

Phospholipases A₂ et pathologie inflammatoire : consensus et nouveaux concepts

Olivier Fourcade
Marie-Françoise Simon
François Leballe
Bernadette Gaigé
Frédérique Gaits
Claire Delagebeaudeuf
Ama Gassama
Jean-Pierre Salles
Josette Fauvel
Hugues Chap

En dehors de leurs fonctions digestives ou métaboliques, les phospholipases A₂ (PLA₂) sont essentiellement connues pour leur rôle dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques, qui nécessite la libération de précurseurs tels que l'acide arachidonique. S'il existe un consensus sur le rôle et la régulation de la PLA₂ cytosolique (cPLA₂), la fonction réelle de la PLA₂ de type II, ou PLA₂ « sécrétoire » (sPLA₂) produite en réponse à des *stimuli* inflammatoires, reste largement inconnue. Une étude récente propose que la sPLA₂ agirait préférentiellement sur des microvésicules émises par des cellules ayant perdu leur asymétrie phospholipidique. Parmi les phospholipides devenant ainsi accessibles à cette PLA₂ extracellulaire, l'acide phosphatidique, synthétisé par deux voies majeures de signalisation cellulaire, apparaît comme un précurseur potentiel de l'acide lysophosphatidique, médiateur phospholipidique doué de diverses activités biologiques. Ces nouvelles données, ainsi que la découverte récente d'un récepteur de PLA₂ sécrétées, ouvrent des perspectives intéressantes dans divers domaines de physiopathologie et de pharmacologie.

ADRESSE

O. Fourcade: interne des hôpitaux. M.-F. Simon: chargée de recherche à l'Inserm. F. Leballe: praticien hospitalier. B. Gaigé: étudiante en doctorat. F. Gaits: étudiante en doctorat, boursière MRES. C. Delagebeaudeuf: étudiante en doctorat, boursière MRES. A. Gassama: chargée de recherche à l'Inserm. J.-P. Salles: maître de conférences des universités. J. Fauvel: maître de conférences des universités. H. Chap: professeur. Inserm U 326, phospholipides membranaires, signalisation cellulaire et lipoprotéines, hôpital Purpan, 31059 Toulouse Cedex, France.

A l'origine, les phospholipases A₂ (PLA₂) ont été identifiées comme des enzymes particulièrement abondantes dans les venins de serpents et le suc pancréatique où elles jouent un rôle digestif évident, doublé d'un rôle toxique dans le premier cas. Mais 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 arachido-

nique et le facteur activant les plaquettes ou PAF-acéther (*figure 1, voir aussi [1]*). Cependant, pendant près de vingt ans, les études sur le sujet se sont cantonnées à des investigations métaboliques, le plus souvent sur cellules isolées, qui ont donné lieu à diverses hypothèses et à des données assez grossières de pharmacologie cellulaire. Comme prévu, ce domaine a fait un bond en avant à partir de l'isolement de PLA₂ cellulaires, rapidement suivi du clonage des ADNc correspondants. Mais les progrès ain-

si réalisés ont à la fois éclairé et obscurci le problème, en révélant une diversité de protéines dont la fonction et la régulation restent, pour la plupart d'entre elles, largement méconnues.

La diversité des PLA₂ et la régulation de leur expression

PLA₂ sécrétées

Les PLA₂ sécrétées (Tableau I) sont fortement homologues, elles ont en commun un faible poids moléculaire, la présence d'au moins cinq ponts disulfures, qui les rend particulière-

ment stables, et d'un peptide signal [2-4]. Celui-ci permet leur sécrétion par une voie cellulaire classique, mais qui ne s'accompagne d'aucune glycosylation. Sur le plan enzymatique, elles fonctionnent avec une « pseudo » triade catalytique, dans laquelle la sérine est remplacée par une molécule d'eau. L'état de transition est stabilisé par un ion Ca²⁺, qui participe donc directement au fonctionnement du site actif et qui est requis à une concentration de l'ordre du mM. Le résidu d'histidine du site actif est particulièrement réactif à la dibromo-acétophénone (bromophenacyl bromide ou BPB), qui a de ce fait été largement utilisée comme « inhibiteur spécifique » de PLA₂. Il faut néanmoins convenir que son

RÉFÉRENCES

1. Chap H. Icosanoïdes et phospholipases. *médecine/sciences* 1988; 4: 6-7.
2. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 13057-60.
3. Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1170: 217-31.
4. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J Lipid Mediat* 1993; 8: 1-30.
5. Olivier JL, Fan Q, Salvat C, Ziari M, Long L, Mangeney M, Béréziat G. Positive and negative regulation of the human type II phospholipase A₂ gene. *Biochemistry* 1994; 33: 7134-45.
6. Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 2365-8.
7. Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂s containing 16 cysteines. *J Biol Chem* 1994; 269: 23018-24.
8. Feuchter-Murthy AE, Freeman JD, Mager DL. Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A₂ related gene. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 135-43.
9. Perret B, Chap H, Douste-Blazy L. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. *Biochim Biophys Acta* 1979; 556: 434-46.
10. Lin LL, Lin AY, DeWitt DL. Interleukin-1α induces the accumulation of cytosolic phospholipase A₂ and the release of prostaglandin E₂ in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267: 23451-4.
11. Boeymans J, Panneels V, van Sande J, Braekman J. Un rôle physiologique des plasmalogènes: la protection contre le stress oxydatif et l'excès d'iode. *médecine/sciences* 1995; 11: 254-9.

