

# Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

## Diplôme 2008

*Alessandra Calero Rochet*

*Caractérisation de l'inhibition  
de la phospholipase A2  
par des phytoextraits bruts*

Professeur            Alain—François Grogg

Expert                 Andrew Marston

SI	TV	EE	IG	EST
X	X			

Confidentiel / Vertraulich

oui / ja  non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2007/2008</b>	No PS / Nr. PS <b>ca/2008/66</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte <b>Université de Genève</b>	Etudiant / Student <b>Alessandra Calero Rochet</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent <b>Alain—François Grogg</b>	Expert / Experte (données complètes) <b>Andrew Marston</b> Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie Ecole de Pharmacie Lausanne Genève Université de Genève	

Titre / Titel

**Caractérisation de l'inhibition de la phospholipase A2 par des phytoextraits bruts**

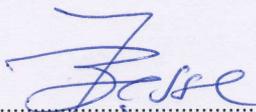
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Les mécanismes de l'inflammation cutanée sont partiellement connus. Par conséquent, la caractérisation d'une activité anti-inflammatoire se fait généralement in vivo de manière globale. Il existe toutefois dans le commerce des tests enzymatiques spécifiques permettant d'évaluer in vitro l'inhibition des chemins biosynthétiques responsables de l'inflammation, par exemple celui conduisant à l'acide arachidonique. Ces tests montrent cependant leur limite d'application lorsque la matrice contenant l'actif est complexe; ce qui est généralement le cas des phytoextraits bruts.

Dans cette étude, il est demandé de mettre en place une procédure analytique standard permettant la caractérisation de l'activité de phytoextraits bruts par le dosage de l'inhibition induite sur la phospholipase A2. Cette procédure se base sur la séparation partielle des constituants par chromatographie sur couche mince et détection colorimétrique in situ par application de l'enzyme, du substrat et du révélateur.

Objectifs:

- mise en place du dosage de l'activité inhibitrice de la phospholipase A2 d'un phytoextrait brut à sélectionner par spray sur couche mince sans élution préalable;
- optimisation du révélateur; si possible, utilisation d'une révélation par fluorescence;
- évaluation de la réponse obtenue par rapport à celle du dosage colorimétrique en microcuvette du commerce;
- évaluation de l'effet de l'élution sur la réponse;
- screening d'une dizaine de phytoextraits bruts et d'un mélange d'au moins deux substances pures; pour ce dernier mélange, comparaison avec le dosage colorimétrique en microcuvette du commerce;
- proposition d'une procédure standard et évaluation de sa robustesse.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum  Resp. de filière Studiengangsleiter: .....  Etudiant/Student: ..... 	Délais / Termine  Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 01.09.2008  Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 21.11.2008 — 12.00  Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 28.11.2008  Défense orale / Mündliche Verfechtung: semaine/Woche 49
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am ..... Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats .....

Calero Rochet Alessandra

2008

## Caractérisation de l'inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub> par des phytoextraits bruts

### Charakterisierung der Inhibition des Phospholipase A<sub>2</sub> durch rohe Phytoextrakt

#### Objectif

La phospholipase A<sub>2</sub> est responsable de l'activation du mécanisme inflammatoire en hydrolysant l'acide arachidonique. Les propriétés anti-inflammatoires des plantes sont vérifiées en utilisant des tests colorimétriques en microcuvettes mais cela ne révèle pas le composé responsable de l'activité inhibitrice.

Le but de cette étude est de mettre en place une procédure analytique qui permette la caractérisation de l'activité de phytoextraits bruts par le dosage de l'inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub>, en séparant préalablement les constituants par chromatographie sur couche mince.

#### Résultats

La procédure proposée utilise la phosphatidylcholine comme substrat de la phospholipase A<sub>2</sub>, et la fuchsine comme révélateur des produits de l'hydrolyse. L'essai se déroule de façon optimale à 37 °C et pH 7.4, en utilisant un temps d'incubation de 30 minutes, 20 µg de substrat et 0.1 Unités.

La limite de détection pour le substrat est de 5 µg.

#### Mots-clés

PLA<sub>2</sub>, PC, fuchsine, CCM.

#### Ziel

Das Phospholipase A<sub>2</sub> ist verantwortlich für die Aktivierung der entzündlichen Mechanismen, indem es die arachidonische Säure hydrolysiert. Die nicht entzündlichen Teile der Pflanzen werden geprüft, indem man kolorimetrische Tests in micro Schalen durchführt, aber dies zeigt nicht an welche Verbindung für die Unterdrückung der Aktivität verantwortlich ist. Das Ziel dieser Studie besteht darin, ein analytisches Verfahren zu erschaffen, das die Aktivitäts - Charakterisierung des rohen Phytoextrakts durch die Dosierung der Inhibition des phospholipase A<sub>2</sub> erlaubt, indem es zuerst die Bestandteile durch Dünnschichtchromatographie trennt.

#### Resultate

Das vorgeschlagene Verfahren benützt das Phosphatidylcholine als Substrat des phospholipase A<sub>2</sub> und das Fuchsin als Kennzeichen der Produkte der Hydrolyse. Der Versuch findet optimal auf 37 °C und 7.4 pH statt, benötigt eine Inkubationszeit von 30 Minuten, benützt 20 µg Substrat und 0.1 Einheiten. Die Feststellungsgrenze für das Substrat beträgt 5 µg.

#### Schlüsselwörter

PLA<sub>2</sub>, PC, Fuchsin, CCM.

**Table des matières**

Table des matières .....	i
1. Introduction .....	1
2. Partie théorique.....	2
Inflammation.....	2
2.1.1. Mécanisme.....	3
Phospholipase A <sub>2</sub> .....	4
2.1.2. Classification.....	5
2.1.3. PLA <sub>2</sub> et libération de l'AA .....	6
Inhibition de la phospholipase A <sub>2</sub> .....	6
3. Résultat et discussion .....	8
L'essai.....	8
Limite de détection .....	10
L'inhibition .....	10
3.1.1. Essai direct sur CCM.....	10
3.1.2. Essai en solution .....	11
Méthode d'analyse .....	12
4. Conclusion et perspectives .....	13
5. Partie expérimentale .....	14
Solution tampon Tris - HCl .....	14
Solutions PLA <sub>2</sub> et PC .....	14
Essai direct sur couche mince.....	14
Solution tampon Tris - HCl pH 7.4 avec deoxycholate de sodium .....	15
Réaction en solution.....	15
Extraits de plantes.....	16
Synthèse de l'acide 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoïque.....	17
6. Bibliographie .....	18
7. Remerciements.....	20
8. Annexes .....	21

## 1. Introduction

---

Les enzymes lipolytiques sont traditionnellement analysées par des méthodes radiométriques et titrimétriques.

Les méthodes radiométriques sont tout à fait sensibles mais exigent des substrats radioactifs chers, une séparation laborieuse du substrat et des produits marqués. De plus, l'utilisation sûre des matériaux radioactifs est une préoccupation croissante.

Les analyses titrimétriques sont continues, les manipulations sont faciles et utilisent des substrats naturels, mais ont une basse sensibilité et sont sujets à des conditions qui peuvent changer la quantité d'ions d'hydrogène libérés.

Des tests colorimétriques en microcuvettes trouvés dans le commerce [24] permettent un screening rapide pour déterminer l'activité des substances anti-inflammatoires qui inhibent la sPLA<sub>2</sub> et d'autres enzymes responsables du mécanisme inflammatoire, les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases (LOX).

Les propriétés anti-inflammatoires des plantes utilisées en médecine populaire sont vérifiées en utilisant cette technique enzymatique spécifique d'évaluation in vitro. Toutefois l'analyse des extraits bruts ne révèle pas le composé responsable de l'action et la coloration de ces extraits empêche la quantification colorimétrique de cette inhibition.

L'objectif de cette étude est de mettre en place une procédure analytique qui permet la caractérisation de l'activité de phytoextraits bruts par le dosage de l'inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub>, en séparant préalablement les constituants par chromatographie sur couche mince.

L'utilisation d'un révélateur, pour la détection colorimétrique, d'un substrat chromogène ou fluorescent est envisagée.

## 2. Partie théorique

### Inflammation

L'inflammation, ou réaction inflammatoire, est la réponse des tissus vivants et vascularisés à une agression.

Ce processus comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement le plus souvent par de la fièvre. Il y a quatre points cardinaux à l'inflammation, qui sont les signes cliniques suivants: rougeur, gonflement, chaleur et douleur [4].

Les tissus démunis de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire, mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation, puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation [3].

C'est un processus habituellement bénéfique ayant comme but l'élimination de l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. L'inflammation peut être néfaste à cause de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation.

Les causes suivantes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation : des corps étrangers (exogènes ou endogènes) ; réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe; anomalie de la réponse immunitaire, allergies et auto-immunité.

De multiples médiateurs chimiques (médiateurs aminés, lipidiques, peptidiques et polypeptidiques) provenant du plasma ou des cellules, déclenchent l'inflammation et interviennent à tous les stades de l'inflammation [4].

La plupart des ces intermédiaires exercent leur action en se fixant à des récepteurs membranaires sur des cellules cibles, provoquant des réactions en cascade : un médiateur peut provoquer la libération d'autres médiateurs par les cellules cibles et qui agissent de façon synergique ou antagoniste.

L'activation des divers médiateurs peut se répéter au cours du processus inflammatoire, entraînant des mécanismes d'amplification ou de résistance à l'action médiatrice initiale. La régulation du déroulement de la réaction inflammatoire implique que les médiateurs soient rapidement inactivés par un ou plusieurs inhibiteurs, ou bien détruits [3].

