

Chloroquine et sérotonine plaquettaire. Mise en évidence d'une inhibition compétitive de la captation de sérotonine

La chloroquine est une substance douée de nombreuses propriétés: outre son effet anti-inflammatoire, elle inhibe les fonctions^{1,2} des plaquettes sanguines et modifie les granules des leucocytes³⁻⁵. Nous avons donc recherché si la chloroquine altère aussi les granules plaquettaires qui interviennent dans les fonctions d'agrégation et d'excrétion; de plus, la sérotonine étant le principal constituant de ces granules, nous avons étudié les relations chloroquine-sérotonine.

Matériel et méthodes. Les suspensions de plaquettes humaines lavées sont préparées suivant la méthode décrite⁶. Les plaquettes à la concentration de $10^9/\text{ml}$ sont incubées à 37°C pendant 20 min en présence ou en absence de chloroquine. La sérotonine, l'ADP, l'ATP et les β -glucuronidases, sont dosés dans les surnageants de suspensions plaquettaires obtenus par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4°C après incubation.

La libération de sérotonine est appréciée par comptage de la ^{14}C -sérotonine de ces surnageants lorsque les plaquettes ont été marquées par celle-ci au cours des lavages.

Après conversion de l'ADP en ATP (système phospho-énol pyruvate-pyruvate kinase) l'ATP du surnageant est dosé selon la méthode décrite⁷; de même pour les β -glucuronidases⁸.

La captation de ^{14}C -sérotonine, connue active⁹, est jugée grâce à la radioactivité restant dans les surnageants de suspensions plaquettaires obtenus par centrifugation de 1 mn à 9500 g, après différentes durées d'incubation des plaquettes avec l'amine marquée. Le type d'inhibition est déterminé par le diagramme de LINEWEAVER et BURK établi avec des captations de 1 min.

L'étude ultrastructurale quantitative a été réalisée par une méthode stereologique de compte de points¹⁰; les volumes exprimés en pourcentage du volume total plaquettaire sont corrigés pour tenir compte de l'augmentation du volume plaquettaire sous l'action de la chloroquine.

Résultats et discussion. La chloroquine ne provoque la libération que de la ^{14}C -sérotonine plaquettaire; celle-ci n'est pas modifiée par une préincubation des plaquettes avec la prostaglandine E_1 $3,4 \times 10^{-7} \text{ M}$, puissant inhibiteur de l'excrétion plaquettaire (Tableau I). Ceci permet de penser que la libération de sérotonine observée n'est pas due à une excrétion granulaire.

¹ F. JOBIN et F. TREMBLAY, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 22, 466 (1969).

² A. E. CARTER, R. EBAN et R. D. PERRET, *Br. med. J.* 1, 312 (1971).

³ M. FEDORKO, *J. clin. Invest.* 46, 1932 (1967).

⁴ M. FEDORKO, J. G. HIRSCH et Z. A. COHN, *J. Cell. Biol.* 38, 377 (1968).

⁵ M. FEDORKO, J. G. HIRSCH et Z. A. COHN, *J. Cell. Biol.* 38, 392 (1968).

⁶ J. F. MUSTARD, D. W. PERRY, N. G. ARDLIE et M. A. PACKHAM, *Br. J. Haemat.* 22, 193 (1972).

⁷ C. S. P. JENKINS, M. A. PACKHAM, R. L. KINLOUGH-RATHBONE et J. F. MUSTARD, *Blood* 37, 395 (1971).

⁸ H. U. BERGMAYER, E. BERNT et B. HESS, *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, New York 1963), p. 117.

⁹ G. V. R. BORN et R. E. GILLSON, *J. Physiol., Lond.* 146, 472 (1959).

¹⁰ P. A. BRYON, M. DECHAVANNE, J. P. THOUVEREZ et L. REVOL, *C.r. Soc. Biol., Paris* 166, 893 (1972).

