

ACADEMIE DE LILLE
UNIVERSITES DE LILLE I ET LILLE II
ANNEE UNIVERSITAIRE 1989-1990

Mémoire pour l'obtention
du Diplôme d'Etudes Approfondies
"SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE"
OPTION IMMUNOLOGIE

**ETUDE DE LA STIMULATION PLAQUETTAIRE:
ACTIVITE CYTOTOXIQUE VIS-A-VIS D'UNE CIBLE
CELLULAIRE EUCARYOTE ET REDUCTION D'UN SEL DE
TETRAZOLIUM.**

DOMINIQUE VANHEE

Laboratoire d'accueil:

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Mr. le Professeur A. CAPRON
Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille

REMERCIEMENTS.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Monsieur le Professeur A. Capron**, Directeur du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, pour son accueil au sein de son unité.

Un grand merci à **Monsieur le Professeur A.B. Tonnel** et à **Monsieur le Docteur M. Joseph** pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans le groupe d'Immuno-pathologie.

Je tiens également à adresser mes plus chaleureux remerciements à **Monsieur le Docteur M. Joseph** pour la manière dont il m'a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils, au cours de cette année.

Mes plus sincères remerciements à l'ensemble des chercheurs et techniciens du laboratoire d'Immuno-pathologie pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et de l'aide pour l'élaboration de ce Mémoire.

Table des matières

<u>1. RESUME.</u>	<u>4</u>
<u>2. INTRODUCTION.</u>	<u>5</u>
<u>3. PATIENTS, MATERIELS ET METHODES.</u>	<u>7</u>
3.1. SELECTION DES PATIENTS.	7
3.2. PREPARATION DES SUSPENSIONS PLAQUETTAIRES.	7
3.3. METHODES D'ACTIVATION DES PLAQUETTES.	7
3.4. TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTIVITE PLAQUETTAIRE.	8
3.5. ANALYSES DES DONNEES.	11
<u>4. RESULTATS.</u>	<u>12</u>
4.1. TEST DE CYTOTOXICITE ANTI-CELLULES EUCARYOTES	12
4.2. TEST COLORIMETRIQUE DE REDUCTION DU MTT.	17
<u>5. DISCUSSION.</u>	<u>22</u>
<u>6. CONCLUSION.</u>	<u>24</u>
<u>7. REFERENCE</u>	<u>25</u>

1. RESUME.

Au cours de ces dernières années, toute une série de travaux ont démontré une participation de la plaquette sanguine dans les réactions d'hypersensibilité immédiate et plus particulièrement les asthmes allergiques ou pseudoallergiques comme l'asthme à l'aspirine. Dans un premier temps la réactivité plaquettaire a été évaluée, *in vitro*, par l'exocytose de médiateurs cytotoxiques pour des larves parasitaires, et par la génération de métabolites de l'oxygène détectés par chimioluminescence. Ces deux tests sont toutefois de mise en oeuvre délicate (disponibilité de parasites et d'un matériel de chimioluminescence encore onéreux). Pour pallier à ces difficultés, nous avons pu démontrer que les plaquettes sont capables d'une action cytotoxique vis-à-vis de cibles cellulaires eucaryotes, cette cytotoxicité se manifestant par une activité non seulement lytique, mais aussi clastogène (fragmentation de l'ADN), cette dernière étant apparemment liée aux radicaux libres générés lors de l'activation plaquettaire. D'autre part nous avons pu démontrer que la plaquette était capable de réduire les sels de tétrazolium, cette réduction étant proportionnelle au niveau de stimulation plaquettaire. Les deux tests que nous décrivons sont significativement corrélés avec les paramètres antérieurs de mesure de la réactivité plaquettaire. Ils peuvent donc venir en complément, ou en remplacement, des précédents critères d'activation de la plaquette et, de ce fait, concourir à une approche simplifiée et par conséquent plus utilisée du rôle de la plaquette dans les processus immunitaires, qu'il s'agisse d'immunité anti-parasitaire ou de processus immuno-allergiques.

2. INTRODUCTION.

L'analyse du déclenchement des réactions d'hypersensibilité immédiate s'est longtemps limitée à l'intervention des mastocytes et des basophiles, c'est à dire à l'interaction des allergènes et des IgE fixées à leur surface. Puis l'exploration des mécanismes physiopathologiques de l'allergie a permis la mise en évidence d'une participation cellulaire plus large (1) notamment par l'identification de récepteurs de plus faible affinité pour l'IgE à la surface des monocytes (2), des macrophages (3), des éosinophiles (4) et des plaquettes sanguines (5).

En ce qui concerne les plaquettes, leur activation et leur accumulation au niveau du poumon, dans les manifestations de l'asthme expérimental mais aussi lors de tests de provocation allergique ont été de nombreuses fois rapportées (6-9), même si la démonstration de leur intervention *in vivo* reste à faire. L'identification d'un récepteur pour l'IgE à la surface des plaquettes et d'une activation dépendante de cet isotype d'immunoglobulines ont suggéré une participation directe des plaquettes dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (venin d'hyménoptères), dans les asthmes allergiques (pneumallergènes) (9,10) et les asthmes associés à une intolérance à l'aspirine et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (11,12).

Jusqu'alors cette réactivité plaquettaire pouvait être évaluée *in vitro* par l'exocytose de médiateurs cytotoxiques pour des larves parasitaires (13) et par la génération de métabolites de l'oxygène détectés par chimioluminescence (5).

Nous présentons ici deux nouvelles méthodes permettant d'évaluer la réactivité plaquettaire induite par des mécanismes allergiques (liés à l'IgE) ou pseudoallergiques (liés à une intolérance à l'aspirine et aux AINS).

La première méthode va s'intéresser aux capacités lytiques de la plaquettes, l'exocytose de médiateurs cytotoxiques étant évaluée non plus vis-à-vis de larves parasitaires mais vis-à-vis d'une cible cellulaire eucaryote en lignée continue.

La seconde méthode met en jeu la capacité des enzymes mitochondriales des cellules viables de réduire les sels de tétrazolium. En effet, il a été rapporté que cette réduction, utilisée pour la mise au point de diverses méthodes colorimétriques (14,15,16), pouvait être appliquée à la mesure de l'activation cellulaire indépendamment de la prolifération.

Ce travail a donc été réalisé dans le but de voir s'il était possible de remplacer les précédents paramètres d'évaluation de la stimulation plaquettaire au cours des réactions d'hypersensibilité. En effet, le premier critère, la cytotoxicité plaquettaire dirigée contre des larves de parasites (essentiellement *Schistosoma*

mansoni), est limité aux laboratoires ayant la capacité de maintenir en culture et de produire ces parasites. Le deuxième paramètre consistant en la mesure de la production de métabolites de l'oxygène par chimioluminescence, nécessite un matériel coûteux et de mise en oeuvre délicate. Aussi avons-nous tenté de démontrer que les deux nouvelles méthodes de mesure de l'activation plaquettaire sont corrélées avec les paramètres antérieurs et en particulier avec la cytotoxicité anti-parasitaire.

D'autre part, tenant compte du fait que lors de l'activation plaquettaire il y a stimulation du métabolisme oxydatif se manifestant par une "explosion respiratoire" ("respiratory burst") et par la génération de métabolites de l'oxygène (5,12), nous nous sommes intéressés aux effets de ces médiateurs à l'échelon cellulaire en nous attachant à l'analyse de leur action sur la membrane plasmique, sur les enzymes à groupements sulphydryl et sur les chromosomes. Le travail que nous présentons ici vise à mettre en évidence une corrélation entre la cytotoxicité anti-cellulaire des plaquettes, les effets clastogènes (fragmentation des chromosomes) des radicaux libres générés lors de l'activation de cet élément sanguin, et les tests précédemment utilisés dans ce contexte.