### 2.1.1. Mécanisme

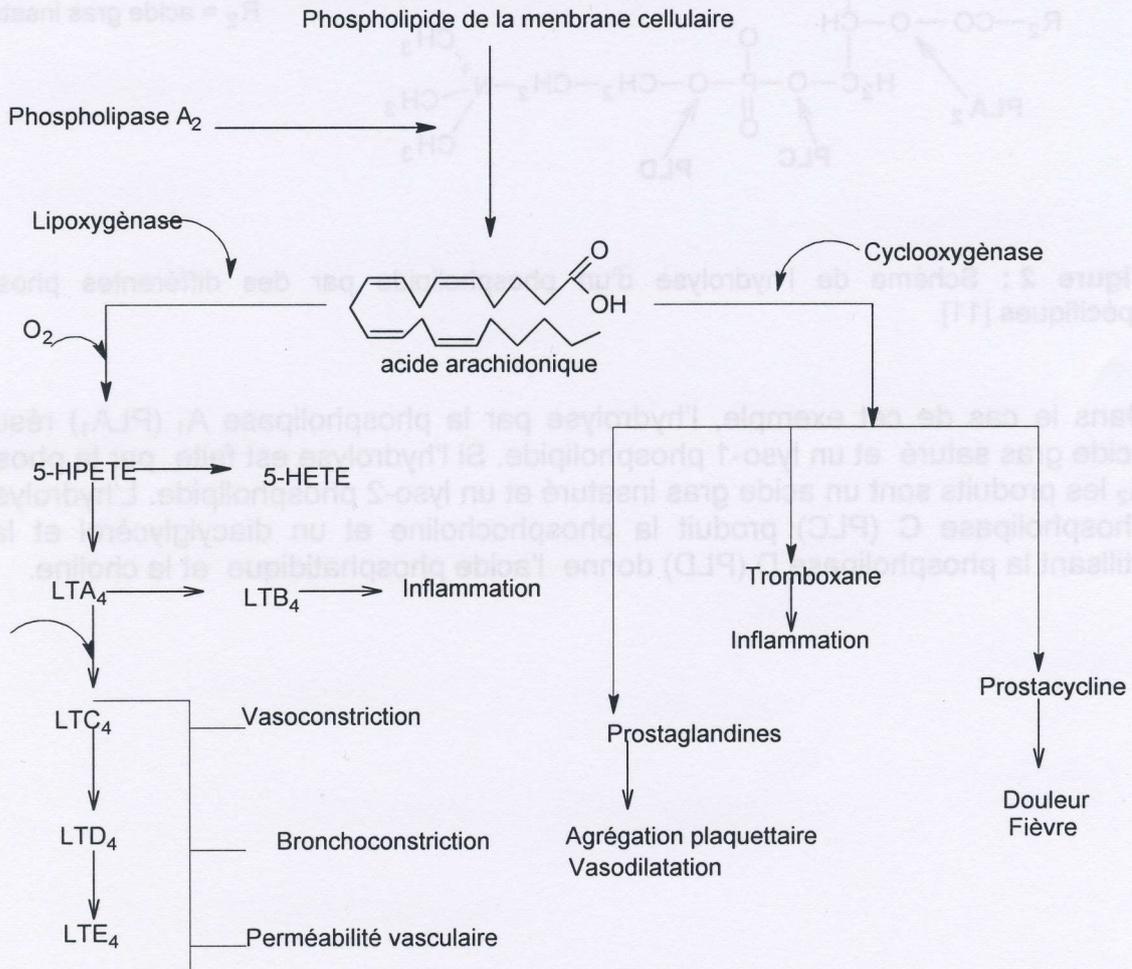
L'acide arachidonique (AA) est un acide gras formé par l'hydrolyse des phospholipides des membranes cellulaires sur la position sn-2, sous l'influence de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activée par l'agression initiale (stimulus mécanique ou chimique).

C'est un acide gras polyinsaturé ayant sa dernière liaison éthylénique au sixième carbone avant la fin de la chaîne. Ainsi, l'acide arachidonique, dont la chaîne est de 20 carbones, a la dernière de ses 4 doubles liaisons entre les carbones n°14 (20 - 6 = 14) et n°15 [11].

L'AA est métabolisé selon différentes voies : la voie des cyclooxygénases (COX), pour former des prostaglandines (PGs) et des thromboxanes, ou la voie des lipoxygénases pour former les leucotriènes.

Les lysophospholipides (LysoPL), générés également lors de l'hydrolyse des phospholipides, sont à l'origine de la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF), puissant agrégeant des plaquettes qui est aussi un fort médiateur du processus inflammatoire [10].

Les métabolites de l'AA sont montrés en **Figure 1** ainsi que le lieu d'action des corticoïdes et de l'aspirine dans le mécanisme de l'inflammation.



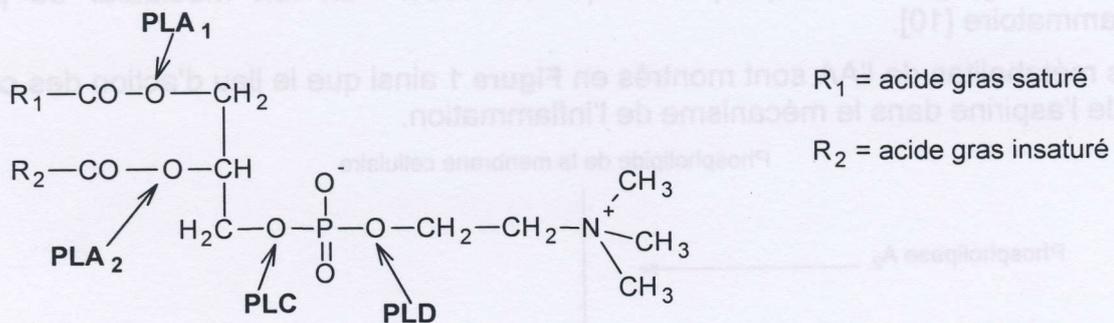
**Figure 1** : métabolites de l'acide arachidonique en mécanisme de l'inflammation [4].

## Phospholipase A<sub>2</sub>

Originellement, les PLA<sub>2</sub> ont été identifiées comme des enzymes particulièrement abondantes dans les venins de serpents, ayant un rôle toxique, et le suc pancréatique où elles jouent un rôle digestif incontestable.

Néanmoins, l'intérêt biologique de ces enzymes repose aussi sur leur implication directe dans la régulation de la biosynthèse de médiateurs lipidiques, tels que les multiples dérivés de l'acide arachidonique et le facteur activant les plaquettes (PAF) [12] qui ont auparavant été mentionnés [2.1.1].

La **Figure 2** montre les positions où les différentes phospholipases hydrolysent un phospholipide (PL).



**Figure 2 :** Schéma de l'hydrolyse d'un phospholipide par des différentes phospholipases spécifiques [11].

Dans le cas de cet exemple, l'hydrolyse par la phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) résulte en un acide gras saturé et un lyso-1 phospholipide. Si l'hydrolyse est faite par la phospholipase A<sub>2</sub> les produits sont un acide gras insaturé et un lyso-2 phospholipide. L'hydrolyse par une phospholipase C (PLC) produit la phosphocholine et un diacylglycérol et la réaction utilisant la phospholipase D (PLD) donne l'acide phosphatidique et la choline.

## 2.1.2. Classification

Une des classifications communes consiste à classer les PLA<sub>2</sub> (mammifères ou non) en 12 groupes (I à XII), puis en sous-groupes (A, B, C, D, E et F) selon leurs structures, leurs caractéristiques enzymatiques et leurs distributions tissulaires [6].

D'un point de vue fonctionnel, la famille des PLA<sub>2</sub> est composée de deux types principaux d'enzymes : les sécrétoires et les intracellulaires.

Les PLA<sub>2</sub> **sécrétées** sont des enzymes qui ont une masse moléculaire basse, environ 14 kDa. Le site actif de ces enzymes contient une histidine nécessitant des concentrations de Ca<sup>2+</sup> de l'ordre du millimolaire pour être actives. Les sPLA<sub>2</sub> possèdent 120 résidus d'acides aminés, hautement stabilisées par les liaisons disulfures.

Un résumé des groupes de sPLA<sub>2</sub> existantes est montré dans le **Tableau 1**.

Ce groupe inclut plusieurs types de sPLA<sub>2</sub> comme celles sécrétées en venins et par le pancréas [8]. Les sPLA<sub>2</sub> sont sécrétées et agissent sur les membranes cellulaires externes, libérant ainsi des acides gras, parmi lesquels l'AA qui est ensuite repris par les cellules environnantes pour être métabolisé en eicosanoïdes.

A part celles du groupe I, les sPLA<sub>2</sub> sont majoritairement impliquées dans les processus inflammatoires, car les sPLA<sub>2</sub> des groupes IIA, IIC et V humaines libèrent de l'AA en réponse à un stimulus inflammatoire, tandis que celles du groupe X en libèrent de façon spontanée [13].

