

50376
1981
174

50376
1981
174

N° d'ordre 109

THESE PRESENTEE
pour l'obtention du titre
de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

à

L'Université des Sciences et Techniques de Lille -
- Villeneuve d'Ascq -

par Monsieur Alain VERCAMMEN-GRANDJEAN.

Sujet de la thèse :



LE ROLE MODULATEUR DU MACROPHAGE PERITONEAL DE LA SOURIS
DANS LES METABOLISMES DES CELLULES TUMORALES DE MELANOME IN VITRO.

soutenue le 16/6/1981 devant la commission composée de :

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL	Président
Monsieur le Professeur A. CAPRON	Examineur
Monsieur le Professeur J.P. DESSAINT	Examineur
Madame le Professeur G. SPIK	Examineur
Monsieur le Professeur J. URBAIN	Examineur
Monsieur le Professeur F.J. LEJEUNE	Examineur

et Directeur du travail

Cette thèse est dédiée au très regretté Professeur Gillo
qui fut pour moi un maître et un ami.

A ma femme, mon fils, mes parents, mes frères et soeurs,
mon cousin, mes amis.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur A. Gérard, Chef du Service de Chirurgie de l'Institut Bordet, de son hospitalité et de m'avoir permis d'effectuer ce travail en son service.

Que le Docteur F.J. Lejeune, Directeur du Laboratoire d'Oncologie et de Chirurgie Expérimentale, veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli, m'avoir dirigé avec patience et m'avoir fait bénéficier de ses nombreux et judicieux conseils à quelque moment que ce soit de sa vie de chercheur et de clinicien passionné.

Nous exprimons toute notre reconnaissance au Professeur J. Montreuil du Département de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille et Président du Jury, de nous avoir accordé sa confiance, son aide et ses conseils éclairés pour l'élaboration de cette thèse.

Nous sommes très sensibles à l'honneur qui nous a été fait par Monsieur le Professeur A. Capron et Monsieur le Professeur J.P. Dessaint de l'Institut Pasteur de Lille, Madame le Professeur G. Spik du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de Lille et Monsieur le Professeur J. Urbain du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université Libre de Bruxelles à Rhodes-St-Genèse pour l'intérêt qu'ils portent à notre travail.

Que toutes les personnes qui ont contribué à faciliter la réalisation du travail soient remerciées :

L'équipe du Docteur F.J. Lejeune et en particulier Monsieur R. Arnould et Mademoiselle A. Libert pour leur aide précieuse, leurs conseils et encouragements.

Le Docteur G. Atassi, Directeur du Laboratoire de Chimiothérapie Expérimentale et Screening de l'Institut Bordet, pour son aide matérielle.

Le Professeur Dumont, Directeur de l'Institut de Recherches Interdisciplinaires en Biologie Humaine et Nucléaire, pour l'utilisation des compteurs de radioactivité, ainsi que Monsieur D. Martins.

Mademoiselle M. Joarlette pour la dactylographie.

Monsieur Fauconnier pour l'exécution des dessins.

Messieurs A. Demeire, W. Baeten et K. Notaerts pour la photographie.

LE ROLE MODULATEUR DU MACROPHAGE PERITONEAL DE LA SOURIS DANS LES METABOLISMES DES CELLULES TUMORALES DE MELANOME IN VITRO.

Résumé

La présence de nombreux macrophages normaux au sein des tumeurs solides comme le mélanome et leur rôle démontré d'effecteurs de la réaction immune contre ces tumeurs nous ont incités à étudier les mécanismes impliqués dans les effets antitumoraux des macrophages. Dans l'action antitumorale de l'hôte et en particulier chez l'homme, peu d'éléments immunologiques spécifiques entrent en jeu. La raison en est que la tumeur n'est pas reconnue comme "non soi". Son expression néoantigénique est soit inexistante, soit masquée par d'autres déterminants antigéniques, soit excessivement faible.

Peu de travaux convaincants ont montré les capacités spécifiques des effecteurs tels les lymphocytes et les macrophages vis-à-vis des tumeurs, alors que parallèlement des travaux récents établissent de plus en plus le rôle, non spécifique au sens immunologique, de cellules effectrices telles que les macrophages et les cellules NK dans la défense de l'hôte contre sa tumeur.

Ce travail a ainsi surtout porté sur l'action non spécifique des macrophages sur les cellules tumorales in vitro. La focalisation s'est faite sur l'étude de deux paramètres : 1) La cytolyse qui est la capacité pour un effecteur de lyser des cellules cibles et 2) la cytotase qui est la capacité d'inhiber la croissance et les métabolismes de base de ces cellules.

Les effecteurs peuvent être de plusieurs ordres : physiques, chimiques, biochimiques, immunologiques, hormonaux, radiologiques et cellulaires.