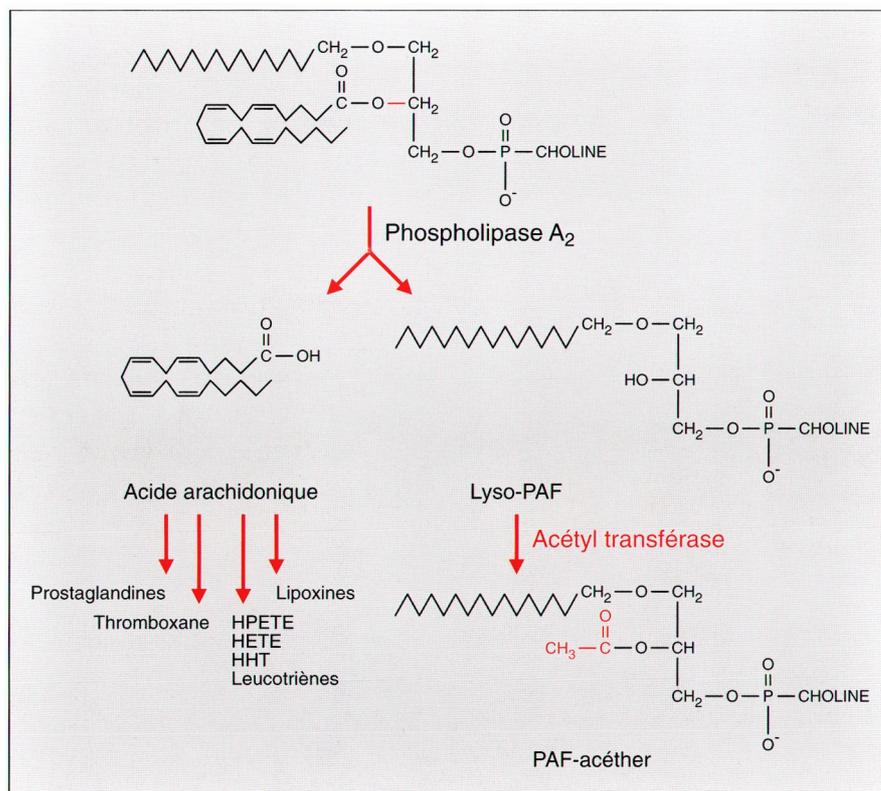


Figure 1. Rôle de la PLA₂ dans la production de médiateurs lipidiques. Dans l'exemple présenté, la PLA₂ agit sur un éther-phospholipide à groupement choline (1-O-hexadecyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), qui est ainsi converti en lysophospholipide dont l'acétylation conduit à la formation de PAF-acéther (Platelet Activating Factor). Par ailleurs, l'acide arachidonique est transformé par diverses enzymes (cyclo-oxygénase et lipoxygénases, en particulier) en divers icosanoïdes, parmi lesquels des dérivés hydroperoxylés ou hydroxylés, correspondant aux abréviations HPETE, HETE, HHT.

ajout à des cellules entières implique d'autres interactions, qui jettent le doute sur la validité des conclusions ainsi obtenues.

La classification en différents types (ou groupes) des PLA₂ sécrétées repose sur la position de certains ponts disulfures. De ce fait, la PLA₂ pancréatique s'apparente aux PLA₂ de venins de cobras, alors que la sPLA₂ est homologue des enzymes présentes dans les venins de vipères

(Tableau I). Nous insisterons peu sur la localisation de la PLA₂ de type I dans le pancréas exocrine, en accord avec son rôle digestif, bien qu'une expression ait été décrite dans d'autres tissus tels que le poumon ou l'estomac.

Ces dernières années, la majorité des travaux ont été consacrés à la sPLA₂, également connue sous les termes de snp-PLA₂ (*secretory non pancreatic*), de *synovial* ou de *platelet* PLA₂, qui reflè-

tent certaines de ses localisations tissulaires. Le Tableau I indique de multiples sites de production pour cette enzyme qui est parfois synthétisée de manière constitutive (cas des plaquettes ou de la prostate, qui la sécrète dans le plasma sérial), mais le plus souvent en réponse à des cytokines inflammatoires, dont les plus puissantes semblent être l'interleukine-1 (IL-1) ou le *tumor necrosis factor-α* (TNFα). Cela est particulièrement

Tableau I					
LES DIFFERENTS TYPES DE PLA ₂					
	Taille	Ponts disulfures	Localisation	Calcium	Références
PLA₂ sécrétées					
• Type I	13-15 kDa	7	Venins de cobras Pancréas (poumon, estomac)	mM	[2, 3]
• Type II (sPLA ₂)	13-15 kDa	7	Venins de viperidae Foie, rate, intestin, poumon, rein, thymus Plaquettes, neutrophiles, macrophages, mastocytes, cellules endothéliales, musculaires lisses, mésangiales, ostéoblastes, chondrocytes, synoviocytes, astrocytes... Plasma sérial, plasma de chocs septiques, exsudats inflammatoires	mM	[2-4]
• Type III	16-18 kDa	5	Venin d'abeille	mM	[2]
• Type « cardiaque »	13,5 kDa	6	Cœur > poumon	mM	[6]
• Type « testiculaire »	14,7 kDa	8	Testicule	mM	[7]
• RTVL-H/PLA ₂ L	76 kDa ?	?	Tératocarcinomes	?	[8]
PLA₂ intracellulaires					
• cPLA ₂	85 kDa	0	Ubiquitaire	μM	[2, 3]
• 40K	40 kDa	?	Cœur, pancréas endocrine, cellules musculaires lisses	0	[2, 3]
• 80K	80 kDa	?	Lignée P388D ₁ (macrophage)	0	[47]
• PS ^a spécifique	?	?	Mastocytes	0,1 μM	[3]
• PA ^b spécifique	58 kDa	?	Cerveau	0	[14]
• Phospholipase B	97-140 kDa	Oui	Bordure en brosse intestinale	0	[48]

^aPS: phosphatidylsérine; ^bPA: acide phosphatidique; RTVL: retrovirus-like element with histidine tRNA primer binding site.