**Tableau 1** : les groupes de PLA<sub>2</sub> qui utilisent une histidine catalytique [6].

Groupe		Source	Taille [kDa]	Disulfure
I	A	Venin de cobra	13-15	7
	B	Pancréas mammifère	13-15	7
II	A	Fluide synovial humain, plaquettes, venin de vipère	13-15	7
	B	Vipère du Gabon	13-15	6
	C	Testicules de rat/ souris	15	8
	D	Pancréas et rate humains et des souris	14-15	7
	E	Cerveau, cœur, utérus humain/souris	14-15	7
	F	Testicules	16-17	7
III		Peau/ testicules humain/rat	15-18	5
X		Cœur, poumon et macrophage humains	14	8
IX		Venin escargot (Conodipine-M)	14	6
XI	A	pousses vertes de riz (PLA2-I)	12.4	6
	B	pousses vertes de riz (PLA2-II)	12.9	6
XII		Cœur, reins, peau et muscles humains	18.7	7
XIII		Parvovirus	<10	0
XIV		Streptomyces	13-19	2

Le deuxième type est composé par les PLA<sub>2</sub> **cytosolique** (cPLA<sub>2</sub>, groupe IV) et la phospholipase A<sub>2</sub> indépendante de calcium (iPLA<sub>2</sub>, groupe VI).

cPLA<sub>2</sub> a une masse moléculaire de 85 kDa et elle se trouve dans la plupart de tissus cellulaires et est régulée par une concentration micromolaire de Ca<sup>2+</sup> [8].

Leur site nucléophile actif contient une sérine. Les cPLA<sub>2</sub> catalysent spécifiquement des phospholipides membranaires contenant de l'acide arachidonique (AA) en position sn-2, elles constituent la principale source d'AA compartimentée au niveau du cytosol [13] jouant un rôle important dans la production des eicosanoïdes [8].

L'autre groupe d'enzyme intracellulaire est la iPLA<sub>2</sub> qui n'exhibe pas une spécificité par des acides gras et est considérée comme une enzyme de maintenance impliquée dans l'entretien de la composition de phospholipides membranaire [8].

### 2.1.3. PLA<sub>2</sub> et libération de l'AA

Les deux types de PLA<sub>2</sub>, sécrété et cytosolique, peuvent être activées pour générer l'AA.

La libération de l'AA a lieu en deux phases: une première phase immédiate est due principalement à l'action des cPLA<sub>2</sub> mais aussi des sPLA<sub>2</sub> contenues dans les granules sécrétés de certaines cellules comme les plaquettes, les granulocytes neutrophiles, les macrophages et les mastocytes. Une seconde phase implique les sPLA<sub>2</sub>s des groupes IIA et IID qui agissent de préférence sur des phospholipides anioniques tels que le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine plutôt que sur la phosphatidylcholine qui est neutre. En revanche, les sPLA<sub>2</sub> des groupes V et X hydrolysent de manière efficace les deux types de phospholipides anioniques et neutres.

Un autre mécanisme repose sur le couplage fonctionnel entre la cPLA<sub>2</sub> et la sPLA<sub>2</sub>. En effet, la cPLA<sub>2</sub> activée augmente la concentration cellulaire en AA, qui induit alors l'activation de la sPLA<sub>2</sub> au niveau de la membrane plasmique [13].

### Inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub>

Les sPLA<sub>2</sub> sont les contributeurs majeurs d'une production excessive de AA en des conditions pathologiques. En plus, il a une synergie avec d'autres médiateurs de l'inflammation occasionnant l'endommagement des tissus et agi comme ligand récepteur induisant l'activation et prolifération des cellules normales et cancéreuses.

Ces enzymes sont les cibles préférées pour l'inhibition au contrôle de l'inflammation [8].

Des nombreux agents rapportés pour inhiber la PLA<sub>2</sub> représentent une diversité de types structuraux. Ils peuvent être classés comme des agents qui affectent l'interface enzyme substrat, ceux qui modulent les niveaux de calcium, les anti-inflammatoires non stéroïdien, des produits naturels [15].

Les **corticoïdes** ou glucocorticoïdes, ou corticostéroïdes ont un effet anti-inflammatoire, immunosuppresseur et anti-allergique.

Action sur les médiateurs de l'inflammation : les stéroïdes augmentent la synthèse de la lipocortine 1 qui possède des propriétés anti-inflammatoires via un effet inhibiteur sur la phospholipase A<sub>2</sub>, et donc une inhibition de la production des médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines, facteur d'activation des plaquettes ou PAF). Les stéroïdes inhibent la forme cytosolique de la PLA<sub>2</sub> induite par les cytokines. Enfin les glucocorticoïdes induisent la synthèse de deux enzymes qui conduisent à la dégradation de la bradykinine, composant chimique responsable de la douleur inflammatoire [17].

Le **p-bromophenacylbromure** (BPB) est un inhibiteur irréversible qui modifie spécifiquement le site actif du résidu de l'histidine résultant en une complète perte de l'activité enzymatique pour la plupart de sPLA<sub>2</sub> extracellulaire. La concentration pour inhiber la PLA<sub>2</sub> à 50% est de 500 µM, qui est la limite de solubilité de ce composé en des systèmes aqueux [14].

Le **manoalide** est un produit naturel marin (lactonique sesquiterpénique) qui a montré être un puissant inhibiteur de sPLA<sub>2</sub> de venin d'abeille (IC<sub>50</sub> = 0.05 µM) et de phospholipase A<sub>2</sub> de venin de cobra (IC<sub>50</sub> = 2µM).

Le produit synthétique analogue du manoalide est appelé monologue. L'inhibition de la PLA<sub>2</sub> par ces composés est associée avec la modification des résidus de lysine.

L'inhibition avec une enzyme intracellulaire, la P388D<sub>1</sub> demande une IC<sub>50</sub> de 16µM et une complète inhibition de la PLA<sub>2</sub> a été observé à une concentration de 200-300µM de monoalide [14].

Le 7,7 diméthyl-5,8-eicosadiénoïque (**DEDA**) est un inhibiteur non sélectif de la PLA<sub>2</sub>, bloquant les activités de cPLA<sub>2</sub> et sPLA<sub>2</sub>.

Le **Thioetheramide-PC** (1-palmitylthio-2-palmitoyl amido-1,2-dideoxy-sn-glycero-3-phosphorylcholine) est un phospholipide structurellement modifié qui fonctionne comme inhibiteur concurrentiel et réversible de la sPLA<sub>2</sub> et dont la valeur IC<sub>50</sub> est de 2 µM [1].

L'**olexyethyl phosphorylcholine** est un inhibiteur de PLA<sub>2</sub> avec une valeur IC<sub>50</sub> de 6.2 µM pour PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc [1].

Les **flavonoïdes** sont largement utilisés comme des anti-inflammatoires. En règle générale, ces c

omposés sont, in vitro, des inhibiteurs enzymatiques, pour la cyclooxygénase et la lipoxygénase. L'activité inhibitrice est liée directement à leur capacité de piéger des radicaux libres [18].

Des études ont déjà été effectuées en utilisant des flavonoïdes pour inhiber la sPLA<sub>2</sub> et montrent que ces substances s'insèrent par force hydrophobique à l'intérieur de la molécule de la PLA<sub>2</sub> obstruant le site catalytique [19]. Néanmoins ces résultats sont peu concluants et on ne connaît pas encore l'action des flavanoïdes sur la PLA<sub>2</sub>.

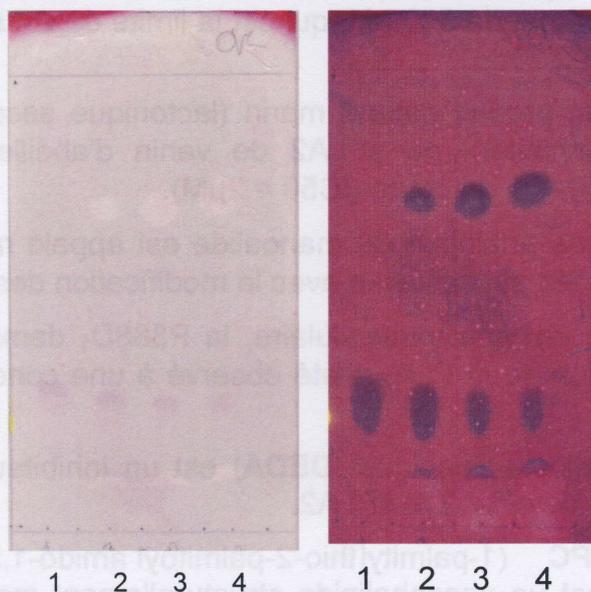
### 3. Résultat et discussion

#### L'essai

L'enzyme utilisée lors de ce travail est la sPLA<sub>2</sub> du pancréas de porc (Fluka analytical, E.C 3.1.1.4, ~200U/mg), le substrat est la L- $\alpha$  phosphatidylcholine (Sigma Aldrich, Type XI-E).

Les produits de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine sont révélés par la fuchsine [25]. La réaction est présentée à l'**Annexe 1**

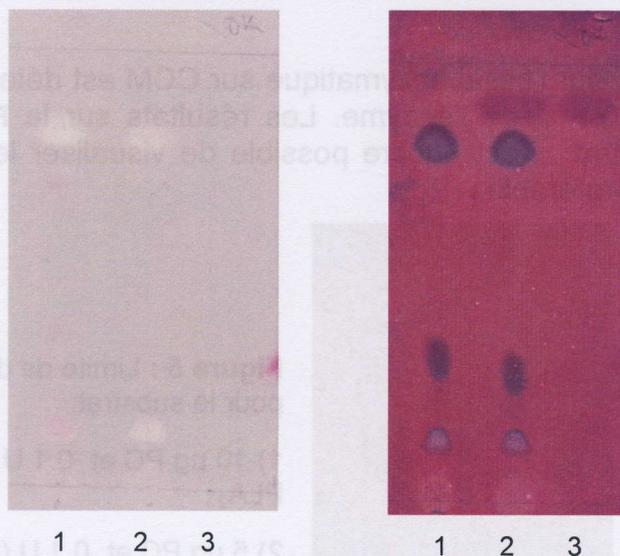
Une unité de PLA<sub>2</sub> inhibe 1  $\mu$ mol de PC par minute à 37°C et pH 8.0 [26]. L'essai est fait initialement en utilisant 100  $\mu$ g (0.14  $\mu$ mol) du substrat et des différentes quantités de l'enzyme. Les produits sont déjà visibles après 10 minutes de l'application du révélateur ; après 2 heures, la coloration devient plus intense, comme présenté à droite de la **Figure 3**.