3. PATIENTS, MATERIELS ET METHODES.

3.1. Sélection des patients.

Les prélèvements sanguins proviennent de trois groupes de sujets: (a) donneurs sains volontaires (Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille); (b) patients allergiques et (c) patients présentant un asthme à l'aspirine (Service de Pneumo-Allergologie de l'Hopital Calmette de Lille). Les critères de sélection des patients allergiques sont: une hypersensibilité à un allergène objectivée par leur histoire clinique, des tests cutanés positifs en réponse à l'allergène et la présence d'IgE spécifiques de l'allergène mise en évidence par radioallergosorbent test (RAST). Le diagnostic de l'asthme à l'aspirine a été affirmé sur les critères suivants: des antécédents d'intolérance caractéristiques, suivi d'une réponse positive à un test de provocation réalisé sous contrôle médical par ingestion d'aspirine.

3.2. Préparation des suspensions plaquettaires.

Le sang veineux total recueilli sur divers anticoagulants est réparti en aliquot de 5 ml puis centrifugé 15 min à 120 g. Le plasma riche en plaquettes est recueilli et centrifugé à 2000 g pendant 15 min. Le culot plaquettaire est remis en suspension dans un tampon physiologique contenant de l'acide citrique (36 mM), du glucose (5 mM), du calcium (2 mM), du magnésium (1 mM), de la sérum albumine bovine (0,35 %) et de la prostaglandine E1 (100 nM) (Sigma, St. Louis, MO). Trois lavages à 2000 g sont réalisés. Les plaquettes sont numérees en hémocytomètre sous microscope à contraste de phase après dilution dans une solution d'oxalate d'ammonium à 1 %, puis sont ajustées à la concentration appropriée. La contamination leucocytaire ne dépasse jamais 10 pour 10^6 plaquettes.

3.3. Méthodes d'activation des plaquettes.

Les plaquettes sont mise en suspension dans du tampon de Hank's sans rouge de phénol (HW) (Gibco, Courbevoie, France) à la concentration de $2 \cdot 10^8$ plaquettes par ml. 50 ml de cette suspension sont répartis en plaques de microtitration à fond plat (Nunc) auxquels sont ajoutés 10 ml de sérum de patients et 10 ml de facteur déclenchant l'activation, à la concentration désirée. Le volume

réactionnel est ajusté à 100 ml avec du tampon HW. Chaque condition est répétée 8 fois. La plaque est mise en incubation 18 h à 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air.

Selon l'origine des plaquettes, il faut distinguer différents systèmes de stimulation plaquettaire: (a) sensibilisation passive des plaquettes de sujets sains par du sérum de patient riche en IgE (taux d'IgE total ≥ 200 KU/l), le facteur déclenchant l'activation étant l'allergène spécifique (Laboratoire des Stallergènes, Fresnes, France) ou des anticorps anti-IgE (antisérum polyclonal de chèvre anti-IgE humaines, Miles Laboratories, Elkhart, IN); (b) pour les plaquettes de patients allergiques, l'activation est déclenchée par l'allergène spécifique ou par des anticorps anti-IgE; (c) pour les plaquettes de patients pseudoallergiques, l'activation est déclenchée par l'aspirine (0,6mM).

3.4. Techniques d'étude de l'activité plaquettaire.

3.4.1 Cytotoxicité plaquettaire anti-parasitaire.

Les plaquettes ($5,5 \cdot 10^7$) en suspension dans du milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM) (Gibco) sont incubées en présence de 50 à 100 schistosomules (13) en plaques de microtitration à fond plat dans un volume final de 200 μ l contenant 10 % de sérum (sérum sain, de patient allergique ou pseudoallergique). L'activité cytotoxique des plaquettes est appréciée optiquement par le pourcentage de larves de *Schistosoma mansoni* tuées après 24 h d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air (5). Chaque condition est réalisée en double exemplaire. Aucune agrégation plaquettaire n'est observée durant ce test.

3.4.2. Cytotoxicité plaquettaire anti-cellules eucaryotes.

Le principe de ce test, décrit par Brunner et coll. (17), repose sur l'exocytose de chrome 51 préalablement incorporé par les cellules cibles, la teneur en ⁵¹Cr présent dans le surnageant étant proportionnel à la cytotoxicité.

3.4.2.1. Cellules cibles.

Les cellules Hela et K 562 sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant de la glutamine (2 mM), de la pénicilline (100 UI/ml), de la streptomycine (100 mg/ml) et 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (milieu R10). Pour la réalisation du test de cytotoxicité plaquettaire les cellules-cibles sont traitées par de l'actinomycine D à 1 mg/ml durant 3 h à 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air. Ce traitement permet de sensibiliser les cellules-cibles aux effets lytiques des médiateurs cytotoxiques générés par les plaquettes activées. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du SVF pur pour le marquage au chrome 51

(Na₂⁵¹Cr₂O₇, 74 MBq/ml, CEA, Gif-sur- Yvette, France) (3,7 MBq pour 10⁷ cellules sous un volume de 100 ml). La suspension cellulaire est ensuite lavée cinq fois en milieu R10 puis ajustée à la concentration de 10⁶ cellules /ml.

3.4.2.2. **Mesure de la cytotoxicité anti-cellulaire.**

50 ml d'une suspension plaquettaire ajustée à 2.10⁸ plaquettes/ml sont répartis en plaque de microtitration à fond plat (Nunc). A cette suspension il est ajouté 100 ml de la suspension de cellules-cibles marquées. Les plaquettes sont stimulées comme indiqué en 3.3. Après incubation les plaques sont centrifugées 5 min à 300 g, et 100 ml de surnageant sont prélevés et comptés au compteur de rayonnement gamma (LKB Wallac, Suède). Le surnageant des puits contenant les cellules-cibles seules permet d'évaluer la libération spontanée de ⁵¹Cr, l'exocytose maximale est évaluée à partir du surnageant des cellules cibles en présence de triton X100 à 0,25 % final. Chaque condition est répétée trois fois. Le pourcentage de cytotoxicité spécifique est évalué selon le rapport:

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{Re - Rs}{Rm - Rs} \times 100$$

Re: relargage expérimental.

Rs: relargage spontané.

Rm: relargage maximal.

Afin d'identifier les mécanismes ou les médiateurs responsables de cette cytotoxicité plaquettaire, différentes substances ou enzymes ont été testées pour leurs effets activateurs ou inhibiteurs. Ainsi un "piégeur" des radicaux libres (l'acide benzoïque) a été testé à des concentrations comprises entre 10⁻⁷ et 10⁻³ M, ainsi que deux enzymes qui interfèrent avec le métabolisme de l'oxygène générant ces radicaux libres: la superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (Sigma) et la catalase (EC 1.11.1.6) (Sigma).

3.4.2.3. **Etude de l'activité clastogène des plaquettes.**

3.4.2.3.1. Induction d'une activité clastogène.

Les radicaux libres induisent des lésions macroscopiques des chromosomes de cellules eucaryotes. Cette activité clastogène des plaquettes de sujets sains est évaluée par caryotypage d'une suspension cellulaire cible (cellule Hela, ou cellule K562) après action de celles-ci ou de leurs surnageants. Pour cela 100 ml d'une suspension cellulaire à 10⁶ cellules/ml en milieu R10 sont répartis en plaque de culture 24 puits. On recouvre ces cellules d'un filtre Millipore de porosité 0,45 mm (Millicell-HA, Millipore, Bedford USA), sur

lequel sont déposés 100 ml d'une suspension plaquettaire à 3.10^9 plaquettes/ml en milieu R10. Les conditions d'activation des plaquettes sont celles définies en 3.3. Les plaques sont mises en incubation 24 h à 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air. Après incubation les filtres contenant les plaquettes sont éliminés et les cellules sont traitées en vue de leur caryotypage.

