

Effets de la Chloroquine sur les activités adénylate cyclasique et phosphodiésterasique de plaquettes humaines

La chloroquine inhibe l'agrégation de plaquettes provoquée par l'ADP¹ ou par le collagène² ainsi que la réaction d'excrétion induite par la thrombine ou le collagène³. L'AMP cyclique étant un élément régulateur important de la réaction d'excrétion et de l'agrégation plaquettaire⁴ (revue générale), nous avons étudié les effets de la chloroquine sur les activités adénylate cyclasique et phosphodiésterasique qui toutes deux règlent le taux de l'AMP cyclique intraplaquettaire.

Matériel et méthode. Les activités enzymatiques ont été mesurées dans des suspensions de plaquettes humaines lavées, préparées selon la méthode décrite⁵, et contenant en moyenne 1.5×10^6 plaquettes μl^{-1} (concentration finale).

L'activité adénylate cyclasique a été déterminée selon la technique de KRISHNA⁶ dans des plaquettes lysées et intactes. Dans ce dernier cas on détermine la quantité

de $^3\text{H-AMP}_c$ intracellulaire formé à partir de $^3\text{H-ATP}$ synthétisé par les plaquettes avec 2 précurseurs $^3\text{H-Adénine}$ et $^3\text{H-Adénosine}$; les plaquettes avant d'être mises au contact de l'inducteur sont incubées avec 100 μCi de $^3\text{H-Adénosine}$ (Amersham 17 Ci/mM) ou de $^3\text{H-Adénine}$ (CIS 24 Ci/mM) puis lavées. L' $^3\text{H-AMP}_c$ est isolé selon la technique décrite⁷.

L'activité phosphodiésterasique est mesurée selon la technique de POCH⁸ sur des surnageants de suspension de plaquettes lysées aux ultra-sons, dialysées à 4 °C 12 h contre une solution de *Tris HCl* $2 \times 10^{-2} M$ pH 7,35 et centrifugées 1 h à 100 000 g (ultracentrifugeuse Beckman L₄).

La chloroquine est testée chaque fois à la concentration finale de $10^{-3} M$ seule et en présence de thrombine 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Hoffman-Laroche) ou de collagène 1/10 (Sigma). Cette concentration de chloroquine donne une inhibition maximum de l'excrétion plaquettaire induite par la thrombine et le collagène³.

Résultats et discussion. La chloroquine comme la thrombine ne modifie pas l'activité phosphodiésterasique des plaquettes. Ses effets sur l'activité adénylate cyclasique sont complexes (Figures 1-3) et résument dans le Tableau. Elle inhibe d'abord cette activité mesurée dans des cellules lysées ou intactes avec $^3\text{H-Adénine}$ comme précurseur, mais elle est sans effet avec $^3\text{H-Adénosine}$. Elle se comporte donc dans notre système qui admet 2 voies de formation d' $^3\text{H-AMP}_c$ l'une à partir de $^3\text{H-Adénine}$, l'autre à

Tableau I. Effets de la chloroquine seule et en présence de thrombine ou de collagène sur l'Activité adénylate cyclasique de suspensions de plaquettes humaines lysées ou intactes, préalablement incubées avec $^3\text{H-Adénosine}$ ou $^3\text{H-Adénine}$

Substances testées	Plaquettes lysées		Plaquettes intactes
	$^3\text{H-Adénine}$	$^3\text{H-Adénosine}$	
Chloroquine	↓	↓	0
Collagène	0	↓	0
Collagène + Chloroquine	0	0	0
Thrombine	↓	0	↑
Thrombine + Chloroquine	0	0	0

↓ diminution significative ($p < 0,05$) par rapport à un témoin; 0 pas d'effet; ↑ augmentation significative ($p < 0,05$). L'étude statistique est faite par analyse de variance à partir de 8 mesures pour chaque groupe. La chloroquine est testée à la concentration finale de $10^{-3} M$, la thrombine 0,1 $\mu\text{g/ml}$ et le collagène au 1/10.

¹ A. E. CARTER, R. EBAN et R. D. PERRETT, Br. med. J. 1, 312 (1971).

² F. JOBIN et F. TREMBLAY, Thromb. Diath. haemorrh. 22, 466 (1969).

³ R. L. KINLOUGH-RATHBONE, M. A. PACKMAN et J. F. MUSTARD, observations non publiées.

⁴ E. W. SALZMAN, P. C. KENSLER et L. LEVINE, Ann. N.Y. Acad. Sci. 207, 61 (1972).

⁵ J. F. MUSTARD, D. W. PERRY, N. G. ARDLIE et M. A. PACKHAM, Brit. J. Haemat. 22, 193 (1972).

⁶ G. KRISHNA, B. WEISS et B. B. BRODIE, J. Pharmac. exp. Thér. 163, 379 (1968).