**Figure 3 :** À gauche, les produits sont déjà visibles après 10 minutes de l'application du révélateur. A droite, la coloration devient plus intense après 2 heures. 1) 100  $\mu$ g de PC comme témoin ; Résultat de la réaction entre : 2) 100  $\mu$ g PC et 0.14 U PLA<sub>2</sub> ; 3) 100  $\mu$ g PC et 0.28 U PLA<sub>2</sub> ; 4) 100  $\mu$ g PC et 0.42 U de PLA<sub>2</sub> sur couche mince.

L'augmentation de la quantité de l'enzyme résulte en une augmentation de l'intensité des taches des produits, la lysophosphatidylcholine et l'acide gras, avec des Rf 0.11 et 0.67 respectivement.

Une meilleure détection est illustrée sur la **Figure 4**, où est utilisé 10 U (50 $\mu$ g) de phospholipase, soit environ 70 fois plus que la quantité théorique nécessaire.



**Figure 4 :** À gauche, les produits sont déjà visibles après 10 minutes de l'application du révélateur. A droite, la coloration devient plus intense après 2 heures. 1) Résultat de la réaction entre 100 µg PC et 10 U PLA<sub>2</sub> ; 2) 100 µg BPB, 100 µg PC et 10 U PLA<sub>2</sub> ; 3) 100 µg BPB, comme témoin.

Les différents paramètres, présentés sur le **Tableau 2**, sont modifiés pour vérifier leur influence sur la réaction. La quantité de PLA<sub>2</sub> est de 20 µg.

**Tableau 2 :** Paramètres qui peuvent avoir une influence sur le résultat de l'essai.

Paramètre	1	2
Quantité de l'enzyme	0.1 U (0.5 µg)	0.01 U (0.05 µg)
pH tampon	7.4 (tampon 1)	8.0 (tampon 2)
Température d'incubation	24 °C (air ambiant)	37°C (atmosphère humidifiée)

Le temps d'incubation a aussi été varié : Les différents spots sur une plaque sont laissés en incubation 5, 30, 60, 90 et 120 minutes. Avec le temps d'incubation le plus petit, les produits sont déjà visibles sur la plaque, mais la meilleure détection est obtenue à 30 minutes. Il n'y a pas de changement perceptible avec les trois autres durées d'incubation.

L'essai se déroule de façon optimale en utilisant 0.1 U de l'enzyme solubilisée dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 à 37°C. Le tampon Tris-HCl pH 8.0 pourrait être aussi utilisé.

Ordre	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
1	PC	PLA <sub>2</sub>	Inhibiteur
2	Inhibiteur	Inhibiteur	PLA <sub>2</sub>
3	PLA <sub>2</sub>	PC	PC

## Limite de détection

La limite de détection pour l'essai enzymatique sur CCM est déterminée en utilisant 10, 5 et 1 µg de PC avec 0.1 U de l'enzyme. Les résultats sur la **Figure 5** montrent qu'en utilisant 5 µg de substrat il est encore possible de visualiser les produits, mais que la quantité de 10 µg est préférable.



**Figure 5 :** Limite de détection pour le substrat.

1) 10 µg PC et 0.1 U (0.5 µg) PLA<sub>2</sub>;

2) 5 µg PC et 0.1 U (0.5 µg) PLA<sub>2</sub>;

3) 1 µg PC et 0.1 U (0.5 µg) PLA<sub>2</sub>.

En utilisant 10 µg du substrat, et des quantités de 0.1U (0.5 µg), 0.5 U (2.5 µg) et 1.0 U (5 µg) de PLA<sub>2</sub>, l'intensité des taches des produits augmente avec l'élévation de la quantité d'enzyme, mais la réponse en utilisant 0.5 µg de PLA<sub>2</sub> est déjà suffisante.

## L'inhibition

### 3.1.1. Essai direct sur CCM

Initialement, l'inhibition sur CCM sans élution préalable des phytoextraits est envisagée. Les neuf extraits testés dans ce travail sont obtenus comme décrit au paragraphe 0.

Des différents inhibiteurs ont un pouvoir d'inhibition distinct pour chaque type d'enzyme. Les inhibiteurs de référence choisis ont été déjà utilisés pour inactiver la PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc : la quinacrine [27], le p-bromophenacyl bromure (BPB) [2] et la quercétine [28].

Un bon contact entre l'enzyme et l'inhibiteur est nécessaire, afin d'empêcher l'hydrolyse du substrat. Pour cela, trois méthodes de dépôt des réactifs sur la couche mince sont essayées. C'est ce qui est décrit **Tableau 3**.

**Tableau 3 :** différentes façons de placer les réactifs sur couche mince.

Ordre	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
1	PC	PLA <sub>2</sub>	Inhibiteur
2	Inhibiteur	Inhibiteur	PLA <sub>2</sub>
3	PLA <sub>2</sub>	PC	PC

La réponse attendue serait d'avoir la tache de phosphatidylcholine sans décomposition, ou au moins une diminution des taches des produits. Cependant, aucune différence perceptible entre les résultats du spot 2 et ceux des spots 3, 4, et 5 n'a été repérée.

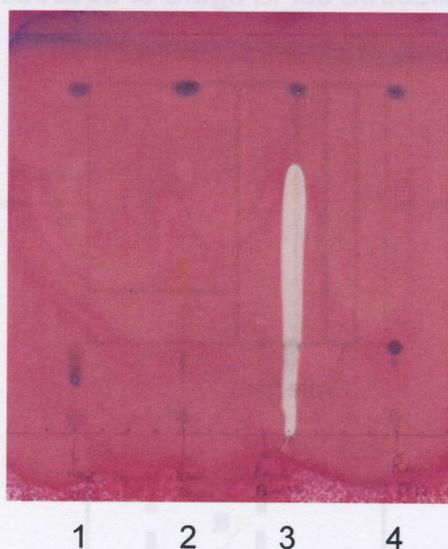
Un autre test est réalisé en laissant en incubation l'enzyme et l'inhibiteur sur couche mince pendant 2 heures, puis le substrat est ajouté et l'incubation perdure encore 30 minutes, mais cela n'abouti pas à une réponse positive pour l'inhibition.

### 3.1.2. Essai en solution

Pour vérifier si la détection de l'inhibition de la PLA<sub>2</sub> est possible, en utilisant cette méthode, la réaction est réalisée en milieu liquide.

D'abord la réaction entre l'enzyme et le substrat est faite en utilisant les différentes solutions tampons (1, 2, 3, 4), pour vérifier laquelle favorise la formation d'une plus grande quantité de produit. La solution choisie est le tampon Tris - HCl à pH 8.0, contenant du deoxycholate de sodium (NaDC).

La réaction se déroule comme décrit en 0. Le résultat est indiqué sur la **Figure 6**. Aucune différence n'est notée pour la quercétine et pour le BPB. Pour la quinacrine, la presque totale disparition de la PC suggère que cette substance a agi comme un activateur dans ces conditions.



**Figure 6** : Réaction entre PLA<sub>2</sub>, PC et des différents inhibiteurs.

- 1) Réaction PLA<sub>2</sub> et PC ;
- 2) Réaction PLA<sub>2</sub>, PC et quinacrine;
- 3) Réaction PLA<sub>2</sub>, PC et quercétine;
- 4) Réaction PLA<sub>2</sub>, PC et BPB.

En laissant les tubes en incubation pendant 64 heures il est possible d'observer (**Figure 7**) la quasi complète conversion du PC en produit pour la réaction sans inhibiteur (1), tandis que celle qui contient du BPB présente encore du substrat, suggérant une inhibition de l'enzyme, malgré la basse solubilité de l'inhibiteur.

Sur le chemin 2, une nouvelle tache est visible (Rf 0.92). Cela peut être du à la dégradation de l'acide gras, qui a un Rf de 0.7.