3.4.2.3.2. Réalisation des caryotypes.

La méthode utilisée est celle décrite par Moorhead en 1960 (18). Brièvement, les cellules sont bloquées en métaphase par addition d'un dérivé de la colchicine: la colcémide (Sigma) à la concentration de 50 ng/ml durant 4 h. Les cellules sont ensuite fragilisées par un choc hypotonique (KCl: 75 mM) puis fixées par un mélange éthanol/acide acétique (3:1 v:v). Elles sont finalement étalées sur lames humides et froides et colorées au Giemsa rapide. Un minimum de 50 mitoses sont examinées, les capacités clastogènes des plaquettes sont évaluées selon le pourcentage d'images de mitoses présentant une ou plusieurs aberrations chromosomiques en comparant ces pourcentages à ceux observés en absence ou en présence de plaquettes activées et non activées.

3.4.3. Test colorimétrique au MTT.

Une solution mère de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium) (Sigma) est préparée à la concentration de 4 mg/ml en tampon phosphate (PBS) et filtrée sur filtre 0,22 µm (Millipore). La technique de mesure de la réduction du MTT par les plaquettes est dérivée de celle décrite par Mosmann (14). Après incubation des plaquettes, 20 µl de la solution de MTT sont ajoutés dans chaque cupule puis les plaques sont mises en incubation à 37°C pendant 4 h. Les plaques sont alors centrifugées 5 min à 150 g et les surnageants sont éliminés. Les cristaux de MTT-Formazan générés par la réduction du MTT et formés au fond des puits sont suffisamment agglutinés les uns aux autres pour qu'on ne constate pas de perte lors de l'enlèvement des surnageants. 200 µl d'une solution d'HCl 0,04 N dans l'isopropanol sont déposés dans chaque cupule et agités afin de dissoudre les cristaux de MTT-Formazan. La densité optique de chaque cupule est mesurée au lecteur ELISA (Behring ELISA Processor II) à la longueur d'onde test de 570 nm et 650 nm pour la référence.

L'activation plaquettaire est appréciée par le rapport: $(A-B) \times 100/A$ exprimant le pourcentage d'augmentation de la densité optique. A représente la quantité de MTT réduit par les plaquettes en présence d'agent activateur, B la quantité de MTT réduit spontanément par les plaquettes non activées.

3.4.3.1. **Identification du système enzymatique réducteur des sels de tétrazolium.**

50 ml de la suspension de plaquettes, ajustée à la concentration de 2.10^8 plaquettes par ml est additionnée de différents facteurs (antimycine A, chlorpromazine, stélazine, cytochrome c, azide) (Sigma), et de 10 ml de sérum sain, le volume final étant ajusté à 100 ml. Les plaques de microtitration sont mises en incubation 1 h à 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air puis soumises au test MTT décrit ci-dessus.

3.5. Analyses des données.

L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Student. L'analyse des corrélations entre différents groupes de données a été réalisée par régression linéaire en utilisant la méthode des moindres carrés. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

4. RESULTATS.

4.1. Test de cytotoxicité anti-cellules eucaryotes

4.1.1. Mise au point du test.

4.1.1.1. Cibles cellulaires.

Des plaquettes de sujets intolérants à l'aspirine ont été testées pour leurs effets cytotoxiques vis-à-vis de deux lignées cellulaires prétraitées ou non par de l'actinomycine D à 1 mg/ml. Le tableau 1 montre que seules les cellules Hela traitées par l'actinomycine sont sensibles à l'activité toxique des plaquettes qui présentent alors une cytotoxicité de $45,8 \pm 0,3\%$ (moyenne \pm écart-type) contre $12,4 \pm 0,3\%$ pour les cellules K 562. C'est donc la lignée cellulaire Hela qui a été retenue dans les tests ultérieurs.

Traitement des cellules cibles	Pourcentage de cytotoxicité anti-cellulaire (moyenne \pm écart-type)			
	0	Aspirine	Actinomycine D 0	Actinomycine D Aspirine
Plaquettes de sujets ASA	0	Aspirine	0	Aspirine
Cellules K 562	$8,3 \pm 10$	$4,4 \pm 3,1$	$8,6 \pm 0,8$	$12,4 \pm 0,3$
Cellules Hela	$3,5 \pm 5,3$	$1,3 \pm 5,3$	$2,4 \pm 3,8$	$45,8 \pm 0,3$

Tableau 1: Détermination de la cellule cible utilisée dans le test de cytotoxicité anti-cellulaire (sujets ASA: sujets intolérants à l'aspirine)

4.1.1.2. Rapport effecteur/cible.

Afin de déterminer le rapport effecteur/cible optimal, les cellules cibles (10^5 cellules/puits) ont été incubées en présence de quantités variables de plaquettes stimulées par des IgE (rapport de 5:1 à 1000:1). Il apparaît ainsi que le meilleur rapport est de 100 plaquettes pour 1 cellule (100:1), qui donne un pourcentage de cytotoxicité de $97,0 \pm 8,4\%$. Il faut noter que pour des concentrations plaquettaires supérieures l'activité cytotoxique semble plus faible (figure 1). De plus ce rapport peut être mis en relation avec celui qui est nécessaire à la cytotoxicité anti-parasitaire qui est de une larve parasitaire (schistosomule) pour $1,5 \cdot 10^6$ plaquettes (rapport de 1.500.000:1). Ce rapport élevé dans le cas de la cytotoxicité anti-parasitaire est à mettre en relation avec la taille d'une

schistosomule (300 mm) qui de plus, est un organisme pluricellulaire et la taille d'une cellule (20 mm).

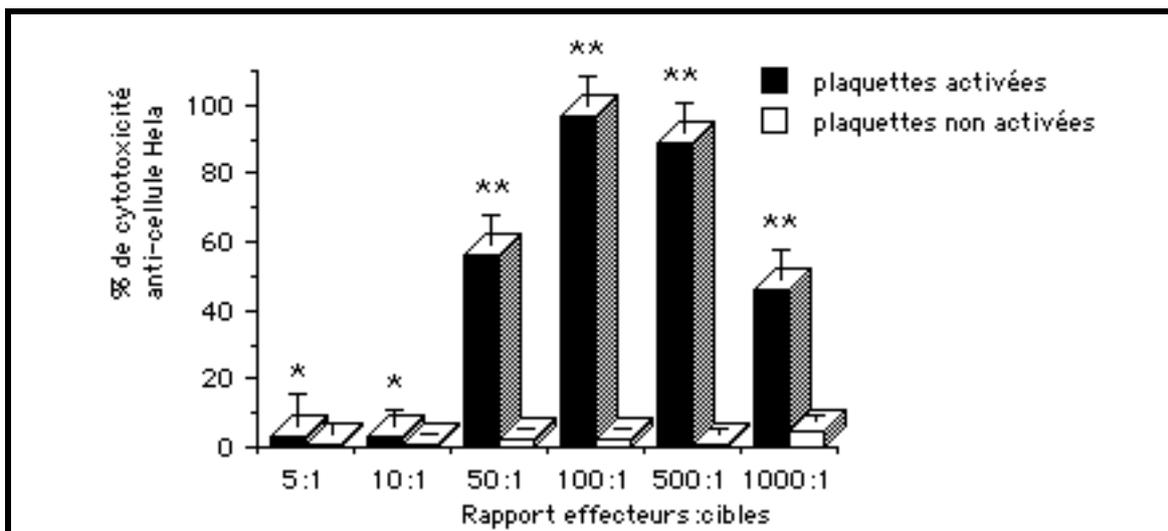


Figure 1 : Rapport effecteurs/cibles dans la cytotoxicité anti-cellulaire Hela dépendante de l'IgE. * : NS; ** : $p < 0,01$.

