

Métabolisme et phagocytose des éosinophiles et neutrophiles de cheval

Autor(en): **Dreyer, Jean-Luc / Portmann, Plato**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **66 (1977)**

Heft 1

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308544>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Métabolisme et phagocytose des éosinophiles et neutrophiles de cheval

par JEAN-LUC DREYER et PLATO PORTMANN,¹⁾
Institut de Chimie physiologique de l'Université
de Fribourg (Suisse)

Introduction

Dans l'organisme humain ou animal, les processus de défense sont largement tributaires de la capacité des globules blancs à intégrer et à dégrader les substances étrangères ou toxiques. De nombreux auteurs (ISHIKAWA et al., 1974; BAINTON et al., 1976; DUHAMEL, 1976) ont déjà souligné le fait que la phagocytose constitue l'une des fonctions essentielles des granulocytes. Aussi celle-ci a été l'objet d'études morphologiques et biochimiques intensives. Les difficultés considérables d'obtenir des préparations pures d'un seul type de leucocytes, notamment une préparation d'éosinophiles, n'ont pas permis pour l'instant une approche biochimique détaillée de ce processus de défense sur une population particulière et homogène de cellules. Avec l'élaboration d'une méthode d'isolation d'éosinophiles pures (FELLAY, 1971; JOERG et al., 1974; DREYER, 1974; JOERG, 1978), les granulocytes neutrophiles et éosinophiles, issus probablement d'une même lignée hématopoiétique, se prêtaient particulièrement bien à une étude comparative de cette fonction importante, car ces deux types de leucocytes assument la défense dans des situations pathologiques différentes.

L'activité phagocytaire étant étroitement liée à la glycolyse et à d'autres voies métaboliques fondamentales, nous nous sommes penchés sur les incidences de ce processus sur le métabolisme énergétique. L'activité des divers enzymes jalonnant la voie d'Emden-Meyerhof a été déterminée (DREYER, 1974). Cependant, le dosage des enzymes *in vitro* ne fournit qu'une image très imparfaite du déroulement des voies métaboliques, car l'intensité d'un métabolisme dépend avant tout de l'activité réelle de ces enzymes dans l'environnement physiologique, selon une régulation que leur impose le taux intracellulaire des coenzymes et des substrats ou la présence d'activateurs et d'inhibiteurs.

¹⁾ Dédié à M. le Prof. Dr. méd. A. Faller pour son 65^e anniversaire

La phagocytose représente un processus extrêmement complexe de l'activité cellulaire, dans lequel interviennent de très nombreux facteurs: la nature des substances à phagocyter, le complément, les opsonines, le taux extracellulaire et intra-cellulaire de certains métabolites et des ions, comme le calcium, des facteurs chimiotactiques et d'autres facteurs. Il était donc nécessaire, devant la complexité du phénomène et la multitude des facteurs en cause, de restreindre notre étude de la phagocytose dans des conditions bien définies et limitées. C'est pour cette raison que nous avons comparé, dans le travail qui suit, la consommation d'oxygène, la libération d'enzymes et le taux intracellulaire des métabolites des cellules au repos et en état de phagocytose de complexes antigène-anticorps.

Matériel et méthodes

Isolation des cellules éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles sont isolés selon la méthode décrite par FELLAY (1971) et JOERG (1978). En bref, après sédimentation spontanée du sang de cheval, le plasma, les leucocytes, ainsi que la partie supérieure des érythrocytes, sont recueillis et centrifugés durant 14 min. à 2500 g.

La couche leucocytaire et le plasma sont soigneusement aspirés. Le sédiment érythrocytaire contenant les éosinophiles est mélangé à une solution de NaCl à 1 % contenant 6 % de polyvinylpyrrolidon (K 60, Fluka) et 10 % de plasma. Après sédimentation spontanée durant 40 min., le surnageant est aspiré et centrifugé durant 8 min. à 650 g. Le sédiment contenant les éosinophiles et quelques érythrocytes est repris dans un peu de plasma et hémolysé durant 30 sec. par l'addition de 5 volumes d'eau dist., puis ramené à l'isotonie par un même volume de NaCl à 2 %, et centrifugé comme auparavant. Le sédiment obtenu contient 95–100 % d'éosinophiles. Les cellules sont lavées et suspendues dans 12 ml de sérum frais de cheval, prélevé le même jour et dialysé durant 4 h. contre 3 charges successives d'une solution de NaCl à 1 % contenant du CaCl_2 0,075 M. On détermine le nombre de cellules dans cette suspension par la méthode de l'hématocrite, étalonnée par une numération indépendante.

Isolation des cellules neutrophiles

La couche leucocytaire prélevée pour l'isolation des cellules éosinophiles est centrifugée durant 8 min. à 650 g. On hémolyse le sédiment dans les conditions décrites plus haut. Le sédiment est ensuite lavé dans une solution de saccharose 0,3 M et recentrifugé, puis suspendu dans un même volume de cette solution. Deux volumes de la suspension sont mélangés à un volume de Ficoll-Paque (Pharmacia). Le mélange est centrifugé durant 10 min. à 400 g. On recueille le

sédiment, qui est considérablement enrichi en granulocytes neutrophiles (80–87 %) et pratiquement exempt de lymphocytes. Ce sédiment est mis en suspension dans le même milieu que les éosinophiles. On ajuste soigneusement le nombre de cellules de la suspension selon le résultat de l'hématocrite, jusqu'à ce que la concentration cellulaire soit exactement la même que celle de la suspension d'éosinophiles.