RÉFÉRENCES

12. Lehman JJ, Brown KA, Ramanadham S, Turk J, Gross RW. Arachidonic acid release from aortic smooth muscle cells induced by [Arg⁸]vasopressin is largely mediated by calcium-independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1993; 268: 20713-6.
13. Ramanadham S, Gross R, Han X, Turk J. Inhibition of arachidonate release by secretagogue-stimulated pancreatic islets suppresses both insulin secretion and the rise in β -cell cytosolic calcium ion concentration. *Biochemistry* 1993; 32: 337-46.
14. Thomson FJ, Clark MA. Purification of a phosphatidic-acid-hydrolysing phospholipase A₂ from rat brain. *Biochem J* 199; 306: 305-9.
15. Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 203-10.
16. Hérold C, Elhabazi A, Bensussan A, Bounsell L. Implication des molécules « CD » dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T. *médecine/sciences* 1995; 11: 669-80.
17. Bartoli F, Lin HK, Ghomashi F, Gelb MH, Jain MK, Apitz-Castro R. Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A₂ but not 14-kDa phospholipase A₂ inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem* 1994; 269: 15625-30.
18. Ackermann EJ, Conde-Friboes K, Dennis EA. Inhibition of macrophage Ca²⁺-independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem* 1995; 270: 445-50.
19. Pernas P, Masliah J, Olivier JL, Salvat C, Rybkine T, Béréziat G. Type II phospholipase A₂ recombinant overexpression enhances stimulated arachidonic acid release. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 1298-305.
20. Barbour SE, Dennis EA. Antisense inhibition of group II phospholipase A₂ expression blocks the production of prostaglandin E₂ by P388D₁ cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 21875-82.
21. Murakami M, Kudo I, Inoue K. Eicosanoid generation from antigen-primed mast cells by extracellular mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂. *FEBS Lett* 1991; 294: 247-51.
- évident sur des modèles de cellules mésangiales, endothéliales ou musculaires lisses. Parmi les autres signaux réglant l'expression de la sPLA₂, signalons également l'AMPC (activateur), des facteurs de croissance (inhibiteurs) tels que le *transforming growth factor β* (TGF β) ou l'*insulin-like growth factor-1* (IGF1). Enfin, les effets négatifs des glucocorticoïdes pourraient contribuer à leur activité anti-inflammatoire. Les mécanismes réglant la transcription du gène de la sPLA₂ ont été particulièrement étudiés par l'équipe de Gilbert Béréziat, à Paris [5].
- Alors qu'aucune PLA₂ de type III n'a encore été identifiée chez les mammifères, la situation est en train de se compliquer par la découverte de nouvelles PLA₂ sécrétées [6, 7]. La plus curieuse est certainement la RTLH-H/PLA₂ [8], qui comporte, en aval d'une longue répétition terminale d'un rétrovirus endogène, deux motifs successifs homologues des PLA₂ sécrétées. Le gène codant pour cette protéine semble être transcrit dans des cellules de tétatocarcinomes, mais on ignore si la protéine correspondante exerce une activité phospholipasique.

PLA₂ intracellulaires

Elles sont dominées par la cPLA₂ (Tableau I). Cette protéine de 85 kDa, apparemment ubiquitaire, possède toutes les caractéristiques pressenties dans les études antérieures concernant les mécanismes de libération de l'acide arachidonique : sa très forte sélectivité pour les phospholipides contenant cet acide gras ; sa localisation cytosolique, qui la met au contact direct des mêmes phospholipides, concentrés dans le feuillet interne de la membrane [9] ; son activation par des concentrations μ M de Ca²⁺. Contrairement au cas des PLA₂ sécrétées, l'ion Ca²⁺ ne participe pas au fonctionnement du site actif, qui comporte une triade catalytique classique de sérine estérase, mais interagit avec un domaine retrouvé dans d'autres protéines de la signalisation cellulaire (phospholipase C- γ , protéine kinase C, *GTPase activating protein* ou GAP) et responsable de l'association de la protéine aux membranes. Comme pour la sPLA₂, la production constitutive de

cette enzyme peut être augmentée par des cytokines inflammatoires, dont l'effet est contrecarré par les glucocorticoïdes [10]. Cela suggère donc un rôle important de la cPLA₂ dans la production de médiateurs lipidiques au cours des phénomènes inflammatoires.

Ici encore, une grande complexité est en train d'apparaître avec l'identification d'autres PLA₂ intracellulaires dont la plupart des gènes qui les spécifient ne sont pas encore clonés (Tableau I). Nous retiendrons en particulier une PLA₂ de 40 kDa initialement purifiée du myocarde de diverses espèces, dont l'activité ne requiert pas de Ca²⁺ et se révèle maximale sur des éthers phospholipides (plasmalogènes) très abondants dans le cœur [11]. Cependant, des études récentes suggèrent un rôle important de cette enzyme, stimulée par l'ATP (vraisemblablement du fait de sa curieuse association à la phosphofructokinase 1), dans la libération d'acide arachidonique par les cellules musculaires lisses [12] ou dans la régulation de la sécrétion d'insuline [13]. Retenons également des enzymes sélectives de certains phospholipides telles que la phosphatidylsérine (Tableau I) ou l'acide phosphatidique [14]. Cette nouvelle PLA₂ identifiée dans le cerveau est particulièrement intéressante dans la mesure où elle serait responsable de la formation d'acide lysophosphatidique (LPA), nouveau médiateur phospholipidique dont des récepteurs spécifiques ont été récemment décrits dans le cerveau [15].

De cette situation complexe, encore en cours de défrichage, retenons que le domaine des PLA₂ est dominé à l'heure actuelle par la sPLA₂ et la cPLA₂. Cependant, beaucoup de questions se posent encore pour la première, alors qu'un large consensus semble être acquis sur la cPLA₂.

La double régulation de la cPLA₂ : un dogme en train de s'imposer

Nous avons vu que l'activité de la cPLA₂ est réglée par le Ca²⁺, qui permet l'association de la protéine aux membranes et donc son contact avec le substrat phospholipidique. Ce fait est largement admis à partir de nom-