4.1.2. Cytotoxicité plaquettaire.

4.1.2.1. Stimulation plaquettaire liée à l'IgE.

Des plaquettes de sujets sains sensibilisées passivement ainsi que des plaquettes de sujets allergiques ont été testées pour leur activité cytotoxique en présence de l'allergène spécifique. Nous observons ainsi une cytotoxicité spécifique des IgE fixées à la surface des plaquettes (plaquettes sensibilisées de sujets sains: $62,4 \pm 19\%$; plaquettes de sujets allergiques: $67,2 \pm 16,6\%$), une incubation en présence d'un allergène non spécifique n'aboutissant qu'à une faible cytotoxicité (sujets sains: $6,8 \pm 4,6\%$; sujets allergiques: $6,7 \pm 3,6\%$) (tableau 2)

		Pourcentage de cytotoxicité anti-cellulaire (moyenne \pm écart-type)	
Origine des plaquettes	n	Allergène spécifique 10-3 IR/ml	Allergène non spécifique 10-3 IR/ml
sujets sains	6	$62,4 \pm 19^*$	$6,8 \pm 4,6$
sujets allergiques	6	$67,2 \pm 16,6^*$	$6,7 \pm 3,6$

Tableau 2: Cytotoxicité plaquettaire anti-cellule Hela, stimulation dépendant de l'IgE. *: $p < 0,001$ par rapport à la stimulation par l'allergène non spécifique. : indice réactionnel (Stallergènes).

4.1.2.2. Stimulation plaquettaire liée à l'aspirine.

Des plaquettes de sujets sains et des plaquettes de sujets intolérants à l'aspirine ont été incubées en présence d'aspirine. Le tableau 3 montre que des plaquettes potentiellement réactives à l'aspirine induisent une

cytotoxicité importante ($49,7 \pm 13,6\%$) en regard de l'activité des plaquettes de sujets sains ($20,1 \pm 6,3\%$).

Origine des plaquettes		n	Pourcentage de cytotoxicité anti-cellulaire (moyenne \pm écart-type) Aspirine 0,6 mM
sujets sains		16	$20,1 \pm 6,3$
sujets intolérants à l'aspirine		12	$49,7 \pm 13,6^*$

Tableau 3: Cytotoxicité plaquettaire anti-cellule Hela, stimulation dépendant de l'aspirine, (*: $p < 0,001$ par rapport aux sujets sains).

4.1.2.3. **Corrélation entre les tests de cytotoxicité anti-cellulaire et anti-parasitaire.**

Un test de cytotoxicité plaquettaire anti-cellulaire et un test anti-parasitaire ont été effectués pour chaque prélèvement provenant de patients allergiques ou intolérants aux AINS. Ainsi il apparait que les deux tests sont significativement corrélés. Dans le cas d'une stimulation liée à l'aspirine nous obtenons un coefficient de corrélation $r=0,878$ ($n=11$; $p < 0,001$) (figure 2), tandis que pour une stimulation dépendante de l'IgE $r=0,893$ ($n=8$; $p < 0,005$) (figure 3).

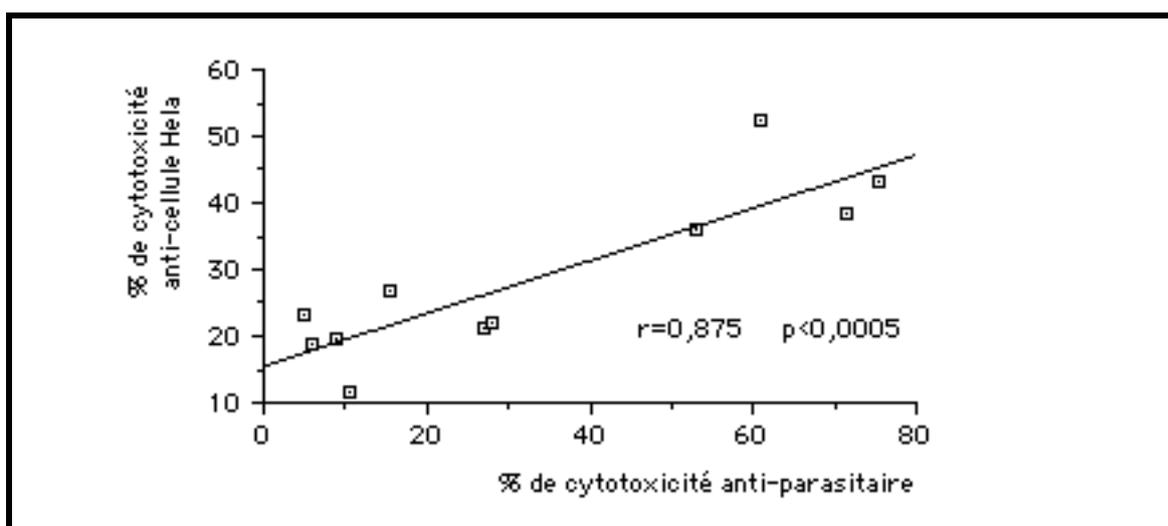


Figure 2 : Corrélation entre cytotoxicité anti-cellulaire et anti-parasitaire dépendant de l'aspirine.

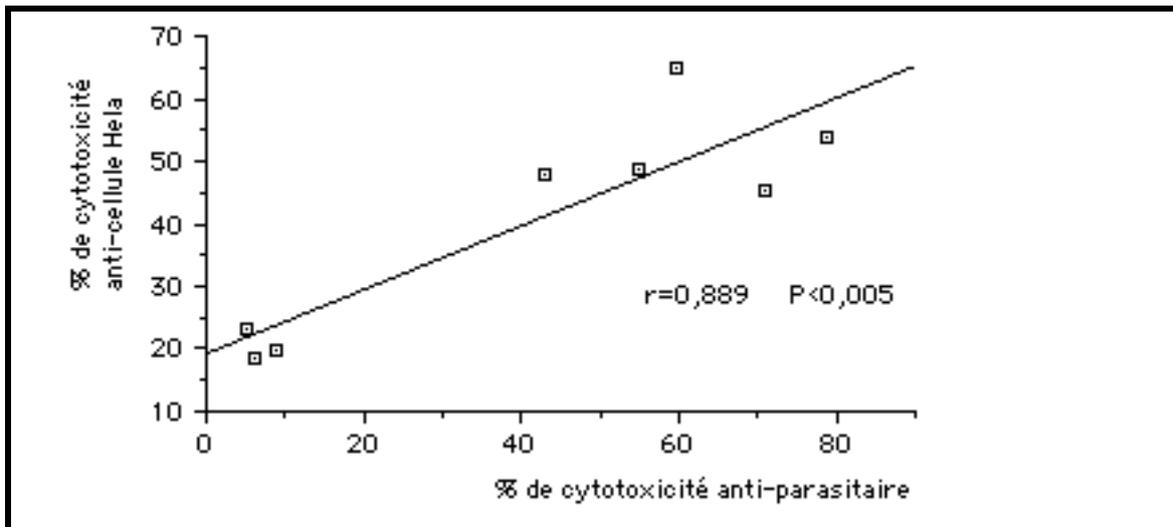


Figure 3 : Corrélation entre cytotoxicité anti-cellulaire et anti-parasitaire dépendant de l'IgE.

4.1.3. Etude des médiateurs et mécanismes de la cytotoxicité plaquettaire.

4.1.3.1. Les médiateurs.

Des plaquettes de sujets sains, sensibilisées passivement, ont été testées pour leurs capacités cytotoxiques en présence d'un piègeur de radicaux libres (l'acide benzoïque) à des concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-3} M ou en présence d'enzymes interférant avec la chaîne radicalaire: la catalase ou la superoxyde dismutase. Nous observons que l'acide benzoïque à la concentration de 10^{-5} M est susceptible d'inhiber la cytotoxicité plaquettaire de 46% (figure 4). Seule la SOD semble avoir un effet inhibiteur significatif (SOD: inhibition de 88%; catalase: inhibition de 26%; SOD+catalase: inhibition de 92%) (figure 5).