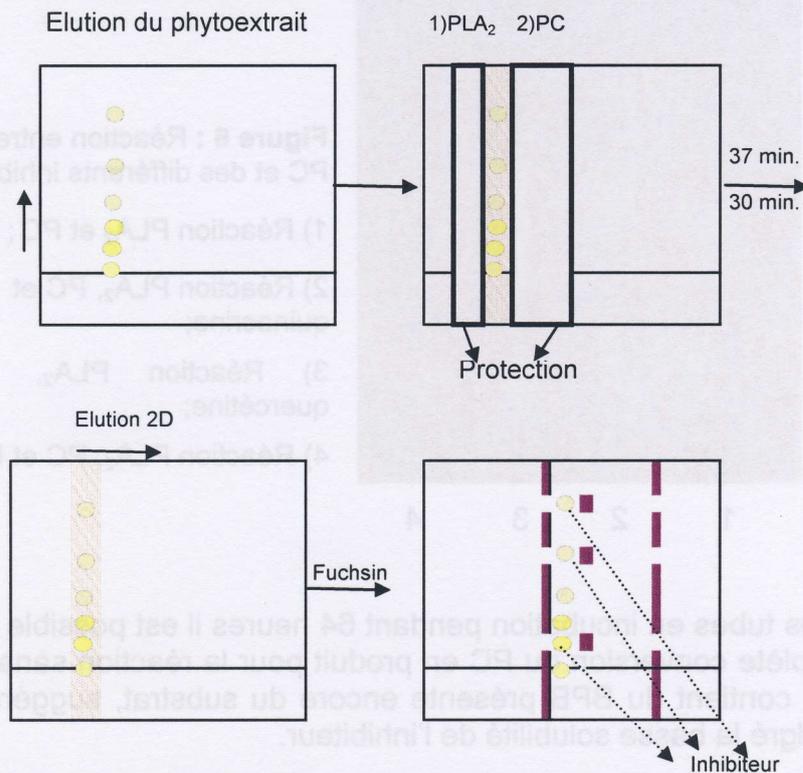
**Figure 7 :** Réaction entre PLA<sub>2</sub>, PC et BPB., laissé en incubation pendant 64 heures.

- 1) Réaction PLA<sub>2</sub> et PC ;
- 2) Réaction PLA<sub>2</sub>, PC et BPB.

Une amélioration de la procédure, qui consisterait à laisser le mélange réactionnel en agitation constante, serait nécessaire pour obtenir plus rapidement les produits.

### Méthode d'analyse

La proposition d'une procédure d'identification du composé de l'extrait brut responsable par l'inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub> est illustrée sur la figure ci-dessous :



**Figure 8 :** Illustration de la procédure de mise en évidence d'un inhibiteur de la PLA<sub>2</sub>.

Tout d'abord l'extrait brut est élué sur une plaque 10 x 10 cm avec un système de solvant approprié [29]. La plaque est séchée et les surfaces latérales à la surface où a eu la migration (800 mm<sup>2</sup>) sont protégées avec deux autres plaques. Sur la région de l'élué, Alessandra Calero Rochet

environ 1ml de l'enzyme (4.4 U/ml) et 1ml de PC (0.6 mg/ml) sont sprayés. Les protections sont enlevées et la plaque est incubée à 37 ° C pendant 30 minutes.

Après cette période, la plaque est séchée à froid et une élution bidimensionnelle est réalisée avec le système de solvant  $\text{CHCl}_3$  :MeOH :Eau (25 :10 :1), puis séchée encore une fois et sprayée avec la fuchsine.

Si après le séchage du révélateur il y a la tache correspondant à la phosphatidylcholine, c'est parce que le composé du phytoextrait qui a migré en première dimension est un inhibiteur.

#### 4. Conclusion et perspectives

Une méthode de détection de l'inhibition de la  $\text{PLA}_2$  est proposée en utilisant la fuchsine pour révéler les produits de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine.

L'influence de la quantité de l'enzyme et du substrat, de la température, du temps d'incubation et du pH du tampon sur la réponse sont étudiés. La limite de détection pour la phosphatidylcholine est de 5  $\mu\text{g}$ , et en utilisant 0.1 U les produits de l'hydrolyse sont encore visibles.

Malgré tous les essais réalisés, l'inhibition sur couche mince n'a pas eu lieu. L'utilisation d'autres supports (phase inversée) ou modification de la plaque en silice en utilisant de la glycérine ou du méthanol, pour poursuivre le test d'inhibition sur plaque est envisagée.

Lors de ce travail, le substrat chromogène, l'acide 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoïque [30], a été synthétisé. La réaction de l'hydrolyse par  $\text{PLA}_2$  peut être vue à l'**Annexe 4**. L'objectif est, après élution de l'extrait, de sprayer complètement la plaque avec l'enzyme et le substrat. La plaque deviendrait jaune, sauf aux régions où l'inhibiteur est actif. Les tests n'ont pas encore été effectués.

D'autres substrats ont été envisagés pour être utilisés dans ce travail. Le thio-PC a été préalablement utilisé [23] et le révélateur utilisé a été le DTNB, toutefois les conditions d'essai doivent être optimisées ainsi que la détection.

L'activité de la phospholipase  $A_2$  est souvent déterminée en utilisant des phospholipides contenant des acides gras fluorescents, comme le dansyl et le dabsyl-phosphatidylcholine [1], le 1-acyl-2-parinaroylphosphatidylcholine, le 1,2-bis( $\alpha$ (1 pyrenyl)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine [32] et l'umbelliferyl arachidonate [33]. Les structures de ces substrats sont décrites à l'**Annexe 6**.

Certains ne sont plus commercialement disponibles, d'autres sont relativement chers. Pour ces raisons, la synthèse des certains substrats comme le thio-PC [34] et les dansyl et dabsyl-PC [35][36] est souhaitée pour une future utilisation dans la méthode de caractérisation de l'inhibition de  $\text{PLA}_2$  sur couche mince.

## 5. Partie expérimentale

Les réactifs utilisés dans ce travail sont détaillés à l'**Annexe 2**.

### Solution tampon Tris - HCl

Un volume de 200 ml de solution tampon 1 (Tris 395 mM, NaCl 66mM, CaCl<sub>2</sub> 13.2mM) est préparé en utilisant 4.0 g de tris(hydroxyméthyl) aminométhane, 11.5 g de chlorure de sodium et 0.73 g de chlorure de calcium.

Les pH des la solution est mis à 7.4 (tampon 1) ou 8.0 (tampon 2) avec du HCl 1 M.

### Solutions PLA<sub>2</sub> et PC

Pour l'essai initial, une quantité de 2 mg de l'enzyme est dissoute dans 2 ml de solution tampon 1 (0.2 U/μl), ensuite 140 μl de cette solution sont dilués jusqu'à un volume de 1 ml (0.028 U/μl) en utilisant le même tampon.

Le substrat (20 mg) est dissous dans 1 ml d'un mélange acétate d'éthyle : chloroforme (4 :1).

### Essai direct sur couche mince

Les plaques utilisées sont constituées de gel de silice 60 F<sub>254</sub>, 10 x 10 cm (Merck GmbH, HX784799).

Chaque plaque est éluée avec du chloroforme - méthanol, 2:1 (v:v), et de l'acétone avant l'utilisation.

Sur chaque plaque quatre spots sont mis :

- I. Le premier contient 5μl du substrat PC ;
- II. Le 2<sup>ème</sup> 5 μl de l'enzyme puis 5μl de PC, représentant 100 % de l'activité ;
- III. Sur le 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> spots, 5 μl de chaque solution, selon le **Tableau 3** .
- IV. Le 7<sup>ème</sup> contient 5 μl de l'inhibiteur, comme référence.

Les quantités utilisées sont : 20 μg PC, 0.1 U PLA<sub>2</sub> et 20, 50 et 100 μg de l'inhibiteur.

La quinacrine est solubilisée dans l'eau, le BPB dans le CHCl<sub>3</sub>, la quercétine dans le MeOH et les drogues dans l'éthanol 30%. Le PC dans le mélange acétate d'éthyle : chloroforme (4 :1) et l'enzyme dans le tampon 1.

La plaque est mise dans l'incubateur ( Bioconcept, Firlabo BC 60) à 37°C et y est laissée en atmosphère humidifiée pendant 30 minutes. La plaque ne doit pas entrer en contact direct avec de l'eau. Pour ce faire, cette même plaque est disposée sur des bouchons en plastique, dans une boîte en plastique couverte contenant 3 mm d'eau, comme indiqué sur la **Figure 9**.

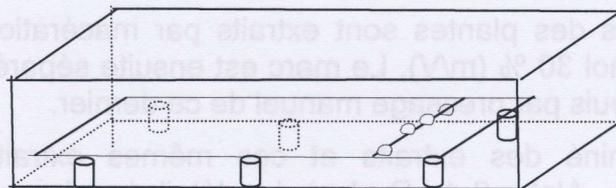


Figure 9 : schéma de l'incubation de la CCM.

Après ce temps d'incubation, la plaque est séchée avec le sèche cheveux à froid, pendant 1 minute, puis est éluée avec un système de solvant  $\text{CHCl}_3$  :MeOH :Eau (25 :10 :1) dans une cuve CAMAG double bacs pour les plaques 100x100 mm, avec couvercle en acier inoxydable. Ensuite, la plaque est encore séchée pour éliminer le solvant et sprayée avec le révélateur fuchsine.

### Solution tampon Tris - HCl pH 7.4 avec deoxycholate de sodium

Un volume de 100 ml de solution tampon 2 (Tris 50 mM, NaCl 100mM, mM, NaDC 1.0 mM) est préparé en utilisant 0.61 g de tris(hydroxyméthyl) aminométhane, 0.59 g de chlorure de sodium et 0.042 g de deoxycholate de sodium.

Le pH est ajusté à 7.4 (tampon 3) ou 8.0 (tampon 4) avec du HCl 1M.

### Réaction en solution

Dans un tube eppendorf de 2 ml, 4 mg de PC et 5 mg de l'inhibiteur sont pesés et dissous dans 990  $\mu\text{l}$  de solution de  $\text{PLA}_2$  10 U/ml et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 M. Le tube est agité avec un agitateur vortex (Eckei-Eletronic) et mis à l'incubateur à 37°C pendant 30 minutes, puis agité chaque 10 minutes pendant 1 heure.

Une solution témoin est préparée en dissolvant 4 mg de PC dans 990  $\mu\text{l}$  de solution de  $\text{PLA}_2$  10 U/ml et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 M.