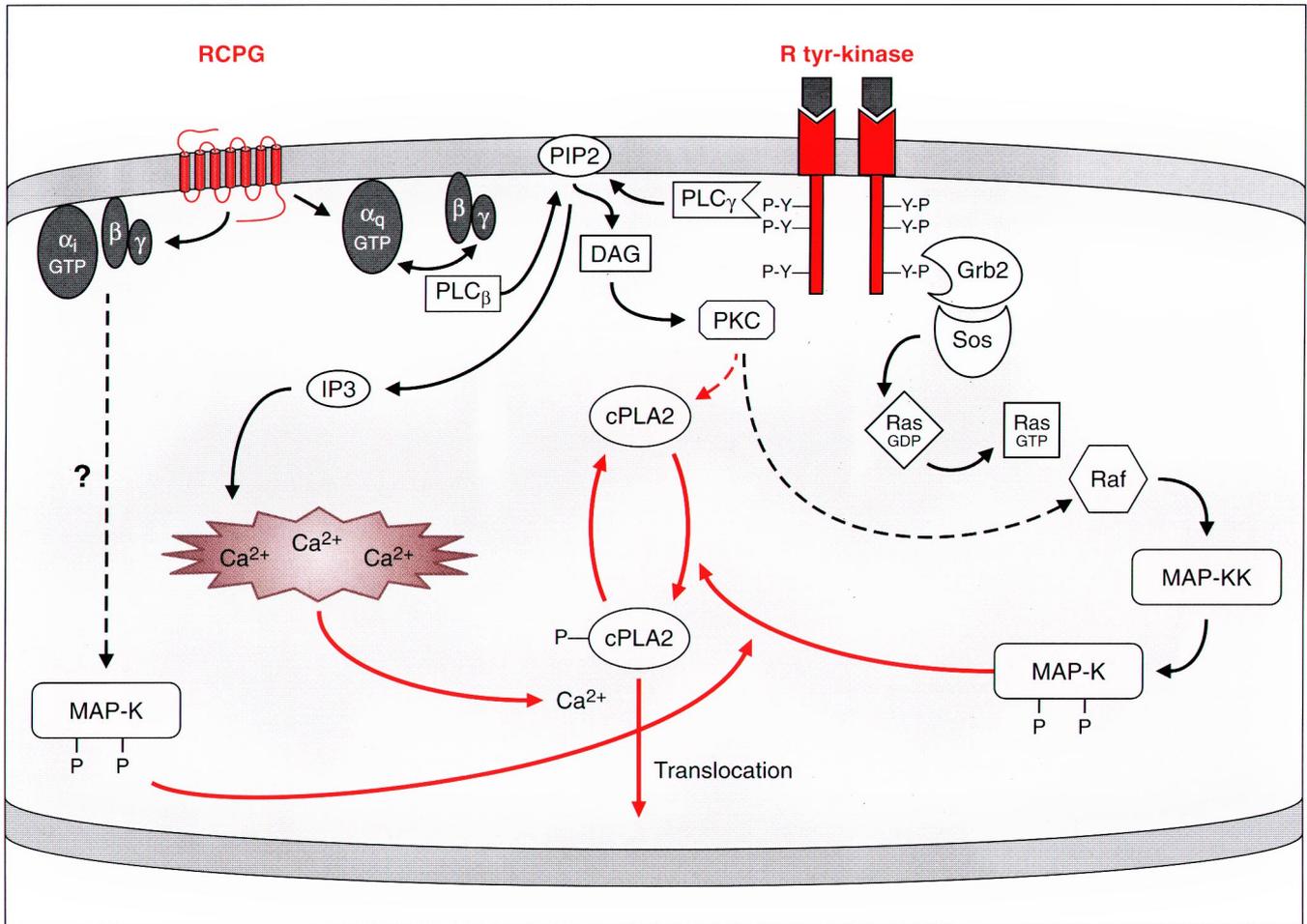


Figure 2. **La double régulation de la cPLA₂.** Dans la partie supérieure droite du schéma, un facteur de croissance (EGF, PDGF...) provoque la dimérisation de son récepteur et son autophosphorylation. Cela permet, d'une part, l'activation de la phospholipase C-γ (PLCγ), qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), provoquant la libération de Ca²⁺ à partir du réticulum sarco(endo)plasmique par l'intermédiaire de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). D'autre part, la MAP kinase (MAP-K) est mise en jeu à l'issue d'une cascade classique faisant intervenir Ras. La phosphorylation de la cPLA₂ augmente son activité, alors que l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ provoque son interaction avec les phospholipides membranaires (translocation). Dans la partie supérieure gauche du schéma, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) active la phospholipase C-β (PLCβ) par l'intermédiaire de Gq, alors que la mise en jeu de G_i induit la cascade des MAP-K par des mécanismes encore non élucidés. Enfin, la protéine kinase C, activée en aval des phospholipases C et également à l'origine de la mise en jeu des MAP-K, pourrait également phosphoryler directement la cPLA₂. D'autres mécanismes complémentaires de régulation sont également proposés, en particulier une interaction directe de protéines G hétérotrimériques avec la cPLA₂ [49-51]. DAG: diacylglycérol; Grb2: adaptateur à domaine SH2 et SH3; Sos: protéine d'échange (son of sevenless).

breux résultats démontrant un transfert (*translocation*) de la cPLA₂ du compartiment cytosolique aux membranes dans diverses cellules activées par des agonistes responsables d'une augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_i) et d'une libération d'acide arachidinique à partir des phospholipides membranaires [3].

Un deuxième volet de cette régula-

tion a été apporté par la mise en évidence d'une phosphorylation de la cPLA₂ par les *mitogen activated protein kinases* (MAP kinases) sur un résidu de sérine en position 505, avec pour conséquence une augmentation de l'activité de l'enzyme. Cette observation a été répétée dans de nombreux modèles cellulaires et donne lieu à des schémas de régulation tels que celui de la *figure 2*. A travers les

exemples présentés, on peut voir que ce double mécanisme de régulation s'intègre parfaitement à nos connaissances actuelles de signalisation cellulaire. On pourrait faire intervenir les mêmes mécanismes de régulation dans d'autres schémas tels que celui de l'activation des lymphocytes T [16].

Ce large consensus, intellectuellement très confortable, fait de la

RÉFÉRENCES

22. Fourcade O, Simon MF, Viodé C, Rugani N, Lebalte F, Ragab A, Fournié B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A_2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80: 919-27.
23. Emilie D, Russo-Marie F. Nouvelles perspectives des recherches sur la polyarthrite. *médecine/sciences* 1995; 11: 1577-80.
24. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A_2 , a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12: 143-6.
25. Wright GW, Ooi CE, Weiss J, Elsbach, P. Purification of a cellular (granulocyte) and an extracellular (serum) phospholipase A_2 that participates in the destruction of *Escherichia coli* in a rabbit inflammatory exudate. *J Biol Chem* 1990; 265: 6675-81.
26. Steiner MR, Bomalaski JS, Clark MA. Responses of purified phospholipases A_2 to phospholipase A_2 activating protein (PLAP) and melittin. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1166: 124-30.
27. Chap H, Zwaal RFA, van Deenen LLM. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim Biophys Acta* 1977; 467: 146-64.
28. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 1993; 294: 1-14.
29. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180: 1-8.
30. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson, PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; 149: 4029-35.

cPLA₂ la cible de choix pour cribler des séries de molécules potentiellement inhibitrices et éventuellement utilisables comme anti-inflammatoires. Certains outils ont ainsi vu le jour, tels que des dérivés fluorocétones de l'acide arachidonique, qui confirment, dans certains modèles tels que les plaquettes sanguines, le rôle majeur de la cPLA₂ [17]. Cependant, la spécificité de ces inhibiteurs pourrait être moins stricte qu'il n'y paraît, puisqu'ils inhibent aussi les PLA₂ indépendantes du Ca²⁺ [18]. Par ailleurs, d'autres études de biologie cellulaire continuent d'attribuer une place complémentaire à la sPLA₂ dans les mécanismes de libération de l'acide arachidonique et sont renforcées par des observations pathologiques qui justifient un intérêt renouvelé pour l'enzyme sécrétée.