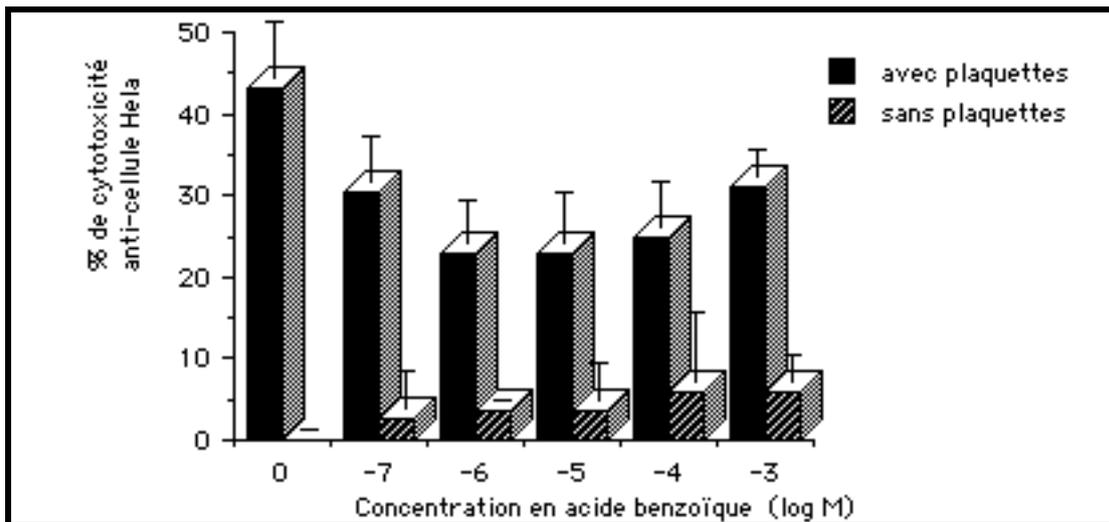


Figure 4 : Effet piègeur de l'acide benzoïque sur la cytotoxicité anti-cellule Hela dépendante de l'aspirine.

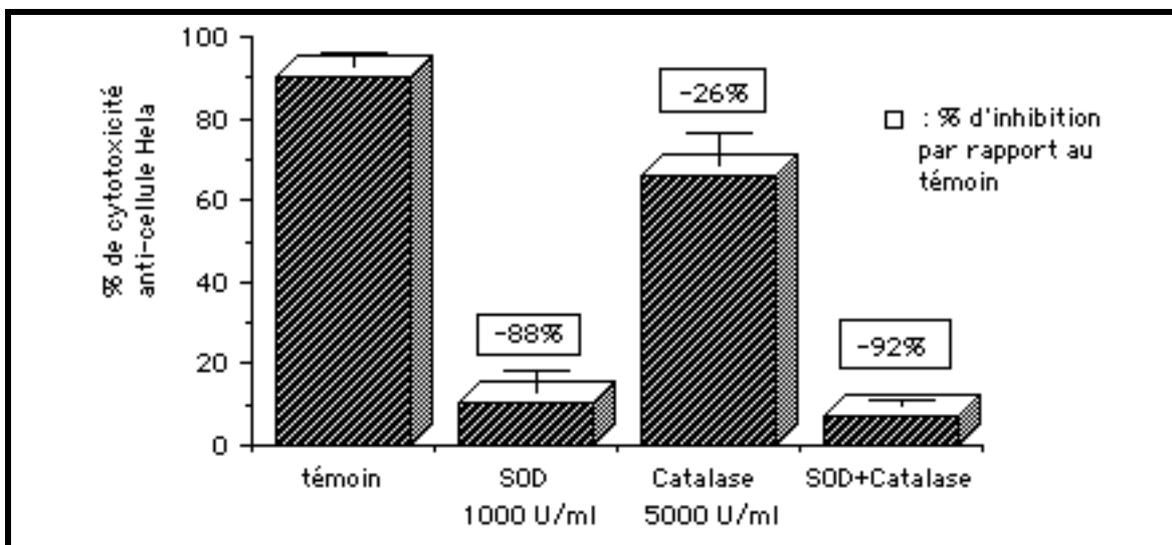


Figure 5 : Effet de la SOD et de la catalase sur la cytotoxicité anti-cellule Hela dépendante de l'aspirine.

4.1.3.2. **Activité clastogène des plaquettes.**

L'activité clastogène des plaquettes a été étudiée en comparant la fréquence de caryotypes anormaux, chez les cellules Hela, observés avec des plaquettes activées et non activées. Qualitativement, dans le cas de plaquettes activées, nous observons des caryotypes présentant des anomalies de forme (fragments de chromosomes isolés, bras de chromosomes non symétriques). Quantitativement nous constatons une augmentation significative du pourcentage de caryotypes anormaux en présence de plaquettes activées ou de surnageants de plaquettes activées (plaquettes activées: $35,5 \pm 2,1\%$; plaquettes non activées:

23,0 ±4,2%; p<0,01) (tableau 4). A noter que les cellules cultivées en absence de plaquettes présentent aussi des images de mitoses anormales (17,0 ±1,1%), cela pouvant être due au caractère transformé des cellules cibles utilisées. Afin de vérifier que l'activité clastogène des plaquettes observée précédemment était bien due aux radicaux libres, le milieu de culture a été additionné de SOD (1000 U/ml). Dans ce cas nous constatons que le pourcentage de caryotypes anormaux revient à son niveau de base: 22,0 ±2,8%. A noter que nous avons obtenu des résultats similaires pour les cellules K562 (résultats non présentés).

	Pourcentage de mitoses anormales (moyenne ±écart type)
Cellules Hela en présence de :	17 ±1,1
plaquettes non activées	23 ±4,2 *
plaquettes activées	35,5 ±2,1 **
surnageant plaquettes non activées	19,5 ±0,7 *
surnageant plaquettes activées	30,5 ±0,7 **
plaquettes activées - SOD (1000U/ml)	22 ±2,8 *

Tableau 4: Effets clastogènes des plaquettes sur les cellules Hela NS; **: p<0,01 par rapport aux cellules seules)

4.2. Test colorimétrique de réduction du MTT.

4.2.1. Mise au point du test.

4.2.1.1. Concentration de la suspension plaquettaire.

La réactivité de plaquettes de sujets sains, sensibilisées passivement par du sérum d'allergiques riche en IgE, a été évaluée par le test colorimétrique au MTT. La quantité optimum de plaquettes par cupule a été établie à 10^7 plaquettes des concentrations supérieures risquant d'entraîner une agrégation spontanée. L'absorbance naturelle des plaquettes aux longueurs d'onde utilisées dans le test colorimétrique est négligeable à la concentration plaquettaire utilisée (milieu seul DO=0.007, milieu plus plaquettes DO=0,016).

4.2.1.2. Concentration de la solution de MTT.

Après activation des plaquettes issues de sujets sains, allergiques et intolérants à l'aspirine, différentes dilutions de la solution-mère de MTT ont été utilisées pour le test colorimétrique. La concentration qui donne le meilleur différentiel entre plaquettes activées et non activées est de 4 mg/ml (figure 6). C'est cette concentration qui a été utilisée pour les tests ultérieurs.

