSC	Solution sodique (Formule page 165).
SVF	Sérum de veau foetal.

TAE	Tampon tris-acétate (Formule 5, page 152).
THETE	Trioxiline: acide trihydroxyeicosatriénoïque.
TPA	Phorbol tétradécanoate acétate.
TNF	Facteur nécrosant les tumeurs.
Tx	Thromboxane.
UV	Ultraviolet.
Val	Valine.

## TABLE DES MATIERES

	pages
PLAN	7
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	14
<b><u>PREMIERE PARTIE : NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	16
<b>METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE CHEZ LES MAMMIFERES</b>	17
<b>A- ACTIVITE CYCLOOXYGENASIQUE</b>	18
<b>I- Les cyclooxygénases : structure, activité</b>	18
<b>II- Les métabolites issus de la voie des cyclooxygénases</b>	22
II.1- Nomenclature et structure des prostaglandines	22
II.2- Devenir de PGH <sub>2</sub>	24
II.2.1- Synthèse et catabolisme des prostaglandines classiques : PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> et PGD <sub>2</sub>	24
II.2.2- Synthèse et catabolisme de la prostacycline et du thromboxane	25
<b>B- ACTIVITE LIPOXYGENASIQUE</b>	25
<b>I- Les lipoxygénases</b>	25
I.1- Mécanisme réactionnel	28
I.2- Régulation des réactions lipoxygénasiques	30
I.3- Régiospécificité de la réaction lipoxygénasique	32
I.4- Nomenclature des lipoxygénases	33
I.5- Les lipoxygénases de mammifères	35
I.5.1- La 12 lipoxygénase	37
I.5.2- La 15 lipoxygénase	37
I.5.3- La 5 lipoxygénase	39
I.5.4- Homologie structurale entre lipoxygénases humaines	41
<b>II- Les métabolites issus de la voie des lipoxygénases</b>	43
II.1- Voie de la 12 lipoxygénase	43
II.2- Voie de la 15 lipoxygénase	43
II.3- Voie de la 5 lipoxygénase	46
II.3.1- Nomenclature des leucotriènes	48
II.3.2- Métabolites de l'acide arachidonique : voie des leucotriènes	48
II.3.3- Métabolisme des leucotriènes	52
II.4- Autres voies lipoxygénasiques	54
<b>C- ACTIVITE MONOOXYGENASIQUE</b>	54
<b>I- Le cytochrome P450</b>	54
<b>II- La voie des époxygénases</b>	55
<b>D- ACTIVITE DES PHOSPHOLIPASES</b>	57
<b>I- Généralités</b>	57
<b>II- Les phospholipases</b>	58

II.1- Les phospholipases A <sub>1</sub>	58
II.2- Les phospholipases D	60
II.3- Les phospholipases C	60
II.4- Les phospholipases A <sub>2</sub>	60
II.4.1- Distribution cellulaire et rôle des PLA <sub>2</sub>	60
II.4.2- Mécanisme réactionnel des PLA <sub>2</sub>	62
II.4.3- Régulation de l'activité enzymatique des PLA <sub>2</sub>	62
a) <i>Les activateurs</i>	62
b) <i>Les inhibiteurs</i>	63
II.4.4- Voie de synthèse du PAF-acéther	64
<b>III- Substrat des lipoxygénases, des cyclooxygénases et des époxycgénases</b>	64
III.1- Origine et synthèse des substrats	64
III.2- Stockage de l'acide arachidonique dans les cellules	67
III.2.1- Les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques	67
III.2.2- Les phospholipides membranaires	68
 <b>EICOSANOIDES ET CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEES</b>	 72
<b>A- CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEES :</b>	72
<b>MONOCYTE-MACROPHAGE</b>	
<b>I- Origine et devenir des monocytes</b>	72
I.1- La monocytopoïèse	73
I.2- Les monocytes circulants	75
I.3- Les macrophages	76
I.4- L'activation des macrophages	76
I.5- Physiopathologie de l'inflammation	77
I.5.1- La phase vasculaire	77
I.5.2- La phase plasmatique	78
I.5.3- La phase cellulaire	79
I.5.4- Evolution des réactions inflammatoires	81
a) <i>L'inflammation aigüe</i>	81
b) <i>L'inflammation chronique</i>	81
I.5.5- Les médiateurs de l'inflammation	82
a) <i>Les médiateurs cellulaires</i>	83
b) <i>Les médiateurs vasculaires</i>	83
<b>II- Critères de différenciation des cellules phagocytaires mononucléées</b>	87
II.1- Etude morphologique	87
II.1.1- Les monocytes	87
II.1.2- Les macrophages	88
II.2- Propriétés cytochimiques	88
II.3- Les marqueurs de surface	89
II.3.1- L'influence de facteurs environnants	89
II.3.2- Critères de différenciation	90
<b>III- Propriétés et activités fonctionnelles des phagocytes mononucléés</b>	92
III.1- Cellules phagocytaires	92
III.2- Cellules bactéricides	93
III.3- Cellules auxiliaires	93
III.4- Cellules cytotoxiques	94
III.5- Cellules sécrétrices	94