La sPLA₂ : des modifications pathologiques majeures et de grandes questions physiopathologiques

Diverses études *in vitro* apportent un certain nombre d'arguments en faveur d'une implication de la sPLA₂ dans les mécanismes de libération de l'acide arachidonique. Ces travaux reposent sur la surexpression de l'enzyme dans des modèles cellulaires [19], l'utilisation d'oligonucléotides antisens [20] ou l'ajout de sPLA₂ recombinante à des cellules stimulées [21]. Cependant, des arguments contraires sont obtenus en fonction des modèles cellulaires utilisés (pour une information plus complète, voir les revues générales [2-4] ou les références citées dans [22]). Par ailleurs, de nombreuses données pathologiques décrivent une accumulation importante de sPLA₂ dans les exsudats inflammatoires (par exemple au cours de la polyarthrite rhumatoïde [23]) ou dans le plasma de sujets souffrant de choc septique [4]. Des études en cours dans notre laboratoire, en collaboration avec des services de réanimation et d'infectiologie, démontrent que le taux de sPLA₂ et surtout son évolution constituent un bon facteur pronostique dans les chocs septiques ou le SIDA en phase terminale. On peut dès lors se demander si la sPLA₂ surexprimée

sous l'effet de cytokines inflammatoires (TNF α en particulier) participe directement ou non aux troubles pathologiques létaux qui surviennent dans ces conditions.

Pruzanski et Vadas [24] proposent une hypothèse, présentée dans la figure 3, dans laquelle la sPLA₂ apparaît comme un effecteur distal de l'inflammation, finalement responsable de la production de médiateurs lipidiques. Cependant, le problème est d'identifier sur quel substrat la sPLA₂ est capable d'agir. En effet, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la sPLA₂ n'exerce des effets pro-inflammatoires ou cellulaires (augmentation de la synthèse de prostaglandines, par exemple) qu'en présence d'autres agents « perturbants » [3]. Il peut s'agir d'une réaction inflammatoire déjà engagée ou d'agonistes cellulaires tels qu'un ester de phorbol, un ionophore calcique, un antigène spécifique d'immunoglobulines E (cas de mastocytes) ou le TNF α [3, 4].

Le même problème se pose d'ailleurs pour les phospholipides des membranes bactériennes, considérés comme un substrat physiologique de la sPLA₂, qui apparaît ainsi comme une défensine. En effet, les membranes d'*Escherichia coli*, par exemple, ne sont accessibles à la sPLA₂ que si les bactéries sont préalablement autoclavées ou soumises à l'action conjointe de toxines sécrétées par les neutrophiles, telles que la protéine BPI (*bactericidal permeability increasing protein*) [25]. De tels cofacteurs pourraient favoriser l'action de la sPLA₂ sur des cellules eucaryotes. Ainsi, la PLAP (*PLA₂ activating protein*), dont le gène a été cloné en 1991 et qui a été identifiée par son homologie avec la mélittine (un peptide de venin d'abeille), semblerait être spécifique de la sPLA₂ [26]. Cependant, des facteurs intrinsèques aux membranes cellulaires pourraient également être impliqués. Tel est le cas de l'asymétrie phospholipidique.

L'asymétrie phospholipidique pourrait moduler l'activité de la sPLA₂

Une caractéristique de la sPLA₂ est sa préférence pour les phosphatidylé-

RÉFÉRENCES

31. Smeets EF, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA. Calcium-induced scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1195: 281-6.
32. Bassé F, Gaffet P, Rendu F, Bienvenüe A. Translocation of spin-labeled phospholipids through plasma membrane during thrombin- and ionophore A23187-induced platelet activation. *Biochemistry* 1993; 32: 2337-44.
33. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 1994; 269: 3125-8.
34. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; 153: 3245-55.
35. Billah MM, Anthes JC. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 1990; 269: 281-91.
36. Murakami M, Kudo I, Fujimori Y, Suga H, Inoue K. Group II phospholipase A_2 inhibitors suppressed lysophosphatidylserine-dependent degranulation of rat peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 714-21.
37. Locher R, Weisser B, Mengden T, Brunner C, Vetter W. Lysolecithin actions on vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 156-62.
38. Rothhut B, Russo-Marie F. Les lipocortines. *médecine/sciences* 1987; 3: 282-7.
39. Kim KM, Kim DK, Park YM, Kim CK, Na DS. Annexin-I inhibits phospholipase A_2 by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS Lett* 1994; 343: 251-5.
40. Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197: 63-93.
41. Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, Lazdunski M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipase A_2 . *J Biol Chem* 1994; 269: 1575-8.

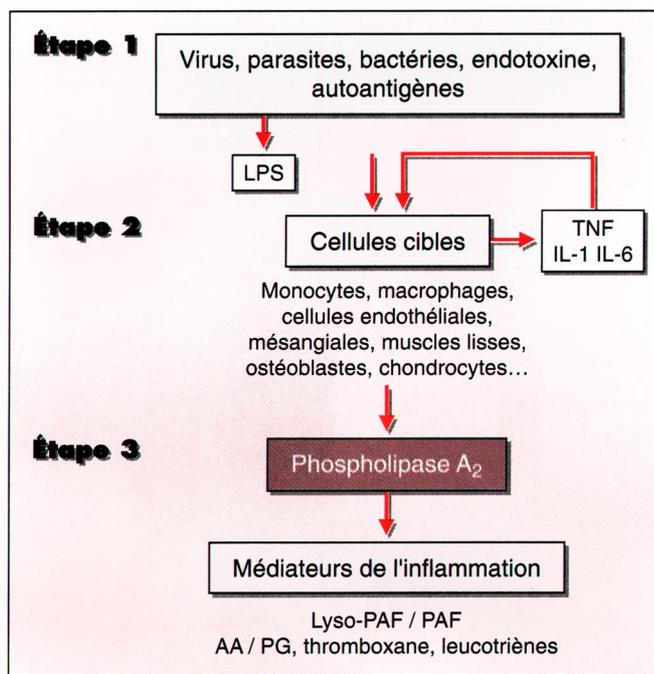


Figure 3. Rôle postulé de la $sPLA_2$ dans la réaction inflammatoire. LPS: lipopolysaccharide bactérien; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukine; PAF: platelet activating factor; AA: acide arachidonique; PG: prostaglandine. (D'après [24]).

thanolamines et les phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine ou le phosphatidylglycérol (abondant dans les membranes bactériennes). En revanche, l'enzyme est peu active sur les phosphatidylcholines. Il nous a paru intéressant de reconsidérer ces données en terme d'asymétrie phospholipidique, que nous avons décrite dans les plaquettes à la fin des années 1970 [9, 27]. En effet, le feuillet externe des membranes plasmiques est formé essentiellement de phospholipides à choline (sphingomyélines et phosphatidylcholines), alors que les meilleurs substrats de la $sPLA_2$ sont confinés dans le feuillet interne des membranes.