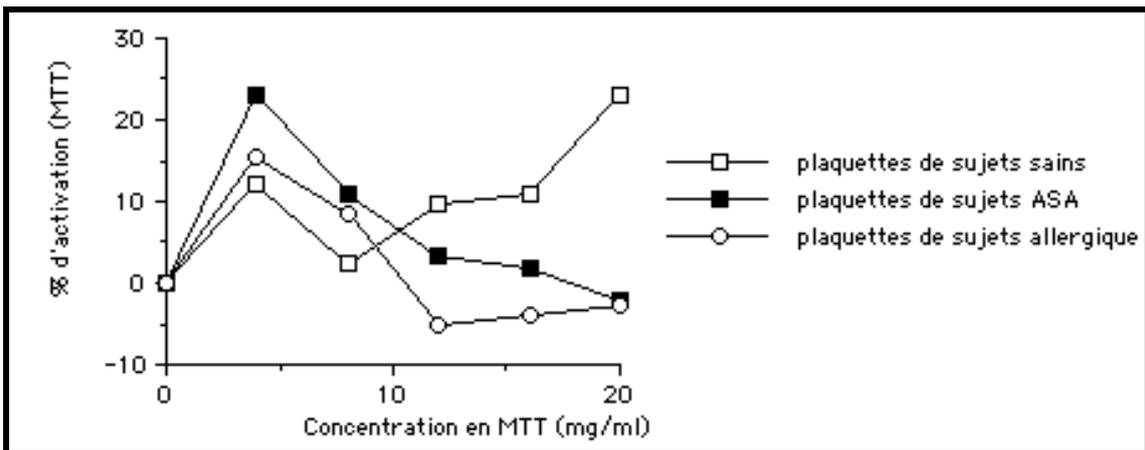


Figure 6 : Effet de la concentration en MTT (sujets ASA : sujets intolérants à l'aspirine)

4.2.1.3. Cinétique.

Une cinétique d'activation des plaquettes de patients intolérants à l'aspirine a été réalisée pour déterminer la durée d'incubation nécessaire avant le test colorimétrique pour obtenir le meilleur différentiel entre plaquettes activées et non activées. La figure 7 montre que cette durée est comprise entre 12 et 18 h d'incubation à 37 °C et 5 % CO₂ dans l'air. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les plaquettes de sujets sains, sensibilisées passivement, ou de patients allergiques.

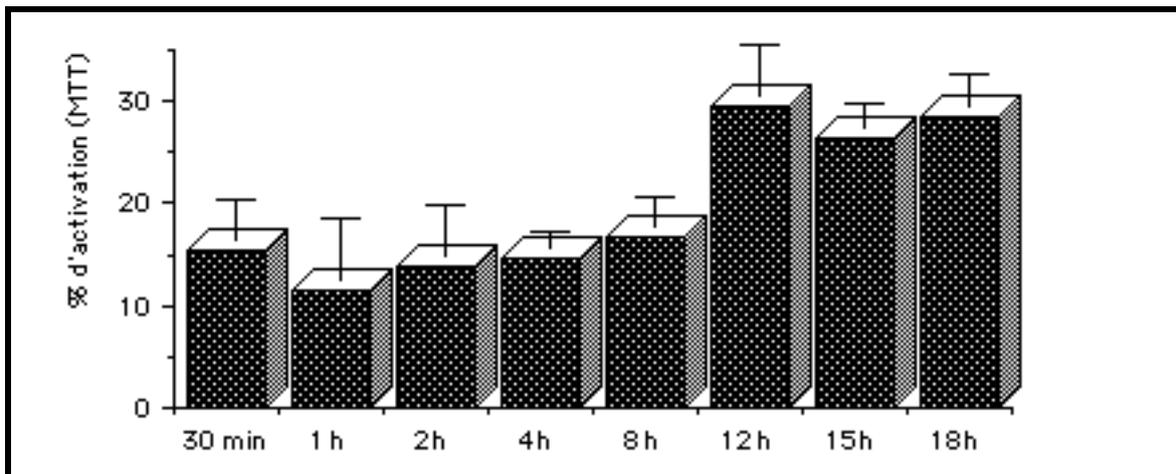


Figure 7 : Cinétique de l'activation plaquettaire avant réduction du MTT.

4.2.2. Réduction du MTT et stimulation plaquettaire.

4.2.2.1. Stimulation plaquettaire liée à l'IgE.

Des plaquettes de sujets sains, sensibilisées passivement, ainsi que des plaquettes de sujets allergiques ont été stimulées soit

par l'allergène spécifique soit par des anticorps anti-IgE. Nous observons que la réduction du MTT est augmentée par rapport à la réduction du MTT par les plaquettes en absence du déclencheur (sujets sains: +21,0 ±4,6%; sujets allergiques: +33,1 ±9,9%). D'autre part, nous constatons que la spécificité du test est liée à la nature de l'activateur plaquettaire. En effet, la quantité de MTT réduit reste faible lorsque les plaquettes sont mise en présence d'un allergène non spécifique des IgE fixées sur les plaquettes (sujets sains: +3,8 ±3,5%; sujets allergiques: +5,95 ±5,7%) (tableau 5).

		Réduction du MTT exprimée en % d'augmentation de la DO (moyenne ±écart-type)		
Origine des plaquettes		Allergène Spécifique (10 ⁻³ IR/ml)	Allergène non spécifique (10 ⁻³ IR/ml)	Anti-IgE (250 µg/ml)
sujets sains	n	21 ±4,6 *	3,8 ±3,5	32,2 ±8 *
sujets allergiques	6	33,1 ±9,9 *	5,95 ±5,7	

Tableau 5: Test colorimétrique au MTT: stimulation plaquettaire dépendant de l'IgE. *: p<0,001 par rapport à la stimulation par l'allergène non spécifique.

4.2.2.2. Stimulation plaquettaire liée à l'aspirine.

Des plaquettes de sujets sains et de sujets intolérants à l'aspirine ont été incubées en présence d'aspirine. Le tableau 6 montre que des plaquettes potentiellement réactives à l'aspirine induisent une réduction plus importante du MTT en présence qu'en l'absence d'aspirine (+34,8 ±9,8%). Par contre, l'aspirine n'induit qu'une faible augmentation de la réduction du MTT par des plaquettes de sujets sains par rapport à la réduction spontanée en absence d'aspirine (+10,2 ±9,8%, différence non significative par rapport à la réduction spontanée).

		Réduction du MTT exprimée en % d'augmentation de la DO (moyenne ±écart-type)
Origine des plaquettes		Aspirine (0,6 mM)
sujets sains	n	10,2 ±6,3
sujets intolérants	24	34,8 ±9,8 *

Tableau 6: Test colorimétrique au MTT: stimulation dépendant de l'aspirine *: p<0,001 par rapport aux sujets sains

4.2.2.3. Corrélation du test colorimétrique avec la cytotoxicité plaquettaire.

Pour évaluer s'il existe une corrélation entre le test colorimétrique de réduction du MTT par les plaquettes et la cytotoxicité plaquettaire anti-parasitaire, les deux tests ont été effectués en parallèle pour chaque

prélèvement provenant de patients allergiques ou pseudoallergiques. Ainsi il apparait que la corrélation entre les deux types de tests est statistiquement significative. En effet, pour une activation plaquettaire liée à l'aspirine nous obtenons un coefficient de corrélation $r=0,723$ ($n=44$; $p<10^{-4}$) (figure 8), tandis que pour une activation dépendante de l'IgE $r=0,965$ ($n=8$; $p<10^{-4}$) (figure 9).

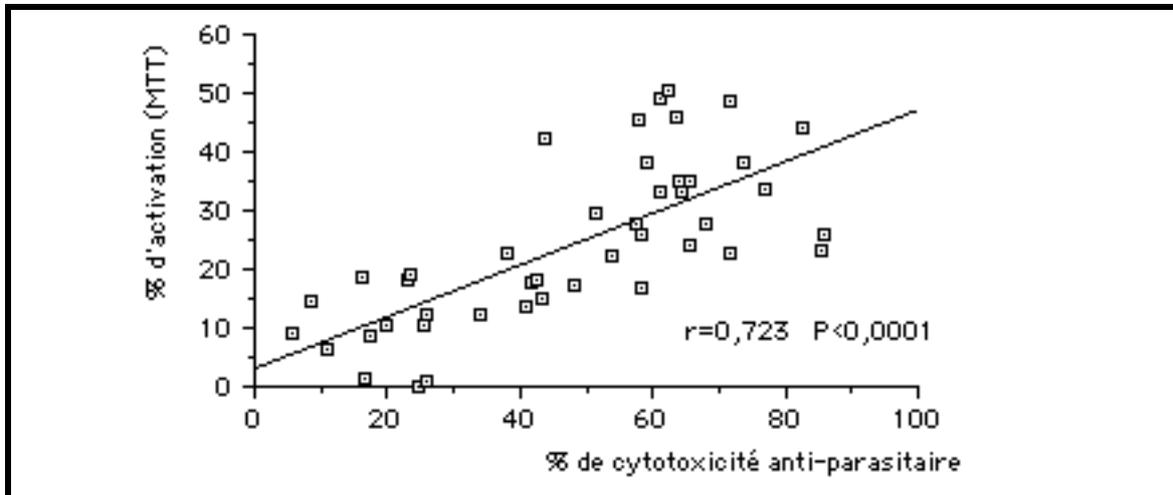


Figure 8 : Corrélation du test colorimétrique et de la cytotoxicité plaquettaire dépendante de l'aspirine.