⁷ A. A. WHITE et T. V. ZANSER, Analyt. Biochem. 41, 372, (1971).

⁸ G. POCH, Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Pharmac. 268, 272 (1971).

⁹ E. W. SALZMAN et L. LEVINE, J. clin. Invest. 50, 131 (1971).

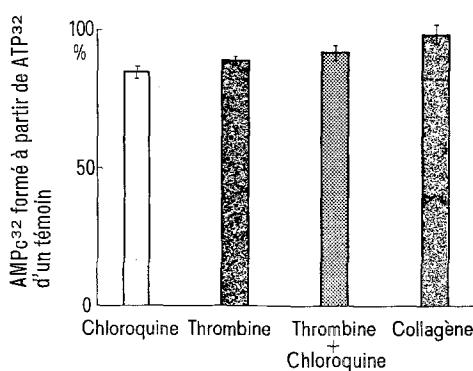


Fig. 1. Activité adénylate cyclasique mesurée dans des suspensions de plaquettes lysées. 9 mesures ont été faites. On a représenté la moyenne, et par la barre verticale, l'écart type de la moyenne. Le groupe chloroquine et le groupe thrombine sont significativement différents en % des témoins ($p < 0,05$), alors que le groupe collagène ne l'est pas; le groupe thrombine + chloroquine est aussi différent du groupe thrombine ($p < 0,05$).

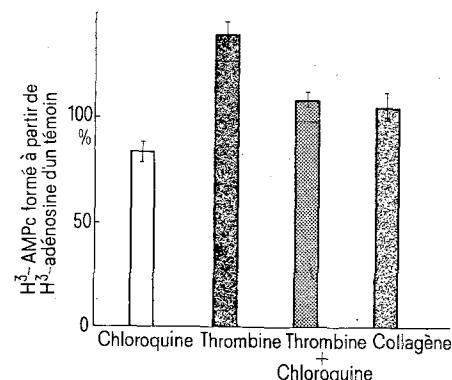


Fig. 2. Activité adénylate cyclasique mesurée dans des suspensions de plaquettes intactes préalablement incubées avec $^3\text{H-Adénosine}$. 5 mesures ont été faites. On a représenté la moyenne, et par la barre verticale, l'écart type de la moyenne. Seul le groupe thrombine est significativement différent en % des témoins ($p < 0,01$). Le groupe thrombine + chloroquine est de même différent du groupe thrombine ($p < 0,05$).

partir de ^3H -adénosine, comme le collagène, inducteur de l'excrétion plaquettaire: en effet, ce dernier n'inhibe que le système ayant ^3H -adénine comme précurseur; certes il n'a pas d'effet sur l'activité adénylate cyclasique mesurée dans des cellules lysées, selon la méthode de KRISHNA⁶, mais SALZMAN et LEVINE⁹ qui utilisent une autre technique ont montré qu'il était inhibiteur; la méthode de KRISHNA préconisant un excès d'ATP, il est possible que ce nucléotide triplement chargé négativement, sature en partie les charges positives du collagène l'empêchant de réagir avec les plaquettes.

La thrombine par contre inhibe l'activité adénylate cyclasique de cellules lysées mais ses effets sur des plaquettes intactes sont plus complexes: en effet paradoxalement elle stimule l'activité adénylate cyclasique lorsque ^3H -adénosine est le précurseur, mais c'est un phénomène tardif, survenant à la 3e minute, ce qui suggère qu'il puisse s'agir d'un phénomène de régulation¹⁰. DROLLER et WOLF¹¹ ont d'ailleurs montré que la thrombine provoque une augmentation du taux d' AMP_c , et ont émis l'hypothèse que la thrombine favoriserait la synthèse d'un activateur de l'adénylate cyclase. Il est aussi possible que la thrombine inhibe l'activité adénylate cyclasique ayant ^3H -adénine comme précurseur et que cet effet soit masqué en raison de l'action même de cet activateur synthétisé par la plaquette. Nous avons en effet mesuré la variation de ^3H - AMP_c induite par la thrombine à partir

de ^3H -adénine après 10 min d'incubation et il est possible que dans ces conditions l'on juge de deux phénomènes: d'une part, de l'inhibition de l'adénylate cyclase par un effet direct de la thrombine et d'autre part, d'une activation secondaire. Ainsi, le système ayant ^3H -adénine comme précurseur nous apparaît comme le système qui induit le déclenchement de la réaction d'excrétion, en provoquant une chute précoce du taux d' AMP_c .