De nouvelles données sont apparues dans le domaine de l'asymétrie phospholipidique, actuellement reconnue comme une caractéristique générale des cellules eucaryotes (pour une revue récente, voir [28]). On sait, en particulier, que le maintien de cette asymétrie est largement assuré par une aminophospholipide translocase ou *flippase* découverte par l'équipe de Philippe Devaux (Institut de Biologie

Physico-Chimique, Paris), dont le gène n'a pas encore été cloné, mais qui possède les caractéristiques d'une ATPase membranaire. Par ailleurs, dans certaines conditions, on peut observer une perte brutale de cette asymétrie. Parmi les exemples les mieux connus, on peut citer les plaquettes traitées simultanément par la thrombine et le collagène [29], les cellules endothéliales et les plaquettes soumises à l'action de perforines (complexe d'attaque membranaire du complément, par exemple) [29], ou encore les cellules en apoptose [30]. D'une façon générale, les mécanismes mis en jeu impliquent une forte augmentation de la concentration en Ca^{2+} du cytoplasme et la perte d'asymétrie peut ainsi être induite dans des érythrocytes traités par l'ionophore calcique A23187. Malgré une discussion sémantique concernant l'implication soit d'une *scramblase* [31] soit d'une *flopase* [32], il semble que l'événement initial de ces pertes d'asymétrie soit un flux vectoriel rapide des phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe, compensé ultérieu-

RÉFÉRENCES

42. Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino KI, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A_2 receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 5897-904.

43. MacPhee M, Chepenik KP, Liddell RA, Nelson KK, Sirasuca LD, Buchberg AM. The secretory phospholipase A_2 gene is a candidate for the *Mom1* locus, a major modifier of *APC^{Mm}*-induced intestinal neoplasia. *Cell* 1995; 81: 957-66.

44. Mulherkar R, Rao R, Rao L, Patki V, Chauhan VS, Deo MG. Enhancing factor protein from mouse small intestines belongs to the phospholipase A_2 family. *FEBS Lett* 1993; 317: 263-6.

45. Verger R, Ferrato F, Mansbach CM, Pieroni G. Novel intestinal phospholipase A_2 : purification and some molecular characteristics. *Biochemistry* 1982; 21: 6883-9.

46. Senegas-Balas F, Balas D, Verger R, de Caro A, Figarella C, Ferrato F, Lechene P, Bertrand C, Ribet A. Immunohistochemical localization of intestinal phospholipase A_2 in Paneth cells. *Histochemistry* 1984; 81: 581-4.

47. Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA. Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase A_2 from macrophage-like P388D₁ cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 1994; 269: 9227-33.

48. Gassama-Diagne A, Fauvel J, Chap H. Purification of a new, calcium-independent, high molecular weight phospholipase A_2 /lysophospholipase (phospholipase B) from guinea pig intestinal brush-border membrane. *J Biol Chem* 1989; 264: 9470-5.

49. Jelsema CL, Axelrod J. Stimulation of phospholipase A_2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunits of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3623-7.

50. Xing M, Mattera R. Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase A_2 by G-proteins and Ca^{2+} in HL60 granulocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 25966-75.

51. Winitz S, Gupta SK, Qian NX, Hoesley LE, Nemenoff RA, Johnson GL. Expression of a mutant $G_{\beta\gamma}$ subunit inhibits ATP and thrombin stimulation of cytoplasmic phospholipase A_2 -mediated arachidonic acid release independent of Ca^{2+} and mitogen-activated protein kinase regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 1889-95.

rement par une équilibration entre les deux feuilletts. Comme l'indique la figure 4, l'excès de phospholipides dans le feuillet externe est responsable d'une évagination de la membrane, qui s'adapte ainsi à la dissymétrie de surface des deux demi-couches lipidiques et conduit à l'émission de microvésicules (ectocytose). Ces microvésicules conservent leur distribution transverse altérée, alors que l'aminophospholipide translocase rétablit l'asymétrie membranaire initiale dans les cellules [29].

L'un des résultats majeurs de notre récent travail a été de démontrer que les microvésicules émises par des érythrocytes traités par l'ionophore calcique A23187 deviennent de bons substrats de la sPLA₂, contrairement à la cellule intacte, qui est résistante à

l'enzyme [22]. Il est vraisemblable que le même phénomène intervient dans les corps cellulaires restants, mais pour un temps plus limité, du fait de la récupération d'asymétrie membranaire.

Nous n'insisterons pas ici sur un autre point de l'étude, dans lequel nous démontrons que la sphingomyélinase favorise l'action de la sPLA₂ sur ces microvésicules. Cet aspect est néanmoins intéressant, dans la mesure où vient d'être établie une nouvelle voie de signalisation utilisée par le TNF α , l'IL-1 ou l'interféron- γ , dans laquelle est activée une sphingomyélinase endogène. Celle-ci pourrait donc avoir les mêmes effets stimulants sur la sPLA₂, en parallèle à la production du nouveau second messenger lipidique que représentent les céramides [33].