Après l'incubation, 4  $\mu\text{l}$  de chaque solution sont déposées sur la CCM. Les spots sont séchés et la plaque est éluée avec le système de solvant  $\text{CHCl}_3$  :MeOH :Eau (25 :10 :1), puis séchée et sprayée avec la fuchsine.

## Extraits de plantes

Les principes actifs des plantes sont extraits par macération agitée pendant 5 heures dans 50 ml d'éthanol 30 % (m/V). Le marc est ensuite séparé de l'extrait par filtration sur filtre papier plissé puis par pressage manuel de ce dernier.

L'éthanol est éliminé des extraits et ces mêmes extraits sont ensuite lyophilisés (Lyophiliseur Christ –Alpha 2-4 LD plus). Le détail des drogues utilisées est présenté au **Tableau 4**.

**Tableau 4** : drogues utilisées.

Plante	Date/Provenance	m plante macérée [g]	m extrait lyophilisé [g]	volume extrait lyophilisé [ml]	Matière séchée [%]
<i>Alchemilla xanthochlora</i>	2004/-	5.533	25.922	27	4.0
<i>Arnica montana</i>	29.05.07/Bruson	5.352	21.460	23	3.8
<i>Matricaria recutita</i>	04.07/Arbaz	5.148	28.915	30	4.9
<i>Leontopodium alpinum</i>	-/Alpaflor	5.053	33.953	36	3.0
<i>Monarda fistulosa</i> (clone C lot 04/398)	09.04/-	4.935	33.308	35	3.4
<i>Corylus avellana</i>	2006/Oure	5.725	29.174	31	4.3
<i>Rhodiola rosea</i>	06.07/Rhodtun tunnel	5.050	21.793	23	5.0
<i>Satureja montana</i>	-/-	5.379	26.898	29	2.5
<i>Saxifraga rotundifolia</i>	2003/Arbarey	5.015	23.850	25	2.8

## Synthèse de l'acide 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoïque

Les verreries utilisées doivent être complètement exemptes d'humidité.

Dans un ballon d'un col 20 ml fermé avec un septum (par où l'azote entre en garantissant l'absence de l'air), des volumes de 171  $\mu\text{l}$  (163 mg, 1 mmol) de chlorure d'octanoyl et 10 ml de THF anhydre sont ajoutés à l'aide de seringues, et la solution est refroidie à 0°C.

Une quantité de 183 mg d'acide 3-hydroxy-4-nitro benzoïque est pesée et rapidement introduite dans un ballon d'un col de 5 ml (aussi en atmosphère inerte) et dissoute avec 2 ml de THF, puis 349  $\mu\text{l}$  (259 mg, 2 mmol) de *N,N*-diisopropylethylamine sont ajoutés.

Cette solution est immédiatement additionnée goutte à goutte, avec une seringue de 2 ml, au ballon de 20 ml. Le mélange réactionnel atteint doucement la température ambiante et est laissé en agitation pendant la nuit.

Après cette période, le mélange est filtré et le précipité lavée trois fois avec 10 ml d'éther diéthylique. Le filtré est concentré au rotavap et 50 ml de éther : hexane (2 : 1 (V : V)) sont ajoutés. Cette phase est lavée deux fois avec 50 ml de HCl 0.01M et de l'eau distillée (50 ml 2X), séchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporée à vide.

Le résidu (280 mg) est purifié par chromatographie en colonne ouverte (42 cm de longueur, 1 cm de diamètre), en utilisant comme support la silice SDS 60 ACC (35-70 microns) et comme éluant le système hexane : éther : acide acétique (20 : 10 : 1) .

Chaque fraction de 5 ml est analysée par CCM en utilisant comme système de solvant hexane : acétate d'éthyle : acide acétique (20 : 10 : 1) et 5 $\mu\text{l}$  d'une solution à 0.2% de l'acide 3-hydroxy-4-nitro benzoïque l'acide 3-hydroxy-4-nitro benzoïque dans le THF comme témoin.

Les fractions 4, 5, 6 et 7 possédant un  $R_f$  de 0.44 sont réunies dans un ballon 50 ml et évaporées à sec au rotavap. Le ballon est laissé au lyophilisateur pendant la nuit. Le rendement de la synthèse est de 63.4% (196 mg).

L'analyse  $^{13}\text{C}$ -RMN es réalisée pour confirmer la réaction entre l'acide benzoïque et le chlorure d'acide (voir sur l'**Annexe 7**).

## 6. Bibliographie

- [1] Hendrickson H., "Phospholipase A<sub>2</sub> and phosphatidylinositol -specific Phospholipase C assays by HPLC and TLC with fluorescent substrate", *Methods in Molecular Biology*, 109 (1999) 1-6.
- [2] Jiménez et al, "A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A<sub>2</sub> activity", *Analytical Biochemistry*, 319 (2003) 131-137.
- [3] Rousselet M., «Inflammation et pathologie inflammatoire, Polycopié de pathologie générale des études médicales », Association Française des Enseignants en Cytologie et Anatomie Pathologiques, Marseille (2005).
- [4] De Blois D., « Anti-inflammatoires et médicaments périphériques », Polycopie Pharmacodynamique des médicaments, Université de Montréal, Montréal (2007).
- [5] Dennis E., Six D., "The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488 (2000) 1-19.
- [6] Balsinde J., Winstead M., Dennis Edward E., "Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization", *Federation of European Biochemical Societies, letters* 531(2002) 2-6.
- [7] Nevalainen T. and al, "Roles of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in inflammatory diseases and trauma", *Biochimica and Biophysical Acta* 1488 (2000) 83-90.
- [8] Yedgar S. and al, "Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as therapeutic target", *Biochimica and Biophysical Acta* 1488 (2000) 182-187.
- [9] Dennis E., "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>", *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994) 13057-13060.
- [10] Murakami M., Kudo Y., "Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes, Prostaglandins and Other Lipids Mediators", 68 (2002) 3-58
- [11] Touitu Y., « Biochimie : structure des glucides et lipides », Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Université de Paris, 2006.
- [12] Fourcade O. et al, « Phospholipases A<sub>2</sub> et pathologie inflammatoire : consensus et nouveaux concepts », *Médecine et sciences*, 12(1996) 323-332.
- [13] Leportier-Comoy C., « Etude de deux marqueur de l'inflammation tumor necrosis factor alpha et phospholipase A<sub>2</sub> », Travail de diplôme, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris (2003).
- [14] Glaser K. et al, "Macrophage phospholipase A<sub>2</sub> activity and eicosanoid production: studies with phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in P338D<sub>1</sub> cells", *Advances in experimental medicine and biology*, 275 (1990)
- [15] Marshall L., Chang J., "Pharmacological control of phospholipase A<sub>2</sub> activity in vitro and in vivo", *Advances in experimental medicine and biology*, 275 (1990) 169-182.
- [16] Yu L. et al, "The interaction of phospholipase A<sub>2</sub> with phospholipids analogues and inhibitors", *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (1990) 2657-2664.
- [17] Vane J. Botting R., "Inflammation and the mechanism of action of anti inflammatory drugs", *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 1(1987) 89-96.
- [18] Bruneton J., « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales », Technique et Documentation – Lavoisier, Paris (1990).

- [19] Iglesias C. et al, « Efeito de flavonóides na estrutura e atividade inflamatória da PLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus cascavella* », Travail de diplôme, Université de Campinas (2005).
- [20] Marston A., Kissling J., Hoestettman K., "A rapid TLC bioautographic method for detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants", *Phytochemical Analysis*, 13 (2002) 51-54.
- [21] Feng L. et al, "A Real-Time Fluorogenic Phospholipase A<sub>2</sub> Assay for Biochemical and Cellular Activity Measurements", *Chemistry & Biology*, 9 (2002) 795-803.
- [22] Petrovic N., "A simple assay for a human serum phospholipase A<sub>2</sub> that is associated with high-density lipoproteins", *Journal of lipid research*, 42 (2002) 1706 -1713.
- [23] Berthouzoz S., « Caractérisation de l'activité anti-inflammatoire de phytoextraits bruts par dosage d'inhibitions enzymatiques sur couche mince », Travail de diplôme, Université de Genève, Sion (2007).
- [24] [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com). Consulté le 12.03.2008.
- [25] Helmy F., et al, "A comparative study of the phospholipid profiles of guinea pig cardiac muscle and bullfrog cardiac and thigh skeletal muscle, and their in-itro differential deacylation by endogenous phospholipases", *Journal of Planar Chromatography*, 20 (2007) 3, 209-215.
- [26] [www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P223](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P223). Consulté le 15.09.2008.
- [27] Pekka Mustonen et al, "Quinacrine to Acidic Phospholipids and Pancreatic Phospholipase A<sub>2</sub>. Effects on the Catalytic Activity of the Enzyme", *Biochemistry*, 37 (1998) 12051-12057.
- [28] Böhl M. et al, "Phospholipase A<sub>2</sub> inhibition at different substrate concentration", *Analytical biochemistry*, 359 (2006) 280-282.
- [29] Wagner H., Blatt S., „Plant Drug Analysis“, Springer, München (2001).
- [30] Cho W. et al, "A new class of phospholipase A<sub>2</sub> substrate: kinetics of the phospholipase A<sub>2</sub> catalysed hydrolysis of 3-(acyloxy)-4-nitrobenzoic acids", *Journal of the American Chemical Society*, 110 (1998) 5166-5171.
- [31] Cho W, Kézddy F, "Chromogenic substrates and assay of phospholipases A<sub>2</sub>", *Methods in enzymology*, 197 (1991) 75-79.
- [32] Birner-Grünberger R., Schmidinger H., Loidl A., Scholze H., Hermetter A., "Fluorescents probes for lipolytic enzymes", *Enzymes assays*, (2006) 239-269.
- [33] Huang, Z., "A continuous fluorescence-based assay for the human high-molecular-weight cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>", *Analytical Biochemistry*, 222 (1994) 110-115.
- [34] Yu L., Dennis E., "Thio-based phospholipase assay", *Methods in enzymology*, 97 (1991) 65-75
- [35] Schindler P., Walter R., Hendrickson S., "Fluorophore-labeled ether lipids: substrates to enzymes of the platelet-activating factor cycle in peritoneal polymorphonuclear leukocytes", *Analytical Biochemistry*, 174 (1988) 477-484.
- [36] Hendrickson S, Kotz K., Hendrickson E., "Evaluation of fluorescent and colored phosphatidylcholine analogs as substrates for the assay of phospholipase A<sub>2</sub>", *Analytical Biochemistry*, 185 (1990) 80-83.