Préparation de complexes antigène-anticorps marqués

Ceux-ci consistent en γ -globulines de cheval complexés avec de l'antisérum anti-cheval de lapin. Les protéines sériques du sang de cheval sont au préalable concentrées comme suit : le plasma du sang de cheval est recueilli et défibriné par 5 ml de CaCl_2 1 M pour 100 ml. On incube 1 h. à 37° , puis une nuit à 0° et on décante. La solution est diluée avec un même volume de NaCl à 1 %, puis ajustée à 0° par l'addition de sulfate d'ammonium à 33 % de saturation. Après 18 h. à 0° on centrifuge. Le précipité contenant les γ -globulines est dissous dans 1 volume de NaCl 0,15 M et la solution est reprecipitée à 55 % de saturation de sulfate d'ammonium à 0° . Après 8 h. on centrifuge. Le précipité est dissous dans du NaCl 0,15 M dialysé contre cette même solution afin d'éliminer les sels d'ammonium, puis ajusté à environ 100 mg/ml.

3 ml de cette solution de γ -globulines, assez pures à l'électrophorèse, sont ajustés à pH 7,4 par l'addition de 0,2 ml de tampon phosphate 0,5 M. On ajoute par ailleurs à 0,1 ml d'une solution de NaI-125 (Amersham Inc.) 0,075 ml de tampon phosphate 0,5 M de pH 7,4. Les deux solutions sont mélangées vigoureusement et on ajoute successivement 0,075 ml de chloramine T (4 mg/ml dissous dans du tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4) puis 0,3 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (2,4 mg par ml dissous dans le même tampon) et enfin 0,6 ml de KI (10 mg par ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7,4). La solution est ensuite passée sur une colonne de Sephadex G-50 (50 x 1 cm) traitée au préalable par 30 ml d'une solution d'albumine à 2 %. On élue avec une solution de NaCl à 1 % et on recueille des fractions de 2 ml. Les fractions contenant les protéines marquées sont lyophilisées, puis reprises dans 1 ml de NaCl à 1 % et dialysées pendant 3 h. contre 3 charges successives d'une solution de NaCl à 1 %. A la fin, on dilue les protéines marquées à 100 mg par ml avec du NaCl à 1 %.

On fait surnager cette solution sur 1 ml d'antisérum anti-cheval de lapin. Après 15 min. la solution est centrifugée à 3000 g durant 30 min. et l'on recueille le précipité qui est soigneusement lavé dans du NaCl à 1 % et recentrifugé dans les mêmes conditions. On répète trois fois ce lavage, afin d'obtenir des complexes antigène-anticorps marqués exempts d'excès d'antisérum et d'antigène libre. Après la dernière centrifugation, les complexes sont mis en suspension dans 3,5 ml de sérum de cheval frais, prélevé à l'abattoir le jour de l'expérience et préalablement dialysé durant au moins 4 heures contre une solution 4

fois renouvelée de NaCl à 1 % contenant 0,075 % de CaCl₂ et 0,007 % de glucose, jusqu'à ce que les métabolites présents dans le sérum frais soient éliminés. L'emploi de sérum congelé ou de plasma défibriné ne convient pas pour la préparation de cette suspension.

Essais de phagocytose

Les essais de phagocytose sont réalisés immédiatement après l'isolation des cellules. Les cellules sont mises en suspension dans du sérum frais comme indiqué plus haut après l'avoir dialysé contre du NaCl à 1 % et du CaCl₂, 0,075 M jusqu'à élimination totale des métabolites présents. 5 ml de suspension cellulaire (neutrophiles ou éosinophiles) dont la teneur en cellules a été déterminée sont incubés avec 1 ml de la suspension des complexes marqués, décrite plus haut. La durée de l'incubation varie entre 3 et 30 min. selon le type d'expérience projetée. Les cellules au repos sont incubées avec 1 ml de sérum exempt de complexes antigène-anticorps et dialysé préalablement contre du NaCl à 1 % contenant du CaCl₂ et du glucose. De la sorte, les milieux d'incubation renferment des quantités constantes de glucose et de calcium au temps initial. L'essai à blanc consiste en 6 ml de sérum renfermant les mêmes concentrations de glucose et de calcium que les essais. Chaque fois, un test parallèle est effectué à 0°, afin d'établir le taux de diffusion passive du glucose dans les cellules ainsi que de mesurer l'absorption des complexes marqués à la surface cellulaire.

A la fin de la réaction, un échantillon de 2 ml et un de 0,2 ml sont prélevés de chaque suspension incubée à 37° et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Le premier échantillon sert au dosage des intermédiaires du métabolisme énergétique, le deuxième au dosage des nucléotides. Pour maintenir la température d'incubation jusqu'au moment de la congélation, les pipettes et tubes à essai employés sont préalablement tempérés à 37°.

Le reste de la suspension est centrifugé à 400 g durant 5 min. pour sédimenter les cellules. Les complexes antigène-anticorps non absorbés demeurent dans le surnageant. On décante la solution et on mesure la radioactivité du surnageant et du culot cellulaire. Le surnageant est ensuite employé pour le dosage des activités enzymatiques et du glucose non dégradé.

La consommation d'oxygène durant la phagocytose a été mesurée au moyen d'une électrode à oxygène (Yellow Spring Instruments 4004) et d'un oxygraphe Ilford 113. Le volume final d'incubation pour ces essais est alors ramené à 1,2 ml. A la fin de la réaction, 0,5 ml respectivement 0,2 ml de suspension sont rapidement congelés dans l'azote liquide en vue du dosage des intermédiaires et des nucléotides.

Préparation des extraits

On ajoute aux cellules congelées dans l'azote le sixième du volume d'acide perchlorique concentré et on homogénéise 3 fois durant 1 min. à l'aide d'un homogénéisateur en verre avec piston en teflon. On centrifuge l'homogénat à 1800 g durant 10 min. Le résidu est repris dans un même volume d'acide perchlorique 0,6 N, puis homogénéisé et recentrifugé comme la première fois. Les extraits sont réunis et neutralisés à pH 5,0 par une solution froide de KOH saturé, en évitant tout excès de KOH qui entraînerait une hydrolyse appréciable de certains métabolites. On laisse reposer 30 min. à 0° puis on s'assure que la précipitation du perchlorate est complète. La présence de perchlorate influence défavorablement les dosages. La solution est alors centrifugée et le résidu est jeté. Les extraits sont conservés à 0° et analysés immédiatement après leur préparation.