<b>B- PRODUCTION D'EICOSANOIDES PAR LES CELLULES PHAGOCYTAIRES MONONUCLEES HUMAINES</b>	94
<b>I- Facteurs influençant l'interprétation des résultats</b>	94
I.1- Technique de séparation cellulaire	96
I.1.1- Prélèvements	96
I.1.2- Séparations cellulaires	96
I.2- Culture	97
I.3- Degré de purification	97
I.4- Hétérogénéité des populations	98
I.5- Influence des métabolites	98
<b>II- Production d'eicosanoïdes par les monocytes stimulés et non stimulés</b>	99
II.1- Agents stimulants	99
II.1.1- Acide arachidonique	99
II.1.2- Ionophore calcique A 23187	99
II.1.3- Esters de phorbol	100
II.1.4- Peptides formyl-méthionylés	100
II.1.5- Agents divers	100
II.2- Voie de la cyclooxygénase	101
II.3- Voie de la lipoxycgénase	101
II.3.1- Métabolisme général	101
II.3.2- Métabolisme sous stimulus augmentant la concentration de Ca <sup>++</sup> intracellulaire associé à des étapes d'adhérence	102
II.3.3- Métabolisme en présence d'ester de phorbol	103
II.3.4- Métabolisme en présence d'acide arachidonique exogène	103
II.3.5- Incidence des interactions cellulaires sur le métabolisme 5-lipoxycgénasique des monocytes	104
a) <i>interaction monocyte-plaquette</i>	104
b) <i>interaction monocyte-lymphocyte</i>	104
II.3.6- Métabolisme en présence d'interleukine 4	105
a) <i>Interleukine 4</i>	105
- <i>Action sur les cellules T</i>	105
- <i>Action sur les cellules B</i>	106
- <i>Contrôle de l'hématopoïèse</i>	106
- <i>Action sur les monocytes et les macrophages humains</i>	106
b) <i>stimulation des monocytes humains par diverses cytokines</i>	107
<b>C- PROPRIETES DES EICOSANOIDES ET DE LEURS METABOLITES</b>	108
<b>I- Mécanisme d'action des prostaglandines et des leucotriènes</b>	108
I.1- Récepteurs des prostaglandines	108
I.2- Récepteurs des leucotriènes	109
<b>II- Activités biologiques des eicosanoïdes</b>	110
II.1- Prostaglandines et thromboxane A <sub>2</sub>	110
II.1.1- Système cardiovasculaire	110
II.1.2- Fonction plaquettaire	110
II.1.3- Fonction rénale	111
II.1.4- Système respiratoire	111
II.1.5- Système gastrointestinal	111
II.1.6- Système reproducteur	112
II.1.7- Inflammation	112
II.1.8- Fièvre et infection	113
II.1.9- Immunité	113
II.2- Leucotriènes	115
II.2.1- Système pulmonaire	115