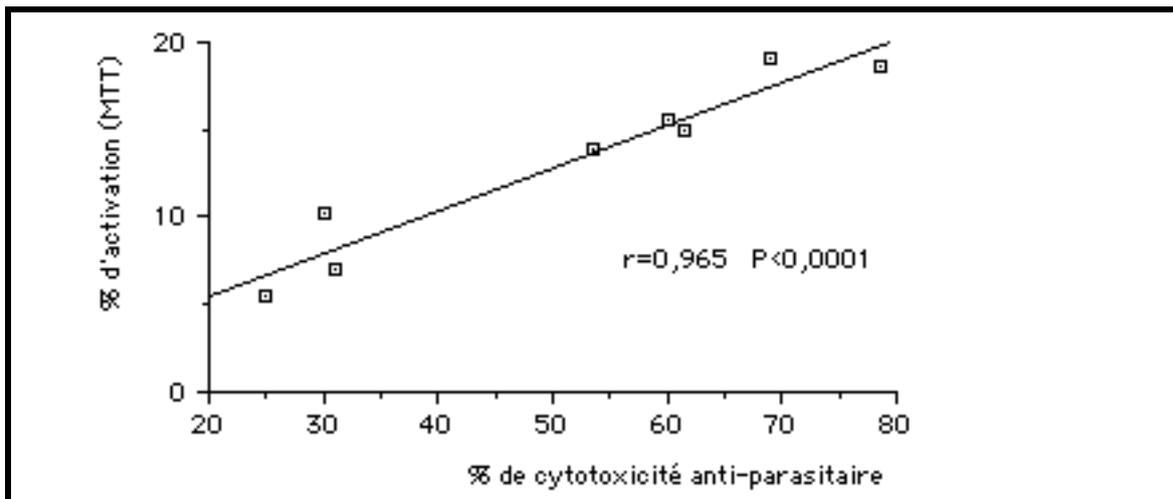


Figure 9 : Corrélation du test colorimétrique et de la cytotoxicité plaquettaire dépendante de l'IgE.

4.2.3. Etude du système MTT-réductase des plaquettes.

Additifs	Concentration	réduction du MTT exprimée en % de variation de la DO (moyenne \pm écart-type)
Antimycine A	0,0036 % (p/v)	62,3 \pm 19,9
Chlorpromazine	0,8 mM	90,6 \pm 0,4
Stélazine	0,8 mM	88,8 \pm 2,2
Cytochrome C	0,004% (p/v)	16,3 \pm 6
	0,008 % (p/v)	22,8 \pm 7,7
Azide	13 mM	15,9 \pm 6,8
Antimycine A + Chlorpromazine	0,0036 %+0,8 mM	-99,4
+ Stélazine	0,0036 %+0,8 mM	-90,8
+Cytochrome C	0,0036 %+0,004 %	-85,3

Tableau 7: Effets de différents inhibiteurs de la chaîne d'oxydation cellulaire sur la réduction du MTT par les plaquettes

Le tableau 7 résume les effets de différents facteurs qui agissent au niveau de la chaîne d'oxydation cellulaire (COC) sur la réduction du MTT. L'antimycine A inhibe la réduction du MTT de 62,3 \pm 19,9%. Les dérivés des phénothiazines semblent être les meilleurs inhibiteurs de la réductions du MTT (chlorpromazine: -90,6 \pm 0,4%; stélazine: -88,8 \pm 2,2%). La réduction non sensible à l'antimycine A est inhibée par les phénothiazines indiquant que ceux-ci affectent le système MTT-réductase à un point plus tardif dans la COC. L'inhibition accrue de la réduction du MTT par des doses croissantes de cytochrome c semble indiquer que le MTT est normalement réduit au niveau de ce composant de la COC. En présence d'azide enfin, la production de MTT-Formazan loin d'être inhibée, subit une augmentation de 15,9 %. Ce composé n'a donc que peu d'effets sur le système MTT-réductase. Le ou les sites de réduction du MTT doivent donc se trouver en amont de la cytochrome oxydase (Cyt aa3) (figure 10).

5. DISCUSSION.

Le travail que nous présentons ici a été réalisé dans le but de définir deux nouveaux paramètres d'activation plaquettaire venant en complément des mesures obtenues par chimioluminescence et par cytotoxicité plaquettaire anti-parasitaire.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux capacités cytotoxiques de la plaquette vis-à-vis d'une nouvelle cible cellulaire. Certains auteurs ont déjà pu mettre en évidence une participation plaquettaire à des mécanismes de cytotoxicité, mais ceux-ci impliquaient en outre la présence d'autres types cellulaires (activité synergique plaquettes-monocytes) (19). D'autres auteurs ont étudiés la cytotoxicité plaquettaire dirigée contre des érythrocytes dans le but de mieux connaître les mécanismes déclencheurs (rôle des anticorps et composants du complément) et de localiser au niveau de l'ultrastructure de la plaquette les facteurs responsables de cette cytotoxicité (20).

Les résultats que nous présentons ici démontrent que la plaquette possède une activité cytotoxique à l'encontre de cellules eucaryotes et en particulier vis-à-vis de la cellule Hela. Il faut toutefois noter que la plaquette n'est pas capable de lyser les cellules K 562, si l'on en juge par l'exocytose de ^{51}Cr . Toutefois en présence de plaquettes activées les cellules K562 voient leur capacité à incorporer de la ^3H -thymidine fortement inhibée (Joseph M., résultats non publiés). Il semble donc que la plaquette ne présente pas de spécificité de cible cellulaire mais plutôt qu'il existe des lignées cellulaires plus ou moins résistantes à l'agression plaquettaire.

Dans l'étude visant à déterminer les mécanismes de cette cytotoxicité plaquettaire nous avons pu démontrer que les métabolites de l'oxygène jouent un rôle prédominant et en particulier les éléments de la chaîne radicalaire (O_2^- , OH^\cdot , H_2O_2), bien que l'eau oxygénée ne semble intervenir que pour une part limitée (faible inhibition de la cytotoxicité par addition de catalase au milieu réactionnel). Le fait que les radicaux libres soient, au moins en partie, responsables de l'activité cytotoxique de la plaquette permet d'expliquer l'absence de spécificité de cible.

L'action destructrice des radicaux libres au niveau chromosomique ayant été de nombreuses fois rapportée (21,22), leur génération parmi les médiateurs cytotoxiques générés par la plaquette nous a permis de supposer l'existence d'une activité clastogène de ces éléments sanguins vis-à-vis de cibles cellulaires eucaryotes. De fait, nous avons pu mettre en évidence une activité clastogène des

plaquettes et même des surnageants plaquettaires. Ce dernier point permet de confirmer l'absence de spécificité de cible cellulaire de la plaquettes qui est capable d'induire des images de mitoses anormales même chez la cellule K562. Cette activité clastogène pouvant correspondre à l'apparition de lipopéroxydes générés à partir des lipides membranaires sous l'effets des métabolites de l'oxygène (25).

Dans un second temps nous avons recherché un test colorimétrique permettant l'évaluation de la réactivité plaquettaire .

La mise en évidence d'un système réducteur des sels de tétrazolium au niveau mitochondrial (23,24) a permis la réalisation de différents tests permettant l'évaluation de la viabilité cellulaire (14,15). Il a été montré, en outre, que cette réduction pouvait être utilisée pour la mesure de l'activation cellulaire (16).