## 7. Remerciements

J'aimerais exprimer ma gratitude au Dr Andrew Marston, de l'Université de Genève, qui a supervisé mes activités et a toujours été disponible pour répondre à mes questions, ainsi qu'au Dr Alain-François Grogg, professeur HES-SO, responsable pour ce travail.

Mes remerciements à Nadia Marcon, ingénieur HES-SO, qui a réalisée les macérations, ainsi qu'aux docteurs Karine Ndjoko, Aurélie Urbain et Yves Allenbach de l'université de Genève pour les analyses RMN et pour les conseils en synthèse organique.

Merci beaucoup à toute l'équipe du professeur Kurt Hostettmann, du Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Genève, pour leur accueil très chaleureux.

Enfin, à Régis, par l'encouragement de tous les jours pendant tous ces années de formation.

Je dédie ce travail à Marie-Thérèse et Jean-François Rochet.

A la famille Da Luz Calero, ma mère Luiza et mes sœurs, Nadia et Mirian, ces gens que me sont très cher, si loin mais toujours avec moi.

A la mémoire de mon père, Nadir.

Sion, le 21 novembre 2008

Calero Rochet Alessandra



## 8. Annexes

### Annexe 1 : Liste d'abréviations.

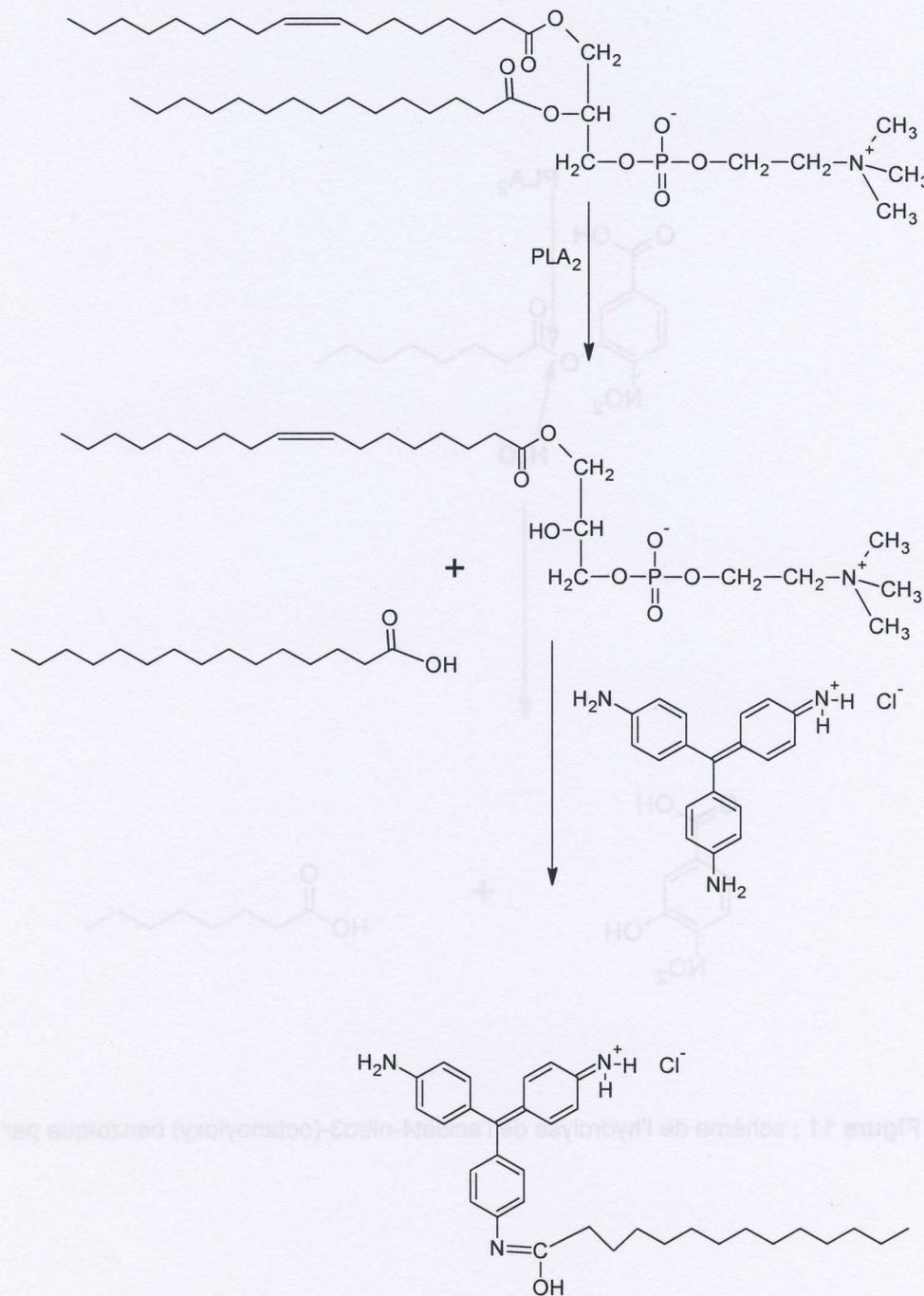
AA	Acide arachidonique
BPB	p-bromophenacylbromure
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
COX	Cyclooxygénase
cPLA <sub>2</sub>	Cytosolique phospholipase A <sub>2</sub>
Dansyl-PC	1-O-(N-dansyl-11-amino-1undecyl)-2-O-decanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
Dabsyl-PC	1-O-(N-dabsyl-11-amino-1undecyl)-2-O-decanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DEDA	7,7 diméthyl-5,8-éicosadiénoïque
DTNB	5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)
EC	Enzyme Commission numbers
IC <sub>50</sub>	Concentration de l'inhibiteur nécessaire pour obtenir 50% d'inactivation
iPLA <sub>2</sub>	Indépendante phospholipase A <sub>2</sub>
IL	Interleukine
HETE	Acide hydroxyde éicosatétraénoïque
HPETE	Acide hydroperoxy éicosatétraénoïque
LysoPL	Lysophospholipide
LOX	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
MeOH	Méthanol
NaDC	Deoxycholate de sodium
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PC	phosphatidylcholine
PLA <sub>1</sub>	Phospholipase A <sub>1</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PG	Prostaglandine
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
Rf	Facteur de retard
sPLA <sub>2</sub>	Sécrétoire phospholipase A <sub>2</sub>
THF	Tetrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
U	Unité(s)

## Annexe 2 : Réactifs utilisés

**Tableau 5** : Détail des réactifs utilisés.

Nom	Pureté	Fournisseur	Lot
L- $\alpha$ phosphatidylcholine Type XVI-E	~99% (TLC)	Sigma-Aldrich	P3556
Phospholipase A <sub>2</sub> pancreas porcin, ~200 U/mg	~99% (TLC)	Fluka analytical	135304432008275
Fuchsin Schiffs reagent	-	Fluka	134005531708297
2,4-dibromoacetophenone	98%	Aldrich	038308
Quinacrine dihydrochloride	>=97% (HPLC)	Fluka	3251
Quercétine dihydrate	-	Fluka	84082
Sodium deoxycholate	-	Sigma-Aldrich	117 KO124
3-hydroxy-4-nitro benzoic acid	95%	Sigma-Aldrich	H41840-9
Tetrahydrofuran anhydrous	99.9 %	Aldrich	01749BJ-258
N,N-diisopropylethylamine	>= pp%	Sigma-Aldrich	12926HH
Octanoyl chloride	> 99%	Aldrich	S29324-077

Annexe 3: Réaction entre PC et PLA2 et révélateur fuchsine



couleur violet

Figure 10 : schéma de l'hydrolyse du PC par la PLA<sub>2</sub> et révélation avec la fuchsine.