Dosage des intermédiaires de la glycolyse et des nucléotides

Le dosage des nucléotides pyrimidiques a été réalisé dans un extrait de 0,2 ml de suspension prélevé spécialement à la fin de la phagocytose selon les indications de PASSONEAU et LOWRY (1974) par la méthode appelée enzymatic cycling.

Le dosage de tous les autres intermédiaires a été effectué selon les techniques de dosage décrites par CARTIER et al. (1967) à partir des extraits préparés comme décrit plus haut. Dans certains cas, le mode opératoire de Cartier a été fait avec le dixième des volumes indiqués, les concentrations de pyridine-nucléotides formés étant alors déterminées par cyclage enzymatique.

Dosage et électrophorèse des enzymes

Les techniques décrites par MEYER (1975) ont été appliquées pour le dosage des enzymes et pour les électrophorèses sur gel de polyacrylamide.

Résultats

Marquage radioactif et préparation des complexes antigènes-anticorps

L'étude comparative du métabolisme des leucocytes éosinophiles et neutrophiles de cheval au repos et pendant la phagocytose d'immunocomplexes a été effectuée avec des complexes marqués à l'iode 125. Le choix de ces complexes aurait dû tenir compte de la fonction physiologique présumée des éosinophiles (ISHIKAWA et al., 1974; BAINTON et al., 1976; DUHAMEL, 1976), la phagocytose de complexes formés d'antigènes et d'immunoglobulines E. Puisque des immunoglobulines E de cheval, spécifiques pour un antigène déterminé n'étaient

pas disponibles, nous avons choisi un complexe formé de γ -globulines de cheval comme antigène et d'immunoglobulines anti-cheval de lapin comme anticorps.

Le marquage des γ -globulines, isolées à partir de sérum de cheval, selon une méthode décrite pour des protéohormones (GREENWOOD et al., 1963) n'a pas donné de bons résultats. En effet, les γ -globulines ainsi marquées n'étaient que partiellement précipitées par l'antisérum de lapin. Cette difficulté a pu être surmontée par l'emploi d'une concentration de protéines plus élevée. Il en résultait un marquage moins complet (66–75 % de la radioactivité initiale), par contre, les γ -globulines gardaient leur spécificité antigénique envers l'antisérum de lapin. Pour diminuer l'absorption des γ -globulines à la surface du Sephadex G-50 lors de leur séparation des sels et des produits de réaction secondaires, un traitement préalable de la colonne par une solution d'albumine à 2 % donnait de bons résultats. Dans ces conditions, la séparation des γ -globulines marquées et de l'iodure de sodium a été complète (fig. 1).

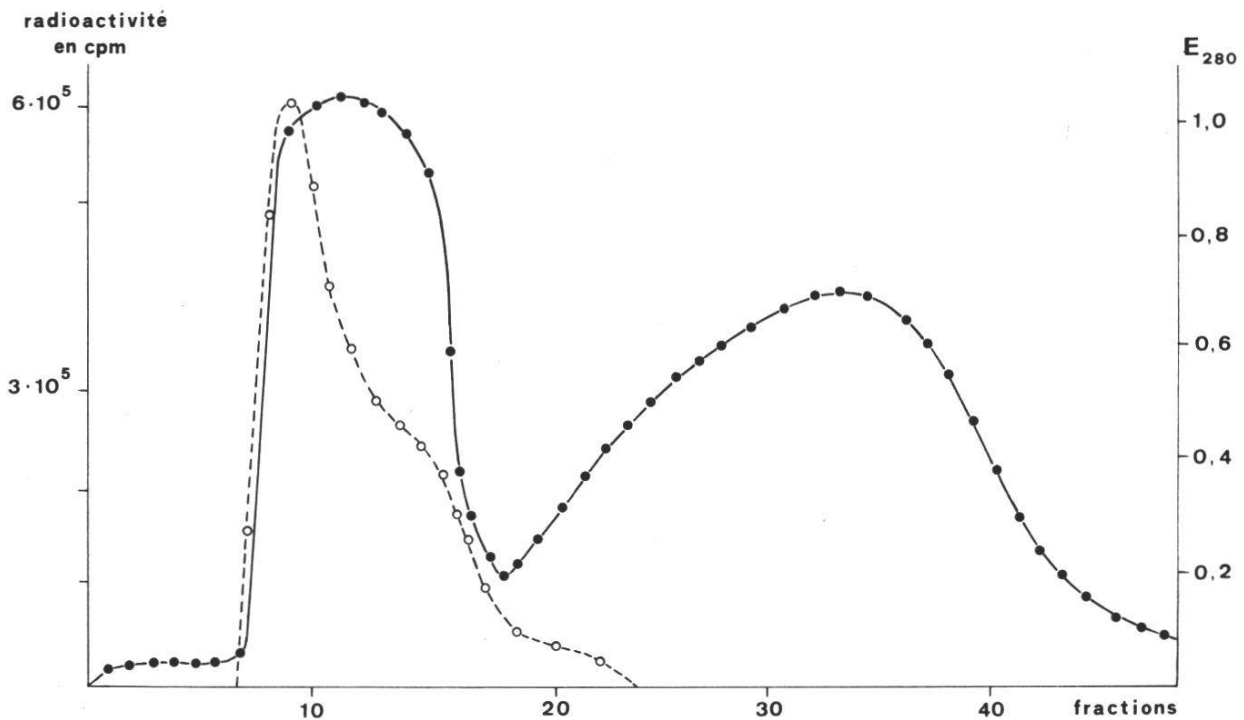


Fig. 1 : Séparation des γ -globulines marquées à l'iode-125 de l'excès de NaI-125 par filtration sur une colonne Sephadex G-50. Radioactivité — ; protéines (E_{280}) ----.