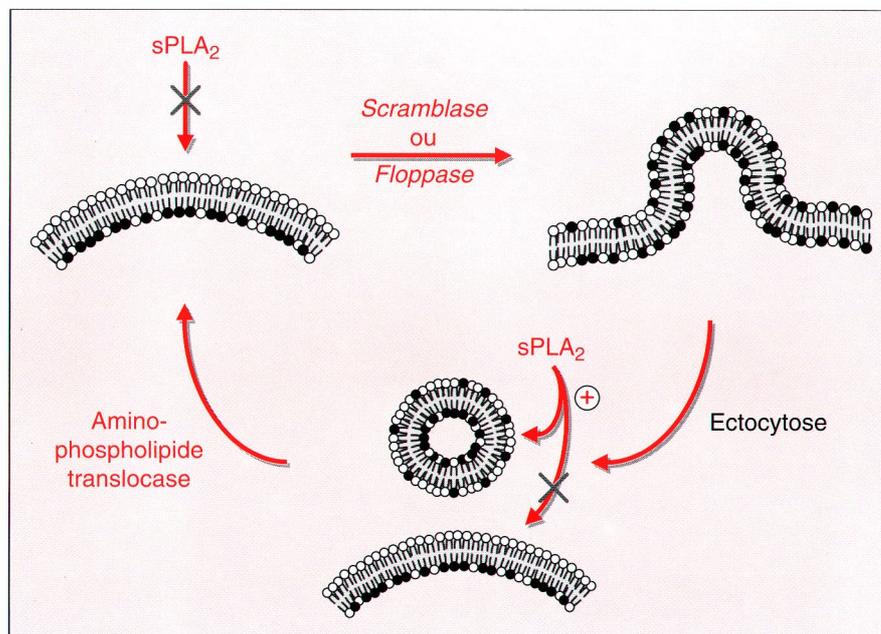


Figure 4. **Régulation de l'activité de la sPLA₂ par la distribution transverse des phospholipides membranaires.** En haut à gauche, la sPLA₂ est inactive vis-à-vis des phospholipides du feuillet externe, symbolisés avec des têtes polaires claires. Lors d'une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule, des phospholipides du feuillet interne, symbolisés avec des têtes polaires foncées, sont transférés massivement sur le feuillet externe. L'expansion de celui-ci aux dépens du feuillet interne est responsable d'une évagination qui se solde par l'émission d'une microvésicule ayant perdu son asymétrie phospholipidique et sur laquelle la sPLA₂ peut alors agir. L'altération de l'asymétrie membranaire est réversible dans le cas des cellules grâce à l'action de l'aminophospholipide translocase ou flippase.

sPLA₂ et acide lysophosphatidique

Un autre intérêt du modèle expérimental utilisé est que l'ionophore calcique active dans l'érythrocyte une phospholipase C. Celle-ci hydrolyse les phosphoinositides, conduisant à la formation de diacylglycérol, converti en acide phosphatidique (PA) par une kinase spécifique (figure 5). Ces événements ont lieu sur le versant cytoplasmique de la membrane, mais apparemment le PA est lui aussi transféré en partie sur le feuillet externe, où il peut être hydrolysé en acide lysophosphatidique (LPA) [22]. Comme nous l'avons schématisé dans la figure 5, cela nous a donc conduits à proposer une hypothèse de production de ce nouveau médiateur phospholipi-

dique pour lequel ont été décrites de multiples activités biologiques (activation des plaquettes, effets vasomoteurs, stimulation de la prolifération cellulaire ou de l'envahissement tumoral...) [15]. Il s'agit d'un domaine en plein développement dans lequel les inconnues restent l'origine métabolique de ce phospholipide présent dans le sérum ainsi que la nature de son récepteur. Cependant, diverses études indiquent qu'il pourrait s'agir d'un récepteur à sept segments transmembranaires couplé à des protéines G hétérotrimériques.

La formation de LPA n'est certainement pas la seule exclusivité de la sPLA₂ et nous avons mentionné plus haut l'existence, dans le cerveau, d'une PLA₂ insensible au calcium et spécifique du PA [14]. Mais les ques-

tions essentielles posées par nos travaux concernent la signification physiologique (ou physiopathologique) de ces observations.

L'action de la sPLA₂ sur des microvésicules et sa signification physiologique

Remarquons d'abord que la démonstration d'un tel effet de la sPLA₂ sur des microvésicules apporte une nouvelle signification physiologique au phénomène de perte d'asymétrie phospholipidique. En effet, celui-ci avait jusqu'à présent retenu l'attention pour ses conséquences sur l'hémostase (les phosphatidylsérines ainsi exposées deviennent de puissants activateurs de la coagulation [29]) et sur la reconnaissance par des macrophages de cellules ou vésicules sénescents ou apoptotiques (voir par exemple [30]).

Dès lors, on peut s'interroger sur la possibilité d'une accumulation simultanée de vésicules et de sPLA₂. Un travail récent de l'équipe de Jean-Marie Freyssinet, à Strasbourg, décrit la formation de vésicules à partir de monocytes stimulés par le lipopolysaccharide, composé actif de l'endotoxine d'*E. coli*, bien connu pour ses effets inducteurs de TNF α , IL-1 et, secondairement, sPLA₂ [34]. Par ailleurs, nous avons nous-mêmes démontré la présence conjointe de microvésicules et de sPLA₂ dans le liquide articulaire de malades souffrant de polyarthrite rhumatoïde [22]. Cependant, nous n'avons pas été capables pour l'instant de mettre en évidence l'accumulation de LPA dans ces liquides inflammatoires et des travaux sont en cours sur des plasmas de chocs septiques.

Conclusions et perspectives

Il est donc évident que notre travail, qui ouvre une voie nouvelle dans la compréhension du rôle possible de la sPLA₂, demande à être complété par des études *in vivo* capables d'accumuler des arguments confortant ou non notre hypothèse. Celles-ci devront s'attacher, en particulier dans des plasmas de chocs septiques