Tableau I. Action de la chloroquine sur la libération de constituants granulaires

| Substance ajoutée | Concentration finale | ^{14}C -sérotonine % | ATP (%) | β -Glucuronidases (%) |
|---------------------------------|---|---|---|---|
| Chloroquine | $\left\{ \begin{array}{l} 9,1 \times 10^{-4} \text{ M} \\ 9,1 \times 10^{-5} \text{ M} \\ 9,1 \times 10^{-6} \text{ M} \end{array} \right.$ | $22,2 \pm 0,43^*$ $7,0 \pm 0,63^*$ $0,6 \pm 0,04$ | $1,2 \pm 0,1$ $1,3 \pm 0,3$ $2,1 \pm 0,2$ | $2,2 \pm 0,2$ $2,1 \pm 0,1$ $2,3 \pm 0,2$ |
| Chloroquine + PGE_1 | $\left\{ \begin{array}{l} 8,3 \times 10^{-4} \text{ M} \\ 3,4 \times 10^{-7} \text{ M} \end{array} \right.$ | $22,7 \pm 0,61^*$ | | |
| Chloroquine + sérotonine froide | $\left\{ \begin{array}{l} 8,3 \times 10^{-4} \text{ M} \\ 2 \times 10^{-3} \text{ M} \end{array} \right.$ | $4,8 \pm 0,34$ | | |
| Contrôle (tyrode) | | $0,7 \pm 0,02$ | $2,1 \pm 0,2$ | $1,8 \pm 0,1$ |

Les résultats, moyenne de 5 déterminations \pm un écart-type de la moyenne, sont exprimés en pourcentage d'un lysat plaquettaire. * Significativement différent du groupe contrôle ($p < 0,001$).

Tableau II. Morphométrie plaquettaire ultrastructurale

| | Nombre moyen de granules par profil plaquettaire | Volume des granules | Volume des vacuoles (SCS) |
|--|--|---------------------|---------------------------|
| Plaquettes lavées témoin | $13,5 \pm 1,1$ | $0,165 \pm 0,011$ | $0,098 \pm 0,009$ |
| Plaquettes + chloroquine (10^{-5} M) | $13,1 \pm 0,9$ | $0,160 \pm 0,008$ | $0,176 \pm 0,008^*$ |

* Différent significativement du groupe témoin $p < 0,001$ (mesures sur 50 profils provenant de 3 suspensions plaquettaires différentes).

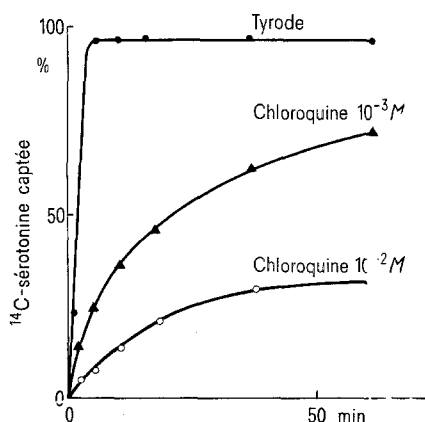


Fig. 1. Effet de la chloroquine sur la captation de ^{14}C -sérotonine. Chaque point représente la moyenne de 2 expériences.

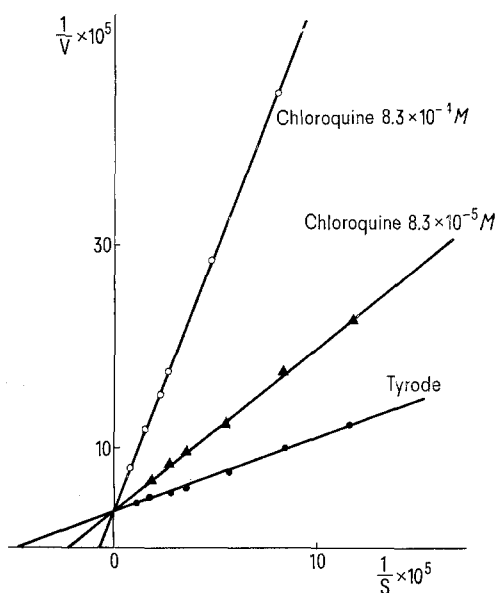


Fig. 2. Représentation selon LINEWEAVER et BURK de la captation de ^{14}C -sérotonine. Chaque point représente la moyenne de 2 expériences.