Les complexes, précipités après 15 min. de réaction entre un antisérum de lapin anti-cheval et une solution de γ -globulines de cheval marquées à l'iode 125 superposée, ont été centrifugés et lavés plusieurs fois avec une solution de NaCl à 1 %. Ce lavage fait perdre environ 15 % du complexe, mais il est absolument nécessaire pour éliminer l'excès des immunoglobulines de lapin, inhibant la phagocytose. Des complexes moins solubles, obtenus après un temps de précipita-

tion plus long, sédimentent trop facilement et n'ont pas donné des résultats de phagocytose constants.

Essais de phagocytose

La phagocytose a été étudiée avec des cellules aussi fraîches et vitales que possible, mais nous ne sommes pas arrivés à isoler les éosinophiles et les neutrophiles dans un temps plus court que 5–6 heures après l'abattage de l'animal.

D'autre part, il était inévitable, durant l'isolation de ces cellules, de les enlever de leur milieu physiologique et de les soumettre à l'influence défavorable de plusieurs centrifugations, de substances anticoagulantes (EDTA) et de l'hémolyse. Pour toutes ces raisons, il était difficile d'obtenir *in vitro* des résultats de phagocytose constants. Pour augmenter la reproductibilité des résultats, nous avons isolé les cellules selon un programme rigoureusement constant et nous avons maintenu les concentrations de glucose et de calcium aussi constantes que possible. Le glucose a été ajouté à la suspension cellulaire en même temps que les complexes antigène-anticorps pour éviter une stimulation préalable du métabolisme. D'autre part, des mesures de consommation d'oxygène, de glucose et une estimation de l'adsorption à 0° des complexes à la surface cellulaire sans phagocytose ont été effectuées. La diffusion du glucose à 0°, petite pour des cellules intactes, a permis d'évaluer l'intégrité de la membrane cellulaire. C'est pour cela que les essais montrant un fort passage intracellulaire de glucose à 0° n'ont pas été retenus.

Pour permettre enfin une comparaison valable du métabolisme des neutrophiles et des éosinophiles, nous avons ajusté dans les deux séries d'expériences le nombre des cellules suspendues à environ $3 \cdot 10^5$ par essai et leur valeur exacte a été contrôlée dans chaque cas.

Un problème spécial résultait de la rapidité avec laquelle les concentrations des métabolites intracellulaires, surtout l'état d'oxydation des pyridine-nucléotides, changent. Pour avoir un temps de phagocytose et de métabolisme à 37° rigoureusement défini, nous étions contraints de pipetter l'échantillon prélevé après l'incubation avec une pipette préchauffée à 37° dans un récipient ayant la même température afin que la suspension cellulaire garde la température jusqu'au moment exact de la congélation dans l'azote liquide.

Dans nos conditions expérimentales, les cellules sont en présence d'un grand excès de complexes antigène-anticorps. Comme il ressort du tableau 1, la quantité de particules phagocytées est un peu plus grande pour les éosinophiles que pour les neutrophiles. Elle représente 9,6 % resp. 8,2 % de la radioactivité initiale. L'incubation dans les mêmes conditions du même nombre de cellules à 0° montrait une adsorption de 10 %, resp. de 8,9 % de la radioactivité à la surface des cellules sédimentées et lavées. Puisqu'à cette température la phagocytose

est pratiquement nulle, cette valeur a été déduite de celle trouvée après l'incubation à 37° dans le culot cellulaire lavé. Mesurée en même temps, la consommation du glucose pendant la phagocytose augmente de 39 % resp. de 104 % pour les deux types de cellules.

Ces résultats ne représentent que la consommation du glucose résorbé par les cellules à partir du milieu d'incubation; celle concernant la dégradation simultanée du glycogène intracellulaire n'a pas été mesurée. Puisque les neutrophiles sont plus riches en glycogène (environ 350 $\mu\text{g}/10^9$ cellules) que les éosinophiles (environ 240 $\mu\text{g}/10^9$ cellules), la dégradation totale du glucose due à la phagocytose, provenant soit du glycogène intracellulaire soit du glucose extracellulaire résorbé, peut, pour les deux types de cellules, être différente de celle correspondant à la diminution de la concentration du glucose observée dans le milieu d'incubation.

La comparaison de la consommation d'oxygène dans les éosinophiles et les neutrophiles vient à l'appui de cette hypothèse. La cinétique de cette consommation d'oxygène est représentée dans la fig. 2 et son aspect quantitatif dans le tableau 2. Ces résultats montrent que le métabolisme oxydatif des neutrophiles est davantage stimulé durant la phagocytose (+ 264 % de la consommation d'oxygène au repos) que celui des éosinophiles (+ 95 %) bien que ces derniers phagocytent un peu plus de complexes radioactifs.

Les diagrammes de la consommation d'oxygène en fonction du temps d'incubation (fig. 2) rendent aussi visible une consommation d'oxygène plus rapide dans les neutrophiles, soit au repos, soit pendant la phagocytose. On peut en conclure qu'à part le glucose résorbé à partir du milieu d'incubation, d'autres substances, éventuellement le glycogène intracellulaire, sont métabolisées pendant la phagocytose, surtout dans les neutrophiles, augmentant ainsi la consommation d'oxygène.