La chloroquine inhibant l'activité adénylate cyclasique de cellules lysées et de ^3H - AMP_c à partir de ^3H -adénine devrait donc être un inducteur de la réaction d'excrétion plaquettaire; en réalité, elle inhibe si fortement la production d'énergie³ que la réaction d'excrétion ne peut avoir lieu. Mais la chloroquine ne se limite pas à ces seuls effets sur l'adénylate cyclase: elle supprime aussi les variations d'activité de cette enzyme induite par la thrombine ou le collagène: en présence de chloroquine ce dernier n'est plus inhibiteur et la thrombine perd de même son effet sur l'activité adénylate cyclasique de cellules lysées. Ces résultats font évoquer une interaction complexe de la chloroquine avec le système adénylate cyclasique, et sont en accord avec le fait que la chloroquine est un inhibiteur de la réaction d'excrétion induite par la thrombine ou le collagène. La chloroquine, enfin, supprime l'augmentation secondaire de la formation de ^3H - AMP_c à partir de ^3H -adénosine; cela laisse supposer qu'elle inhibe la synthèse de l'activateur de l'adénylate cyclase induite par la thrombine¹².

Summary. Chloroquine has no effect on phosphodiesterase activity, but it inhibits the adenyl cyclase activity, of lysed platelets and intact platelets, only when adenine is used as a precursor. Furthermore, it inhibits the effects of thrombin and collagen on adenyl cyclase activity.

M. DECHAVANNE¹³ et M. LAGARDE¹⁴

Laboratoire de Médecine Nucléaire,
appliquée à l'Hématologie, Pavillon Ebis, (Pr Viala)
Place d'Arsonval, F-69003 Lyon (France); et
Laboratoire d'Hémostase, Institut Pasteur, (J.P. Thouverez)
Lyon (France), 4 juin 1973.

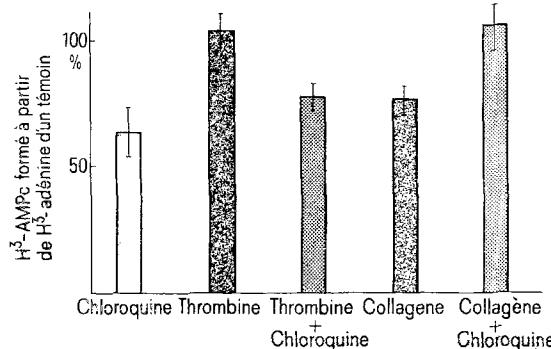


Fig. 3. Activité adénylate cyclasique mesurée dans des suspensions de plaquettes intactes préalablement incubées avec ^3H -adénine. 5 mesures ont été faites. On a représenté la moyenne, et par la barre verticale, l'écart type de la moyenne. Le groupe chloroquine et le groupe collagène sont significativement différents en % des témoins ($p < 0,05$). Le groupe thrombine + chloroquine est aussi différent du groupe thrombine ($p < 0,05$); de même le groupe collagène + chloroquine est différent du groupe collagène ($p < 0,05$).

¹⁰ M. LAGARDE et M. DECHAVANNE, à paraître.

¹¹ M. J. DROLLER et S. M. WOLFE, J. clin. Invest. 57, 3094 (1972).

¹² Travail subventionné par l'Unité de Biologie Humaine (Université Claude Bernard Lyon).

¹³ Laboratoire de Médecine Nucléaire appliquée à l'Hématologie Pavillon Ebis, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France.

¹⁴ Laboratoire d'Hémostase, Institut Pasteur, Lyon, France

Effects of Humidity on Ripening of Plantain Bananas

Plantains or cooking bananas (*Musa* spp.) are a major staple food in many tropical countries and are gaining importance as an export crop to temperate countries.

Ripening of plantains was found to be delayed significantly but not impeded when they were stored in polyethylene bags, moist sawdust or moist coir dust, compared with fruits stored without packing¹. Since these materials all provide high humidity around the fruit, this might be a factor involved in ripening. Very little definite information appears available on humidity effects on fruit ripening. Storage at high humidity has been found to delay ripening of pears² and bananas³ when compared with storage at low humidity, although the converse

effect has also been reported for bananas⁴ and grapes⁵ and no differential effect for pears⁴, apples or strawberries². This paper describes investigations on the effects of humidity on ripening of plantains.

Materials and methods. Horse plantain fruits of full $\frac{3}{4}$ to full maturity⁵ were harvested the day prior to the

¹ A. K. THOMPSON, B. O. BEEN and CYNTHIA PERKINS, Proc. Trop. Reg. Am. Soc. hort. Sci. 76, in press (1973).

² A. GRAC, Revue gén. Froid 33, 4 (1956).

³ M. D. LITTMAN, Qd. J. agric. Sci. 29, 103 (1972).

⁴ A. TSALFATOVROS, Fruits d'outre mer 11, 120 (1956).

⁵ N. W. SIMMONDS, *Bananas* (Longmans, London 1959).