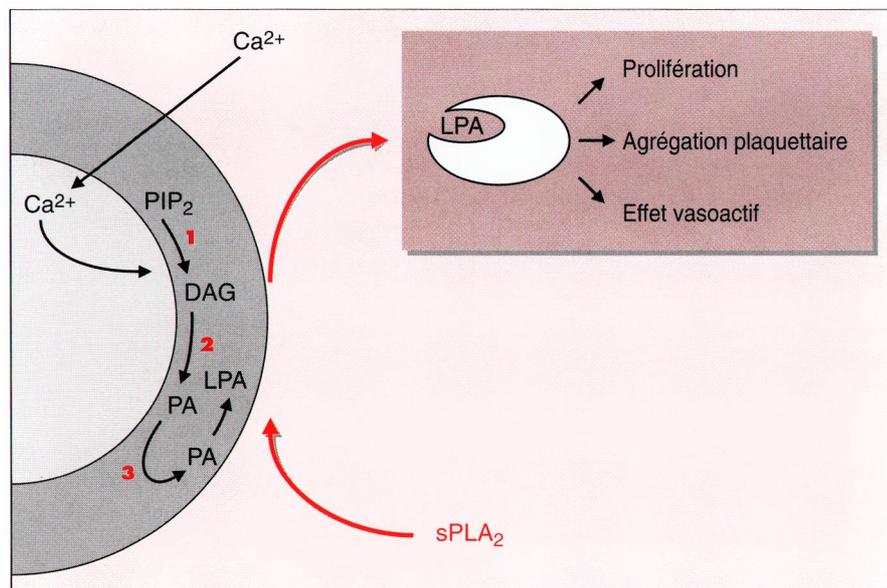


Figure 5. Mécanisme de formation de l'acide lysophosphatidique sous l'action de la sPLA₂. L'entrée de Ca²⁺ dans les cellules stimule la phospholipase C (réaction 1), qui produit à partir de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) du diacylglycérol (DAG), converti en acide phosphatidique (PA) par la DAG kinase (réaction 2). Le PA est transféré sur le feuillet externe (dans les cellules ou dans les microvésicules décrites dans la figure 4), il est alors converti par la sPLA₂ en acide lysophosphatidique (LPA). Celui-ci est capté par l'albumine et peut diffuser pour exercer ses effets biologiques.

ou divers exsudats inflammatoires, à rechercher la présence simultanée de sPLA₂, microvésicules et LPA. Des modèles animaux tels que des souris transgéniques n'exprimant pas ou exprimant fortement le gène codant pour la sPLA₂ pourraient également se révéler très précieux. Cela n'exclut pas d'explorer divers modèles cellulaires *in vitro*, de manière à préciser les conditions de stimulation (cytokines, protéines du complément, toxines bactériennes...) conduisant à des phénomènes semblables à ceux que nous avons observés sur le modèle quelque peu artificiel d'érythrocytes chargés en calcium. Ces études devraient également permettre de rechercher une dégradation d'acides phosphatidiques produits dans d'autres voies de signalisation, telles que la phospholipase D [35].

D'autre part, même si le LPA est en train de devenir un sujet passionnant, dont la prochaine étape sera vraisemblablement le clonage du (des?) gène(s) codant pour le(s) récepteur(s), il ne faut pas oublier que l'action de la sPLA₂ doit conduire à la formation d'autres composés actifs tels que les dérivés d'acide arachidonique, le PAF-acéther, voire d'autres lysophospholipides « plus communs » pour lesquels sont décrites certaines activités biologiques [36, 37].

Une autre conséquence de notre travail est qu'il est susceptible de relancer l'intérêt pour les annexines ou lipocortines, considérées au départ comme des inhibiteurs spécifiques de PLA₂ [38]. Bien qu'un travail récent propose une interaction spécifique entre l'annexine I et la cPLA₂ [39], l'inhibition des PLA₂ sécrétées semble reposer sur une interaction des annexines avec les phospholipides anioniques, conduisant au masquage du substrat de la PLA₂ [40]. On peut donc concevoir que les annexines libérées dans des liquides inflammatoires puissent inhiber l'effet de la sPLA₂ sur des microvésicules tout en supprimant également leur activité procoagulante. Enfin, si nous avons mis l'accent sur l'importance de l'asymétrie phospholipidique dans la régulation de la sPLA₂, il ne faut pas oublier le rôle possible de cofacteurs éventuels de l'enzyme tels que la PLAP (*PLA2 activating protein*) évoquée plus haut.

Il nous est difficile de terminer cette revue sans évoquer la découverte, par l'équipe de Michel Lazdunski, à Nice, parallèlement au groupe d'Arita, au Japon, d'un récepteur de PLA₂ sécrétées [41, 42]. Curieusement, cette protéine à un seul segment transmembranaire s'apparente à un récepteur de mannose et participe à l'internalisation de la sPLA₂. Dans la mesure où cette dernière interagit sélectivement avec des microvésicules membranaires, il serait donc intéressant de tester si le récepteur de sPLA₂ ne pourrait pas contribuer à l'élimination de ces microvésicules.

Dernière minute : la sPLA₂ serait un facteur de protection contre le cancer du côlon

Au moment de terminer la rédaction de cette revue, nous prenons connaissance d'un article passionnant paru dans *Cell*, qui propose de très solides arguments en faveur de l'identité du gène codant pour la sPLA₂ avec le locus *Mom1* (*modifier of min 1*) [43]. Ce gène réduit considérablement le nombre de tumeurs intestinales apparaissant spontanément chez des souris porteuses de la mutation *min* (*multiple intestinal neoplasia*), qui touche l'homologue du gène *APC* humain (*adenomatous polyposis coli*). Pour expliquer le rôle protecteur de la sPLA₂, les auteurs envisagent, parmi d'autres hypothèses, que la sPLA₂ pourrait être impliquée dans la destruction sélective des cellules tumorales, qui perdent leur asymétrie phospholipidique. Cela conforte notre conviction de l'importance de la distribution transverse des phospholipides membranaires dans la régulation de l'activité de la sPLA₂. Ces données relancent également l'intérêt pour la sPLA₂ intestinale, produite par les cellules de Paneth, et récemment identifiée à l'*enhancing factor*, qui augmente la liaison de l'EGF (*epidermal growth factor*) à son récepteur [44]. Il s'agit en fait d'une redécouverte de l'enzyme, onze ans après les travaux de Robert Verger et Gérard Pieroni, à Marseille, en collaboration avec Françoise et Daniel Balas, dans l'Unité Inserm 151 alors dirigée par André Ribet, à Toulouse [45, 46] ■

Summary

Phospholipases A₂ and inflammatory pathology: consensus and new concepts

Besides their digestive or metabolic functions, phospholipases A₂ (PLA₂) are essentially known for their role in the synthesis of lipid mediators, which requires the liberation of various precursors such as arachidonic acid. In the last past years, a number of enzymes have been characterized, among which cytosolic PLA₂ (cPLA₂) and type II PLA₂, also called « secretory » PLA₂ or sPLA₂. Whereas there is a consensus about the role and regulation of cPLA₂, the real function of sPLA₂, which is produced in response to inflammatory stimuli, still remains largely unknown. A recent study proposes that sPLA₂ could act on microvesicles shed from activated cells after loss of phospholipid asymmetry. Among phospholipids then becoming accessible to this extracellular enzyme, phosphatidic acid, which is produced via two main signalling pathways, thus appears as a potential precursor of lysophosphatidic acid, a novel phospholipid mediator with diverse biological activities. Together with the discovery of a receptor for secreted PLA₂, these new data open interesting issues in various fields of pathophysiology and pharmacology.

TIRÉS À PART

H. Chap.