Dosage de métabolites présents dans les leucocytes au repos et pendant la phagocytose

L'extraction des métabolites phosphorylés, dont certains sont instables en milieu acide (ATP, ADP, p.ex.) et d'autres détruits en milieu basique (PEP, GAP, DHAP, etc.), nécessitait une défécation et une extraction rapide, quantitative, reproductible et sans influence inhibitrice sur les dosages enzymatiques de ces substances. A cause de son action inhibitrice, l'acide trichloracétique ne convenait pas à nos essais. Nous avons adapté à notre problème spécifique la méthode préconisée pour un travail analogue par CARTIER et al. (1967). Le point délicat de cette méthode était la neutralisation et la précipitation quantitative de l'acide perchlorique dans l'extrait sans dépasser le pH 7 et en maintenant un très petit volume. Dans les conditions décrites sous "Matériel et Méthodes", il

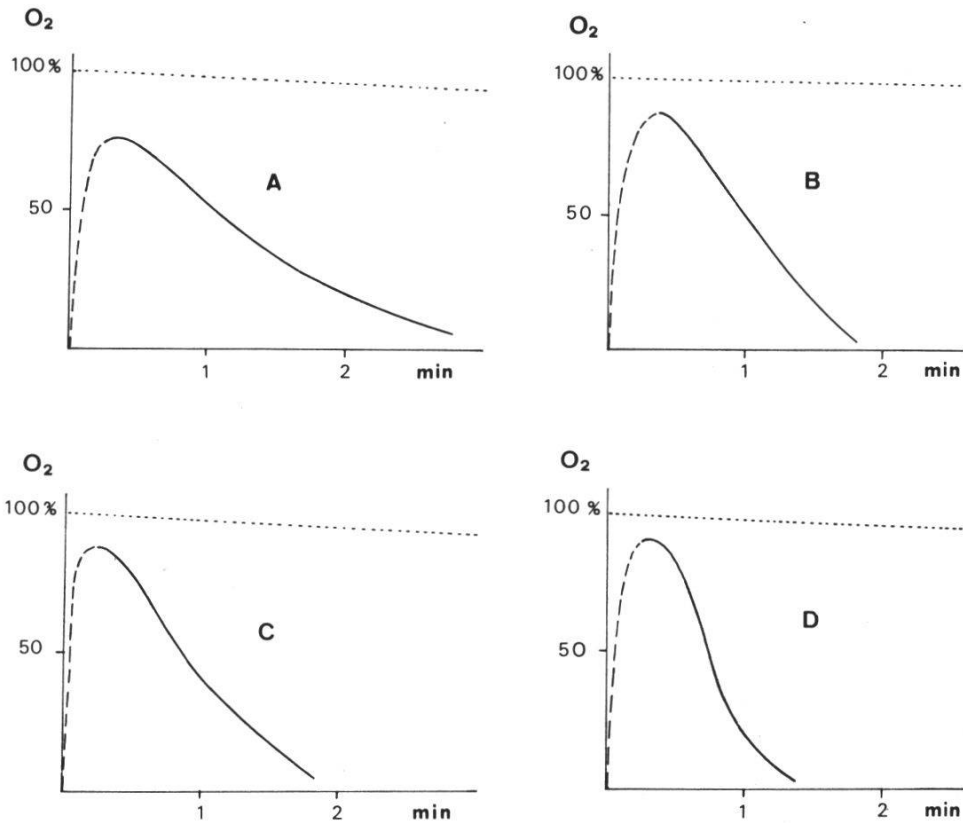


Fig. 2: Aspect dynamique de la consommation d'oxygène par les leucocytes. Variation de la concentration d'oxygène dans le milieu d'incubation en fonction du temps. 100 % $O_2 = PO_2$ du milieu d'incubation saturé en oxygène ($PO_2 = 657$ mm Hg à 37°). Eosinophiles (a), neutrophiles (B) au repos; éosinophiles (C), neutrophiles (D) durant la phagocytose. $3,5 \cdot 10^5$ cellules et 50 mg de complexes antigène-anticorps par essai. Changement du PO_2 des essais à blanc:

est possible d'obtenir un extrait déprotéinisé et exempt d'acide perchlorique permettant un dosage reproductible des métabolites.

Les résultats de ces dosages sont réunis dans le tableau 3. Ils sont indiqués en nmoles de métabolites présents dans 10^9 cellules au repos ou après une phagocytose d'une durée de 30 min. On constate que les concentrations respectives d'ATP, d'ADP et d'AMP sont presque égales dans les neutrophiles et dans les éosinophiles au repos. En état de phagocytose, on observe par contre, suivant le type de cellules, une diminution de l'ATP de 45 % resp. de 29 % et une augmentation proportionnelle de l'ADP et de l'AMP.

Quant aux métabolites de la glycolyse, les deux variétés de leucocytes montrent pendant la phagocytose une augmentation du lactate de 19 % resp. de 32 % par rapport aux concentrations trouvées à l'état de repos. Les autres métabolites ne montrent guère de changements de concentration, exceptés le glucose-6-phosphate, le glucose-1-phosphate, le fructose-6-phosphate et le fructose-1,6-

diphosphate dans les éosinophiles. Ces quatre substances diminuent sensiblement pendant la phagocytose. Les résultats du dosage de l'état oxydé et réduit des coenzymes NAD et NADP indiquent une légère augmentation du NAD réduit et du NADP oxydé.

Dosage des enzymes libérés durant la phagocytose

Pendant la phagocytose de complexes antigène-anticorps des enzymes granulaires apparaissent dans le milieu d'incubation. Cette libération d'enzymes intracellulaires dépend de la nature et du fonctionnement des cellules ainsi que de la température d'incubation. Si pour les neutrophiles la libération de ces enzymes à 0° et à 37° est presque identique en présence ou en absence de complexes antigène-anticorps, elle est beaucoup plus prononcée à 37° pour les éosinophiles en état de phagocytose. Ces résultats ressortent de la fig. 3. On y remarque une forte libération de peroxydase, si les éosinophiles sont incubés à 37°.