II.2.2- Système cardiaque	115
II.2.3- Inflammation	116
II.2.4-Immunité	116
a)Prolifération des lymphocytes	116
b)Activité cytotoxique	117
c)Production de cytokines	117
II.3- Acides hydroxy- et hydroperoxy- eicosatétraénoïques	118
II.3.1- Synthèse des eicosanoïdes	118
II.3.2- Libération d'histamine	119
II.3.3- Peau et psoriasis	119
II.3.4- Inflammation	119
II.3.5-Immunité	119
II.4- Lipoxines, hépoxilines et acides époxyeicosatriénoïques	120
II.4.1- Lipoxines	120
II.4.2- Hépoxilines	120
II.4.3- Acides époxyeicosatriénoïques	120

## **SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE** 121

### **MATERIELS ET METHODES** 122

#### **A- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'OBTENTION DES MONOCYTES HUMAINS** 122

<b>I- Solutions et matériels</b>	122
I.1- Tube de prélèvement	122
I.2- Nycoprep <sup>TM</sup> 1,068	122
I.3- Solution antiagrégante	122
I.4- Solutions de lavages	122
I.4.1- Solution d'EDTA et de sérum de veau foetal	122
I.4.2- Solution saline de phosphate	124
<b>II- Méthodes</b>	124
II.1- Principe de la procédure de séparation	
II.2- Procédure de séparation préconisée par les laboratoires commercialisant le Nycoprep 1.068	124
II.3- Mise en application de la méthode de Pawlowsky	126
II.4- Emploi de Diatube et de CATCH	126

#### **B- CARACTERISATION DES MONOCYTES ISOLES** 127

<b>I- Numération cellulaire et viabilité</b>	127
<b>II-Identification</b>	127

#### **C- ETUDE ANALYTIQUE DES METABOLITES LIPOXYGENASIQUES** 127

<b>I- Appareillages et produits</b>	127
I.1- Spectrophotométrie	127
I.2- Chromatographie	128
I.2.1- HPLC	128
a) Appareillage	128
b) Chromatographie de partage à polarité de phase inversée	130
c) Paramètres chromatographiques d'un soluté	130
d) Paramètres chromatographiques de la colonne	132
I.2.2- CCM	133
a) Solvant de migration	133
b) Dépôt	133
c) Révélation	134

I.3. Carbone 14 et acide arachidonique 1- <sup>14</sup> C	134
I.3.1- Transformations radioactives	134
I.3.2- Cinétique des transformations radioactives	134
a) <i>activité</i>	135
b) <i>décroissance radioactive - Période</i>	135
I.3.3- Particule β <sup>-</sup>	135
I.4- Détecteurs de rayonnement β <sup>-</sup>	137
I.4.1- Dénombrement des rayonnements	137
a) <i>Perte de comptage</i>	137
b) <i>Statistique de comptage</i>	137
c) <i>Bruit de fond</i>	137
I.4.2- Analyseur-Linéaire LB-2832 Berthold	137
a) <i>Principe et appareillage</i>	138
b) <i>Précautions particulières</i>	138
I.4.3- Détecteur à scintillation	138
a) <i>Principe et appareillage</i>	138
b) <i>Phénomène d'affaiblissement des scintillations</i>	139
<b>II- Mise au point de l'étude analytique</b>	139
II.1- Analyse spectrophotométrique	139
II.1.1- Spectre des leucotriènes et des HETEs	139
II.1.2- Spectre du standard interne : PGB <sub>2</sub>	141
II.1.3- Etude qualitative	141
II.2- CCM et TLC - analyseur linéaire	141
II.3- Incubation des monocytes	143
II.4- HPLC	143
II.2.1- Solution de standards	143
II.2.2- Gradient	146
II.5- Détecteur à scintillation	147
<b>D- EXTRACTION D'ARN TOTAUX ET RECHERCHE PAR PCR DE L'EXPRESSION AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL DE LA 5 LIPOXYGENASE</b>	147
<b>I- Les acides nucléiques</b>	147
<b>II- Extraction des ARN totaux</b>	148
II.1- Principe	148
II.1.1-Préparation des ARN totaux	148
II.1.2- Extraction des ARN totaux	148
II.1.3- Précipitation et lavage des ARN totaux	149
II.1.4- Dosage des acides nucléiques et contrôle de qualité	149
a) <i>Dosage par spectrophotométrie</i>	149
b) <i>Electrophorèse</i>	149
c) <i>Révélation</i>	150
II.2- Protocole	150
II.2.1- Extraction des ARN totaux	150
II.2.2- Dosage des acides nucléiques	151
II.2.3- Electrophorèse	151
a) <i>Tampon d'electrophorèse</i>	151
b) <i>Minigel d'agarose à 0.8 %</i>	151
c) <i>Conditions d'electrophorèse</i>	153
<b>III- La transcription réverse</b>	153
III.1- Principe	153
III.1.1- Action de la transcriptase réverse	153
III.1.2- Origine de la transcriptase réverse	155
III.1.3- Utilisation de la transcriptase réverse	155
III.2- Protocole	155