Nous avons ainsi établi que des plaquettes sont susceptibles de réduire des sels de tétrazolium, et en particulier le MTT. De plus, l'utilisation de différents facteurs agissant sur la chaîne d'oxydation cellulaire (23,24) nous a permis de déterminer les sites de réduction du MTT au niveau de cette chaîne. Au regard des pourcentages d'inhibition de la réduction du MTT obtenus après action de ces différentes molécules, nous pouvons déduire que le MTT est réduit au niveau des cytochrome b et c₁. Un deuxième point de réduction peut correspondre à une interaction entre le MTT et le cytochrome c, le MTT pouvant entrer en compétition avec le cytochrome c comme nous le suggère l'inhibition de la réduction observée pour des doses croissantes de cytochrome c.

Il semble que cette réduction soit en relation avec le niveau de stimulation de la plaquette. En effet, qu'il s'agisse d'une stimulation liée à l'IgE ou d'une stimulation par l'aspirine, nous observons une augmentation du MTT-formazan généré. Toutefois cette réduction accentuée du MTT dans le cas de plaquettes de patients allergiques, bien que significativement augmentée est moindre que celle obtenue pour des plaquettes de patients intolérants à l'aspirine. Cette différence peut être liée au fait que, en moyenne, seulement 40 % des plaquettes de patients allergiques sont susceptibles de fixer les IgE et donc d'être activées (5) alors que pour les patients intolérants aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, il semble que l'ensemble de la population plaquettaire puisse réagir (11).

Il faut noter cependant que ce nouveau paramètre ne fait pas appel aux mêmes critères métaboliques que la cytotoxicité plaquettaire. Ainsi la réduction du MTT nous renseigne sur l'état global du métabolisme plaquettaire, tandis que la cytotoxicité anti-parasitaire nous renseigne sur la capacité de production de médiateurs cytotoxiques en relation avec le métabolisme de l'oxygène.

Pour valider ces nouveaux paramètres d'évaluation de la réactivité plaquettaire, il était nécessaire de montrer une corrélation entre la réduction du

MTT, la cytotoxicité plaquettaire anti-cellulaire et le paramètre d'activation précédemment utilisé: la cytotoxicité plaquettaire dirigée contre des larves parasitaires (larves de *Schistosoma mansoni*). Nous montrons en effet que ces deux méthodes de mesure de la réactivité plaquettaire sont significativement corrélées avec le paramètre antérieur, quelle que soit la voie d'activation de la plaquettes.

Au regard des résultats que nous présentons, il nous apparait donc que le test colorimétrique permettrait une approche simple de la réactivité plaquettaire, tandis que le test de cytotoxicité anti-cellulaire serait dédié à une analyse plus fine des critères de stimulation de la plaquette.

6. CONCLUSION.

En conclusion de ce travail il apparait que la plaquette est capable d'exercer une activité cytotoxique directe vis-à-vis d'une cible cellulaire eucaryote, ce phénomène se traduisant par l'induction d'une activité clastogène supportée par les métabolites de l'oxygène générés après activation plaquettaire. D'autre part la plaquette est susceptible de réduire les sels de tétrazolium proportionnellement à son niveau de réactivité, que ce soit lors d'une stimulation dépendant de l'IgE et de l'allergène, ou d'une stimulation par l'aspirine. La mise au point de ces deux nouveaux tests de réactivité plaquettaire (la cytotoxicité anti-cellulaire et le test colorimétrique de réduction du MTT) est ainsi susceptible de compléter, ou de remplacer, les critères antérieurs d'activation de cet élément sanguin. De plus, au regard de la simplicité de mise en oeuvre du test colorimétrique, il est concevable d'imaginer sa large utilisation par tous ceux qu'intéresse l'étude de la réactivité plaquettaire. Il permettrait en outre une évaluation simple de la réactivité plaquettaire aux allergènes ou aux AINS ou encore un suivi fiable de l'évolution de la sensibilité des patients dans des protocoles thérapeutiques tels que la désensibilisation.

7. REFERENCE

1. Kay A.B. - Leucocytes in asthma. *Immunol. Invest.*, 1988, 17, 679-705.
2. Melewicz F.M., Spiegelberg H.L. - Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, 1980, 125, 1026-1031.
3. Dessaint J.P., Torpier G., Capron M., Bazin H., Capron A. - Cytophilic binding of IgE to the macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. *Cell Immunol.*, 1979, 46, 12-23.
4. Capron M., Capron A., Dessaint J.P., Torpier G., Johansson S.G.O., Prin L. - Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.*, 1981, 126, 2087-2092.
5. Joseph M., Capron A., Ameisen J.C., Capron M., Vorng H., Pancré V., Kusnierz J.P., Auriault C. - The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.*, 1986, 16, 306-312.
6. Metzger W.J., Sjoerdsma B.A., Richerson H.B., Moseley P., Zavala D., Monick M., Hunninghake G.W. - Platelets in bronchoalveolar lavage from asthmatic patients and allergic rabbits with allergen-induced late phase responses. *Agents Actions*, 1987, suppl. 21, 151-159.
7. Oxholm P., Winther K. - Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy*, 1986, 41, 1-10.
8. Joseph M., Capron A., Tscopoulos A., Damonville M., Pancré V., Cesbron J.Y., Lassalle P., Tonnel A.B. - Les plaquettes sanguines dans les réactions allergiques et inflammatoires. *Rev. fr. Allergol.*, 1989, 20, 197-205.
9. Page C. -The role of platelets in allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy*, 1990, 20, 339-340.
10. Maestrelli P., Boschetto P., Zocca E., Crescioli S., Baroldi P., Mapp C., Fabbri L.M. - Venous blood platelets decrease during allergen-induced asthmatic reactions. *Clin. Exp. Allergy*, 1990, 20, 367-372.
11. Ameisen J.C., Capron A., Joseph M., Maclouf J., Vorng H., Pancré V., Fournier E., Wallaert B., Tonnel A.B. - Aspirin sensitive asthma: abnormal platelet response to drugs inducing asthmatic attacks. Diagnostic and physiopathological implications. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1985, 78, 438-448.

12. Pearson J.J., Suarz-Mendez V.J. - Abnormal platelet hydrogen peroxide metabolism in aspirin hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy*, 1990, 20, 157-163.
13. Joseph M., Auriault C., Capron A., Vorng H., Viens P. - A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 1983, 303, 810-812.
14. Mosmann T. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Imm. Methods*, 1983, 65, 55-63.
15. Monner D.A.- An assay for growth of mouse bone marrow cells in microtiter liquid culture using the tetrazolium salt MTT, and its application to studies of myelopoiesis. *Immunology letters*, 1988, 19, 261-268.
16. Gerlier D., Thomasset N. - Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Imm. Methods*, 1986, 94, 57-63.
17. Brunner K.T., Mauel J., Cerrotini J.C., Chapuis B. - Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*. *Immunology*, 1968, 14, 181.
18. Moorhead P.S., Nowel P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. - Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 1960, 20, 613.
19. Ibele G.M., Kay N.E., Johnson G.J., Jacob H.S. - Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood*, 1985, 65, 1252-1255.
20. Slezak S., Symer D.E., Shin H.S. - Platelet-mediated cytotoxicity. Role of antibody and C3, and localization of the cytotoxic system in membranes. *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 489-505.
21. Michelson A.M. - Oxygen radicals. *Agents Actions Suppl.*, 1982, 11, 179-201.
22. Emerit I., Cerutti P. - Clastogenic activity from blood syndrome fibroblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 1868-1872.
23. Slater T.F. - Studies on a succinate-neotetrazolium reductase system of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 365-382.
24. Slater T.F., Sawyer B., Strauli U.- Studies on a succinate-tetrazolium reductase systems., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 383-393.
25. Cesbron J.Y., Capron A., Vargaftig B.B., Lagarde M., Pincemail J., Braquet P., Taelman H., Joseph M. - Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*, 1987, 325, 533-536.