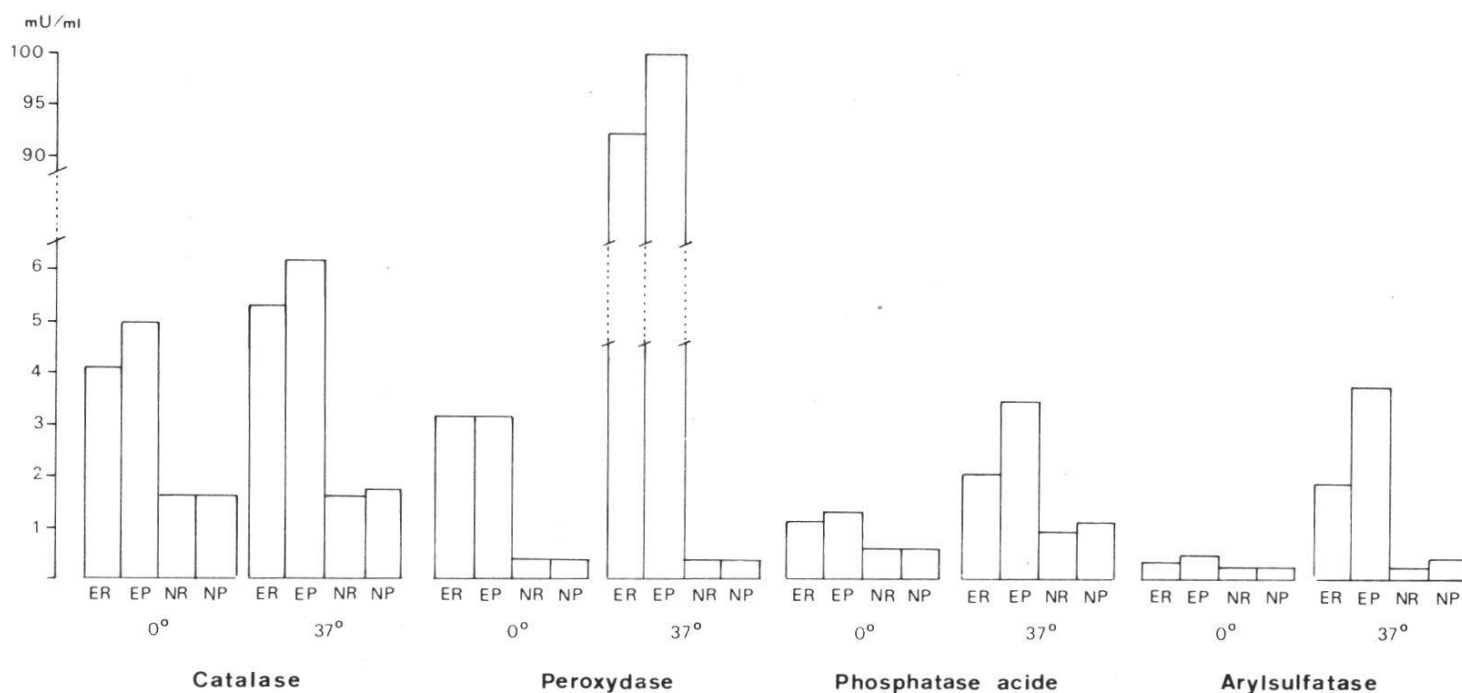


Fig. 3: Libération d'enzymes dans le milieu d'incubation durant la phagocytose. Eosinophiles (ER) et neutrophiles (NR) au repos; éosinophiles (EP) et neutrophiles (NP) phagocytant des complexes antigène-anticorps. La hauteur des barres indique l'activité en milliunités par ml du milieu d'incubation. Durée d'incubation: 30 min.; nombre de leucocytes par essai: environ $3 \cdot 10^5$ cellules.

Celle-ci augmente encore nettement en présence de complexes antigène-anticorps. La phosphatase acide et surtout l'arylsulfatase, deux autres enzymes localisés dans les granules éosinophiles, sont libérés davantage encore pendant la

phagocytose à 37°. La catalase par contre est déjà libérée assez fortement à 0° et son activité dans le milieu extracellulaire augmente un peu pendant la phagocytose à 37°.

Le moins que l'on puisse déduire de ces observations est que les granules des éosinophiles sont beaucoup plus labiles que ceux des neutrophiles et que les éosinophiles relâchent ces enzymes facilement en fonction de l'activité de leur métabolisme. Il y a probablement une réaction entre la phagocytose et l'apparition de ces enzymes dans le milieu extracellulaire. Tous ces phénomènes sont absents ou minimes dans le cas des leucocytes neutrophiles.

Il est intéressant de constater que, dans nos essais, tous les isoenzymes de la phosphatase acide et de la peroxydase présents dans les granules éosinophiles ont été libérés dans les mêmes proportions que celles trouvées dans les granules (JOERG, 1978; MEYER, 1975). Ceci a été démontré par une disclectrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Discussion

Notre étude comparative des leucocytes durant la phagocytose confirme dans l'ensemble les observations faites par d'autres auteurs sur les neutrophiles et les monocytes (CLINE et al., 1968; WEENING et al., 1974). Pour les éosinophiles, nous avons pu constater une influence analogue de la phagocytose sur leur métabolisme. En particulier nous avons observé une diminution du NADP réduit durant la phagocytose, aussi bien dans les éosinophiles que dans les neutrophiles. Ceci peut être mis en relation avec les hypothèses de certains auteurs (STOSSEL, 1974), selon lesquelles la phagocytose provoque une accumulation intracellulaire de H_2O_2 , due à une stimulation de la NADPH-oxydase. Nos résultats concernant les enzymes apparaissent dans le milieu d'incubation permettent de supposer une dégranulation importante dans les éosinophiles accompagnée d'une libération des enzymes intragranulaires, notamment de la peroxydase, passant en partie à travers la membrane cellulaire. La peroxydase et la catalase atteignant une concentration intracellulaire élevée peuvent faciliter la destruction de H_2O_2 formée pendant la phagocytose.

D'autre part, nos résultats ont montré une accumulation de certains produits intermédiaires de la glycolyse tout particulièrement du lactate et, dans les éosinophiles, une diminution des esters phosphoriques du glucose et du fructose pendant la phagocytose. Ceci confirme les observations de STOSSEL (1974), selon lesquelles la glycolyse est stimulée durant la phagocytose, de même que la consommation du glucose et de l'oxygène.