La chloroquine ne modifie ni le nombre des granules plaquettaires ni leur volume (Tableau II). Ce résultat prouve aussi que la ^{14}C -sérotonine libérée est d'origine cytoplasmique et non granulaire. Ainsi, la chloroquine a une action différente sur les granules plaquettaires et leucocytaires puisqu'elle provoque une vacuolisation de ces derniers avec formation de figures myéliniques³⁻⁵. Par contre, dans les plaquettes, elle modifie la membrane plasmique en dilatant le système des vacuoles communiquant avec la surface (SCS) qui correspond à une invagination de la membrane plaquettaire.

Les mesures de captation de sérotonine mettent en évidence une inhibition de ce phénomène (Figure 1) suggérant aussi une altération de la membrane; le diagramme de LINEWEAVER et BURK montre en effet que l'inhibition est compétitive (Figure 2).

Ainsi l'ensemble de ces résultats démontrent que la libération de sérotonine observée est bien d'origine cytoplasmique et qu'elle est la conséquence d'une perméabilité passive puisque la captation active est inhibée. Ceci est corroboré par le fait qu'en présence de sérotonine froide extraplaquettaire ($2 \times 10^{-8} \text{ M}$) la libération de ^{14}C -sérotonine sous l'action de la chloroquine est très diminuée (Tableau I).

L'inhibition de la captation est de type compétitif et pourrait résulter d'une interaction de la chloroquine avec les D-récepteurs de la sérotonine¹¹.

Summary. On electron microscopy, platelets exposed to chloroquine exhibit no abnormality, except for surface connecting system. However, when platelets were labelled with ^{14}C serotonin, there was liberation of a large amount of radioactivity which is inhibited when the extracellular concentration of serotonin is increased. It appears that chloroquine is a competitive inhibitor of serotonin uptake by platelets.

M. LAGARDE¹², M. DECHAVANNE¹³
et P. A. BRYON^{14, 15}

Laboratoire d'Hémostase, Institut Pasteur, Lyon (France), Laboratoire de Médecine Nucléaire appliquée à l'Hématologie, Hôpital Edouard Herriot, Pavillon E bis, Place d'Arsonval, F-69374 Lyon Cédex 02 (France), et Laboratoire d'Histohématologie et Microscopie électronique, Lyon (France), 20 septembre 1974.

¹¹ F. MICHAL, *Nature*, Lond. 227, 1253 (1969).

¹² Laboratoire d'Hémostase, Institut Pasteur, Lyon, France.

¹³ Laboratoire de Médecine Nucléaire appliquée à l'Hématologie, Hôpital Edouard Herriot Pavillon Ebis F-69374 Lyon Cédex 02 et laboratoire central d'Hématologie et cytogénétique, Lyon, France.

¹⁴ Laboratoire d'Histohématologie et Microscopie électronique, Lyon, France.

¹⁵ Travail subventionné par l'Unité de Biologie Humaine (Prof. CZYBA). La correspondance est à adresser au laboratoire de Médecine Nucléaire appliquée à l'Hématologie, Hôpital E. Herriot 69374 Lyon, France.

Cell-Mediated Immunity Associated with Long Term Transplantation Resistance to a Syngeneic Tumour of Spontaneous Origin. Detection by Two in vitro Tests

Transplantation resistance to syngeneic tumour cells has been shown to be accompanied by cell-mediated immunity detectable by in vitro tests¹⁻⁴. It has been shown previously that a transplanted immunoglobulin-secreting sarcoma of spontaneous origin (ISIS₁₃₀) regressed in syngeneic rats after a single dose of cyclo-

¹ W. J. HALLIDAY and M. WEBB, *J. natn. Cancer Inst.* 43, 141 (1969).

² M. F. POUPON and G. LESPINATS, *J. natn. Cancer Inst.* 48, 1297 (1972).

³ J. ANKERST and H. O. SJÖGREN, *Int. J. Cancer* 4, 279 (1969).

⁴ P. W. WRIGHT, M. ORTIZ DE LANDAZURI and R. B. HERBERMAN, *J. natn. Cancer Inst.* 50, 947 (1973).