Annexe 4: Réaction entre le substrat nitro-PC et PLA2

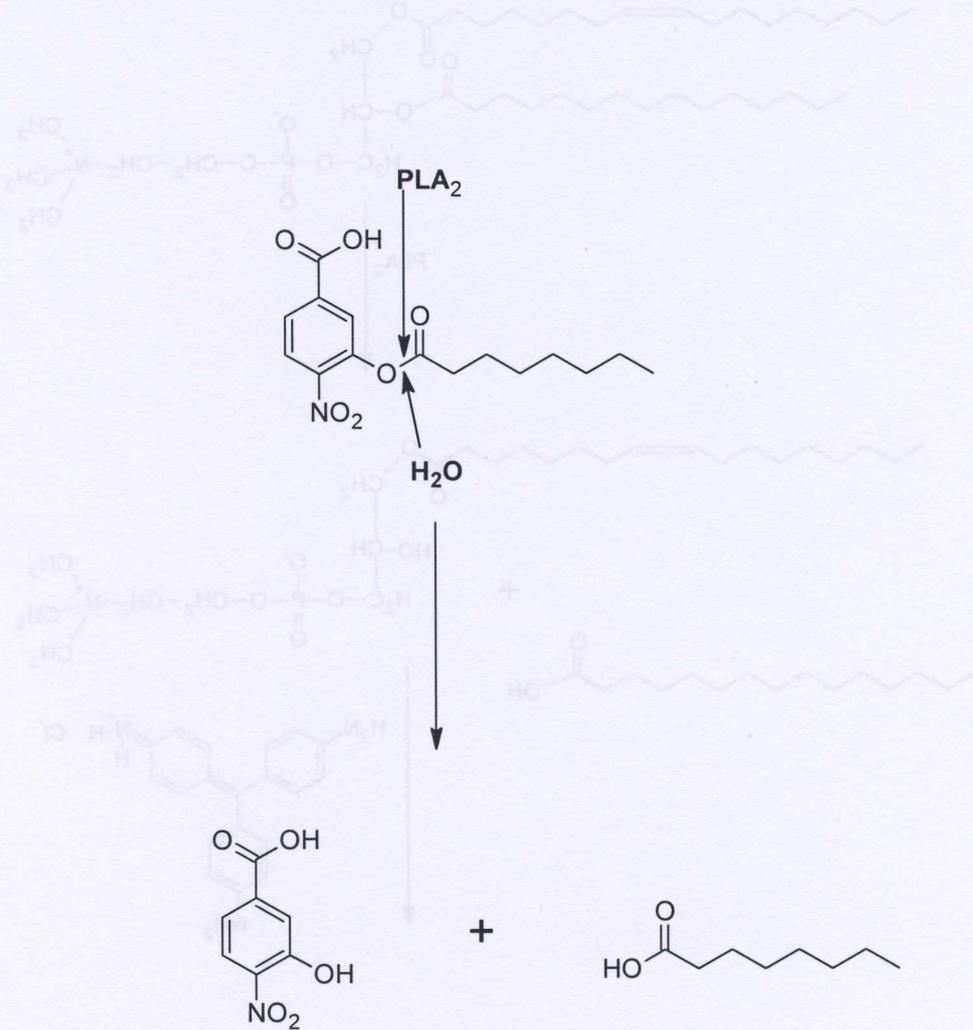
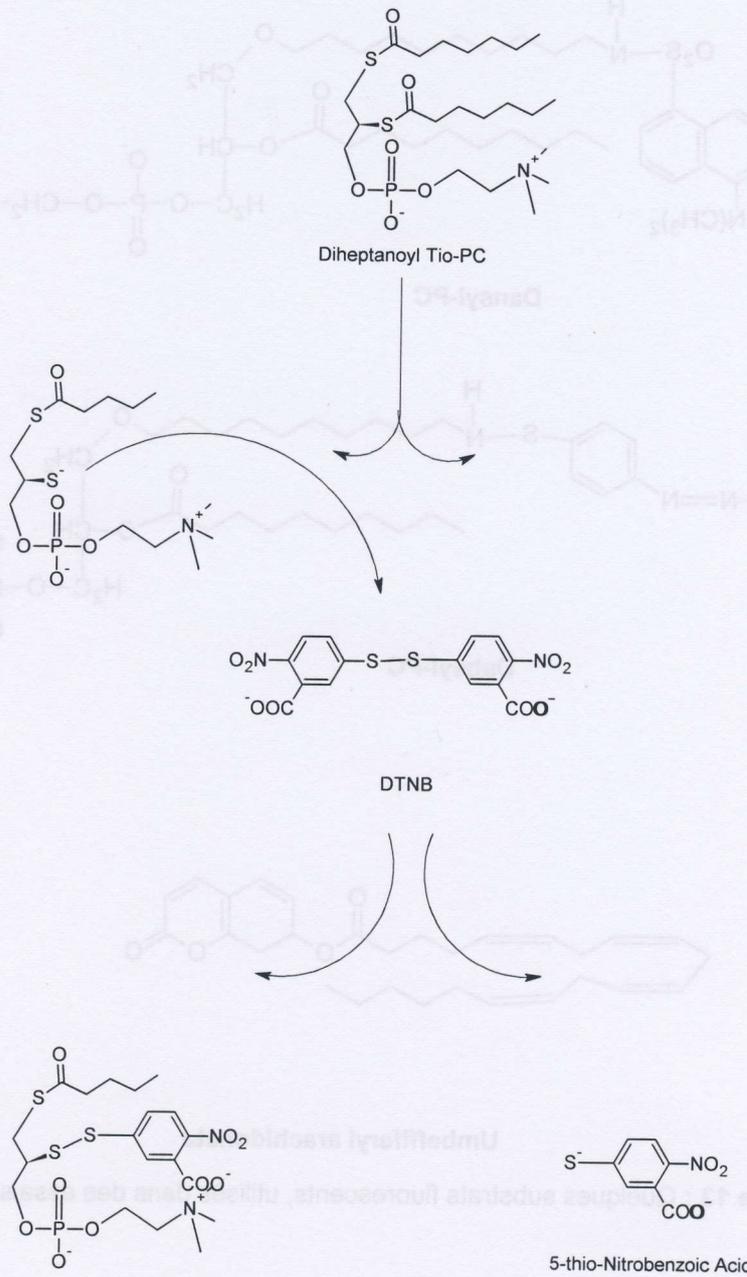


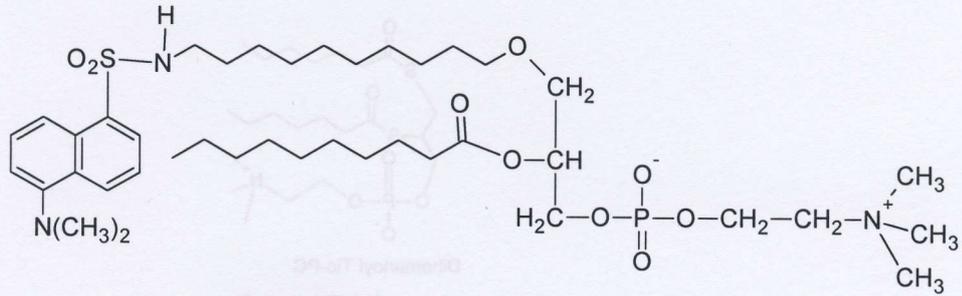
Figure 11 : schéma de l'hydrolyse de l'acide 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoïque par la PLA<sub>2</sub>.

**Annexe 5: Réaction entre thio-PC et PLA2, révélateur DTNB**

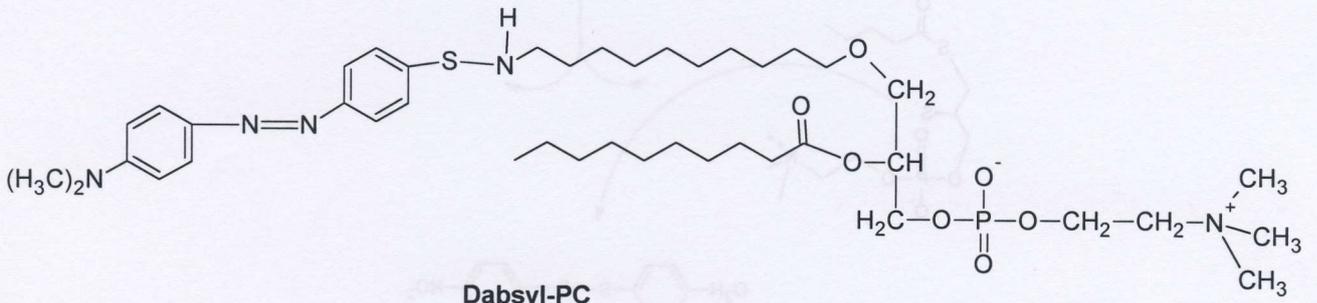


**Figure 12 :** schéma de l'hydrolyse du thio-PC par la PLA<sub>2</sub>.

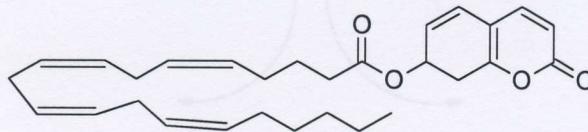
Annexe 6 : Composés fluorescents



Dansyl-PC



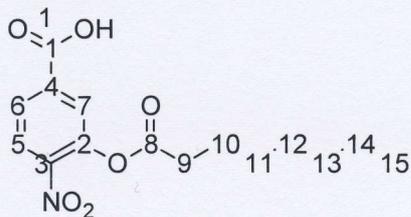
Dabsyl-PC



Umbeffiferyl arachidonate

Figure 13 : Quelques substrats fluorescents, utilisés dans des essais enzymatiques.

**Annexe 7 : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN du 4-nitro-3-(octanoyloxy) benzoïque**



**Tableau 6 :** Analyse  $^{13}\text{C}$ RMN du composé chromogène synthétisé.

Carbone	Déplacement chimique [ppm]
1	165.0
2	145.0
3	142.5
4	137.0
5	127.0
6	126.2
7	126.2
8	171.0
9	40.0
10	33.9
11	31.0
12	26.2
13	22.8
14	20.0
15	14.0