Le fait que l'on n'a pas pu constater pendant la phagocytose une apparition d'enzymes dans le milieu d'incubation des neutrophiles laisse supposer une dégranulation beaucoup moins importante dans ces cellules, qui cependant ne peut

pas être exclue sur la base de nos observations car nos dosages enzymatiques ne concernaient que le milieu extracellulaire, c'est-à-dire les enzymes ayant passé par la membrane cellulaire. Nos essais montrent par ailleurs la grande fragilité des éosinophiles par rapport aux neutrophiles, mais un pouvoir comparable de phagocyter des complexes antigène-anticorps.

Les résultats présentés dans ce travail montrent certains aspects particuliers de la phagocytose qui est un phénomène extrêmement complexe dépendant fortement des conditions expérimentales et des manipulations préalables que l'on effectue sur les cellules. Elle dépend également beaucoup de la nature des substances offertes aux phagocytes et de l'avidité des cellules pour ces complexes, certains d'entre eux étant sans doute phagocytés de préférence. Des complexes d'une autre nature, faisant intervenir d'autres types d'immunoglobulines, fourniraient peut-être une image différente de certains résultats présentés ici et pourraient fournir une base d'approche complémentaire de la signification fonctionnelle des éosinophiles. Cet aspect du problème fait l'objet d'une étude en cours.

Ce travail a été rendu possible grâce à une subvention du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (FNSRS) no 3.270-0.74 à qui vont nos remerciements. L'un de nous (J.-L.D.) remercie en outre le FNSRS de lui avoir accordé une bourse de relève.

Résumé

L'influence de la phagocytose sur le métabolisme des granulocytes neutrophiles et éosinophiles du cheval a été étudiée. La comparaison du pouvoir de phagocytose d'immun-complexes, préparés à partir de γ -globulines de cheval radioactives avec un immunosérum de lapin anti-cheval, n'a pas montré de différence majeure entre les neutrophiles et les éosinophiles.

Les concentrations intracellulaires d'ATP, ADP, AMP, de NAD/NADH, NADP/NADPH, des produits intermédiaires de la glycolyse et la consommation d'oxygène ont été mesurées dans les granulocytes au repos et en phagocytose. Pendant la phagocytose, nous avons pu constater dans les deux types de cellules une diminution égale de la concentration d'ATP et une augmentation analogue de l'AMP. Les produits intermédiaires de la glycolyse sont restés assez stables à l'exception du glucose-1-phosphate, du glucose-6-ph et du fructose-1, 6-diphosphate qui ont diminué fortement, mais seulement dans les éosinophiles. Pendant la phagocytose, la concentration du lactate et du NADH a augmenté, tandis que celle du NADPH a diminué. Quant à l'augmentation de la consommation d'oxygène, nous avons trouvé qu'elle était quatre fois plus forte dans les neutrophiles que dans les éosinophiles.

Enfin, une étude comparative de la libération, pendant la phagocytose, d'enzymes localisés dans les granules a montré que la catalase, la peroxydase, la phosphatase acide et l'arylsulfatase sont relâchées en beaucoup plus grande quantité par les éosinophiles que par les neutrophiles.

Zusammenfassung

Der Stoffwechsel von ruhenden und phagozytierenden neutrophilen und eosinophilen Pferdeleukozyten wurde vergleichend untersucht. Die Phagozytose von radioaktiven Immunkomplexen, hergestellt durch Fällung markierter Pferde- γ -Globuline mit Kaninchen-Antipferdeserum, erfolgte in beiden Zellarten mit vergleichbarer Geschwindigkeit. Die intrazelluläre Konzentration von ATP, ADP, AMP, NAD/NADH, NADP/NADPH, sowie jene der wichtigsten Glykolyse-Zwischenprodukte und der Sauerstoffverbrauch wurden in den ruhenden und phagozytierenden Granulozyten bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass während der Phagozytose in beiden Zellarten ein ähnlicher Abfall der ATP-Konzentration mit einem entsprechenden Anstieg des AMP eintritt, dass die Konzentration der meisten Glykolyse-Zwischenprodukte mit Ausnahme des Glukose-6-phosphates, des Glukose-1-phosphates und des Fruktose-1, 6-diphosphates, die nur in den Eosinophilen stärker abnehmen, unverändert bleibt, dass sich aber das Laktat in den Zellen anreichert. Gleichzeitig erfolgte ein Anstieg des NADH, ein Abfall des NADPH und eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches. Letzterer stieg in den Neutrophilen viermal stärker an als in den Eosinophilen.

Der Vergleich der Abgabe granulaständiger Fermente an die Suspensionsflüssigkeit während der Phagozytose ergab einen viel stärkeren Austritt von Katalase, Peroxydase, saurer Phosphatase und Arylsulfatase aus den eosinophilen als aus den neutrophilen Granulozyten.

Summary

The influence of the phagocytosis on the metabolism of neutrophilic and eosinophilic granulocytes, isolated from horse blood, was studied. First the uptake of radioactive immunocomplexes, formed from labeled horse γ -globulins and rabbit antihorse serum, in the eosinophilic and the neutrophilic leucocytes has been compared. No significant difference was found.

The changes of the intracellular levels of ATP, ADP, AMP, NAD/NADH and NADP/NADPH during phagocytosis were determined and the oxygen consumption of resting and phagocytosing cells. A similar decrease of ATP and increase of NADH and a decrease of NADPH in both phagocytosing cell types were accompanied by increase of oxygen consumption, which was found four times greater in neutrophilic leucocytes.

Besides minor changes of the intermediates of the glycolytic pathway in both phagocytosing cells, a marked decrease of the phosphoric esters of glucose and fructose was found in the eosinophilic cells. Both cells accumulated lactate.