III.2.1- Amorçage	157
III.2.2- Transcription réverse	157
III.2.3- Traitement par la RNase H	157
<b>IV- Réaction de polymérisation en chaîne</b>	158
IV.1- Principe	158
IV.2- Protocole	161
IV.2.1- Préparation de l'amplification	162
IV.2.2- Amplification	162
IV.2.3- Vérification	163
a) <i>Principe du dot-blot</i>	163
b) <i>Extraction des produits amplifiés</i>	163
c) <i>Protocole du dot-blot</i>	164
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	167
<b>A- OBTENTION DE MONOCYTES SANGUINS HUMAINS</b>	167
<b>B- BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>	169
I- Analyse par spectrophotométrie et électrophorèse de l'extraction d'ARN totaux	169
II- Mise en évidence de l'expression de la 5 lipoxgénase par PCR	173
III- Vérification par dot-blot	173
<b>C- ANALYSE EN HPLC DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES</b>	173
I- Mise au point de la technique analytique	173
II- Analyse d'échantillons incubés en présence d'AA froid	179
III- Analyse de monocytes incubés en présence d'AA radiomarqué	179
<b><u>CONCLUSION</u></b>	182
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	184
Annexe: Liste des abbréviations	218

## Résumé :

Le monocyte tient une place prépondérante dans le développement des réactions inflammatoires et immunes. Parmi leurs multiples propriétés, ces cellules synthétisent et libèrent des eicosanoïdes issus de l'activité catalytique des lipoxygénases et des cyclooxygénases. C'est en particulier une source importante de prostaglandine E<sub>2</sub> connue pour ses propriétés immunosuppressives. Par contre les activités lipoxygénasiques des monocytes non activés ne sont pas clairement établies.

Nous avons isolé les monocytes humains du sang périphérique en ne passant par aucune étape d'adhérence pour limiter leur activation. Nous avons ainsi mis en évidence, dans ces cellules, l'ARNm de la 5 lipoxygénase et avons confirmé ce résultat en révélant, dans le surnageant cellulaire de monocytes incubés en présence d'acide arachidonique radiomarqué et d'ionophore, la présence de métabolites dihydroxylés et réduits, produits sous l'action catalytique d'une 5 lipoxygénase. La synthèse et la libération de leucotriène B<sub>4</sub> et d'acide hydroxy-5-eicosatétraénoïque par ces cellules renforce le rôle fondamental des monocytes dans l'inflammation et surtout dans l'immunosuppression.

## Mots clés :

- Lipoxygénases
- Monocytes humains
- Chromatographie liquide haute pression
- Réaction de polymérisation en chaîne