Finally the release of granular enzymes in the extracellular solution from incubated phagocytosing neutrophilic and eosinophilic cells was compared. This was found to be much greater in the eosinophilic leucocytes for catalase, peroxydase, acid phosphatase and arylsulfatase.

Références

- BAINTON, D.F., NICHOLS, B.A., and FARQUAHAR, M.G.: Primary lysosomes of blood leukocytes. *Lysosomes in biology and pathology*, vol.5, 3–29. North-Holland/American Elsevier 1976.
- CARTIER, P., LEROUX, J.P., et TEMKINE, H.: Technique de dosage des intermédiaires de la glycolyse dans les tissus. *Ann. biol. clin.* 25, 791–799 (1967).
- CLINE, J.J., HANIFIN, J., and LEHRER, R.I.: Phagocytosis by human eosinophils. *Blood* 32, 922–928 (1968).
- DREYER, J.-L.: Etude de la répartition intracellulaire des enzymes dans les éosinophiles du cheval. Thèse Fribourg 1974.
- DUHAMEL, G.: Physiologie des éosinophiles. *Nouv. Presse méd.* 5, 1054–1056 (1976).
- FELLAY, G.: Analyse biochimique des cellules et des granules éosinophiles isolés du sang de cheval. Thèse Fribourg/Genève 1971.
- GREENWOOD, J.C., HUNTER, W.M., and GLOVER, J.S.: The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114–123 (1963).
- ISHIKAWA, T., WICKER, K., and ARBESMAN, C.E.: In vitro and in vivo studies on uptake of antigen-antibody complexes by eosinophils. *Int. Arch. Allergy* 46, 230–248 (1974).
- JOERG, A.: Biochemische Untersuchungen an isolierten eosinophilen und neutrophilen Pferdegranulozyten. *Habilitationsschrift Fribourg* 1978.
- — —, DREYER, J.-L., und PORTMANN, P.: Neue Methode zur Isolierung der Granula aus reinen Pferde-Eosinophilen. *Experientia* 30, 688 (1974).
- MEYER, J.: Etude comparative des protéines et de quelques enzymes présents dans les granulocytes éosinophiles et neutrophiles du sang de cheval. Thèse Fribourg 1975.
- PASSONEAU, J.V., und LOWRY, O.H.: Messung durch "enzymatic cycling". In BERGMAYER, H.U.: *Methoden der enzymatischen Analyse Band II*, 3. Auflage, 2108. Verlag Chemie: Weinheim 1974.
- STOSSEL, T.P.: Phagozytosis. *New Engl. J. med.* 290, 774–780 (1974).
- WEENING, R.S., ROOS, D., and LOOS, J.A.: Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparations: a comparative study. *J. lab. clin. med.* 83, 570–576 (1974).

Tableau I : Teneur des leucocytes en métabolites.

Les résultats sont exprimés en nM présents dans
10⁹ cellules. Incubation : 30 min.

	NeR	NeP	EoR	EoP
ATP	271,5	148,3	236,2	168,5
ADP	277,1	289,5	271,0	314,1
AMP	71,4	113,3	86,3	113,3
G6P	0,3	0,2	1,9	0,2
G1P	1,0	1,1	1,1	0,2
F6P	1,6	1,4	2,7	1,8
F1P	0,2	0,3	0,3	0,3
F1,6P	15,7	15,7	17,2	14,5
DHAP	7,4	7,2	7,4	7,1
GAP	0,8	0,7	0,8	0,6
3PG	5,1	6,4	6,0	4,7
2PG	1,9	1,7	1,6	1,4
PEP	3,2	5,3	4,7	3,2
PYR	1,6	1,4	1,7	1,5
LAC	149,0	177,0	204,5	269,1
NAD	378,2	380,1	384,3	366,0
NADH	481,9	512,4	445,3	450,2
NADP	17,0	19,5	18,3	17,2
NADPH	106,7	95,2	84,2	78,1

NeR : neutrophiles au repos; NeP : neutrophiles en phagocytose;
EoR : éosinophiles au repos; EoP : éosinophiles en phagocytose;
G1P : glucose-1-P; G6P : glucose-6-P; F6P : fructose-6-P;
F1P : fructose-1-P; F1,6P : fructose diphosphate; DHAP : dihydroxyacétone phosphate; GAP : glycéraldéhyde phosphate; 3PG : 3-phosphoglycérate; 2PG : 2-phosphoglycérate; PEP : Phospho-énolpyruvate; PYR : pyruvate; LAC : lactate.

Tableau II : Phagocytose et adsorption de complexes antigène-anticorps marqués et consommation de glucose en $\mu\text{g}/\text{min}$ par 10^9 cellules. Temps d'incubation : 3 min.

	radioactivité initiale en cpm avant l'incubation à		radioactivité en cpm du culot cellulaire lavé, après incubation à		Différence
	37°	0°	37°	0°	
NeP	47'791	48'312	8'161 (17,1%)	4'302 (8,9%)	8,2%
EoP	50'233	49'817	9'863 (19,6%)	5'006 (10%)	9,6%

	consommation de glucose à 37° :		augmentation pendant la phagocytose
	37°	0°	
NeP	18,5 μg	NeR 13,3 μg	5,1 μg (39%)
EoP	9,3 μg	EoR 4,5 μg	4,7 μg (104%)

NeR : neutrophiles au repos;

NeP : neutrophiles en phagocytose

EoR : éosinophiles au repos;

EoP : éosinophiles en phagocytose

Tableau III : consommation d'oxygène par les leucocytes

Neutrophiles

au repos	$7,62 \pm 3 \mu\text{M}/\text{min}$ par 10^9 cellules
en phagocytose	$27,79 \pm 9,2 \mu\text{M}/\text{min}$ par 10^9 cellules

Eosinophiles

au repos	$6,1 \pm 2,8 \mu\text{M}/\text{min}$ par 10^9 cellules
en phagocytose	$11,91 \pm 3,2 \mu\text{M}/\text{min}$ par 10^9 cellules