L'effecteur cellulaire est le plus complexe car il peut agir au moyen de divers médiateurs et qui sont mal connus à ce jour. La cytolyse a été étudiée par le test au relargage au chrome après miniaturisation et standardisation de la méthode. Le nombre d'effecteurs étant très important, nous avons développé et standardisé un système en microculture de cellules permettant d'étudier un paramètre plus discret de la cytotoxicité, la cytostase. Cette méthode nous a permis de déceler in vitro sur des cellules tumorales et autres, de fines perturbations des métabolismes des cellules cibles grâce à l'utilisation des précurseurs radioactifs.

La mise au point a été effectuée en comparant les effets de divers agents perturbant la réponse du système. Nous avons pu mettre en évidence l'effet toxique de plusieurs drogues en concentration et temps, l'effet des irradiations et l'effet des sécrétions de macrophages sur l'incorporation des précurseurs des synthèses pyrimidiques. L'utilisation du 5FU comme amplificateur et modulateur de la réponse nous a permis de déjouer les artéfacts souvent difficiles à débusquer et notamment celui de dilution isotopique. La mise en évidence d'un des facteurs cytostatiques sécrétés par les macrophages nous a conduit à explorer le phénomène. Nous avons pu démontrer que le macrophage produit une quantité très importante de thymidine. Ceci est dû au fait que le macrophage est déficient en activité de thymidine kinase. Il ne peut phosphoryler la thymidine en TMP, TDP et TTP et donc synthétiser du DNA. Les macrophages sont des cellules terminales. L'absence de TTP empêche la rétroinhibition de la ribonucléotide réductase et donc de la synthèse de thymidine, cette synthèse n'est donc plus régulée. Le pool endogène du macrophage devient énorme et le trop plein est relargué dans le milieu de culture.

Alors que les macrophages normaux peuvent produire des substances capables d'affecter les métabolismes des cellules tumorales, les macrophages activés par divers immunoadjuvants tels le BCG, le *Corynebacterium Parvum* et le glucan peuvent montrer d'autres propriétés effectrices. La cytotoxicité de ces cellules activées est augmentée et détectable dans un test de cytolyse avec un nombre d'effecteurs cellulaires inférieur. L'adjonction d'un adjuvant de la cytolyse tel le lysozyme amplifie encore le phénomène.

La fin du travail concerne l'activation des macrophages par le glucan et l'interférence sur ce processus d'un serum antimacrophage dont nous avons déterminé le titre et la spécificité.

L'interaction des cellules immunocompétentes et des cellules tumorales n'est pas facile à cerner, le nombre des paramètres étant fort important. Il n'empêche que ces phénomènes doivent être étudiés en profondeur si l'on veut espérer agir sur les leviers oncoimmunologiques et aboutir à un certain degré de réussite en immunothérapie des tumeurs.

I

PLAN

- I. PLAN.
- II. AVANT PROPOS.
- III. INTRODUCTION ET RAPPEL HISTORIQUE.
 - 3.1. LE MACROPHAGE ET LE SYSTEME IMMUN.
 - 3.2. ORIGINE ET METABOLISME DU MACROPHAGE ET SON ROLE BIOLOGIQUE.
 - 3.3. LE MACROPHAGE ET LES TUMEURS.
 - 3.4. L'ACTION SPECIFIQUE ET NON SPECIFIQUE DES MACROPHAGES SUR LES CIBLES CELLULAIRES.
 - 3.5. L'ACTIVATION DU MACROPHAGE.
 - 3.6. L'INTERACTION DU MACROPHAGE ET DES LYMPHOCYTES DANS LA REponse IMMUNE ET LEURS MODULATIONS RECIPROQUES.
 - 3.7. BUT DU TRAVAIL.
- IV. ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DU MACROPHAGE SUR DES CELLULES TUMORALES IN VITRO.
 - 4.1. INTRODUCTION.
 - 4.1.1. La cytololyse.
 - 4.1.2. Les paramètres de la cytololyse due au macrophage.
 - 4.2. MATERIEL ET METHODES.
 - 4.2.1. Mesure de la cytololyse par le test de relargage du ^{51}Cr .
 - 4.2.2. L'activation des macrophages.
 - 4.2.2.1. In vivo.
 - 4.2.2.2. In vitro.
 - 4.2.2.3. Test d'incorporation de $^3\text{HTdR}$.
 - 4.3. RESULTATS.
 - 4.3.1. Effet de divers effecteurs cytotoxiques sur le relargage du ^{51}Cr .
 - 4.3.2. Effet du rapport cellules effectrices / cellules cibles.
 - 4.3.3. Comparaison de la cytololyse et de la cytotase.
 - 4.3.4. Discussion.

V. ETUDES, IN VITRO, DES METABOLISMES CELLULAIRES EN MICROMETHODES
MISE EN EVIDENCE DES FACTEURS CYTOSTATIQUES SECRETES PAR LES
MACROPHAGES.

5.1. INTRODUCTION.

5.2. MATERIEL ET METHODES.

5.2.1. Les animaux.

5.2.2. Les cellules.

5.2.2.1. Les macrophages.

5.2.2.2. Les lignées de macrophages transformés.

5.2.2.3. Les lignées de cellules tumorales.

5.2.2.4. Cellules tumorales.

5.2.2.5. Cellules normales.

5.2.2.6. Extraction des macrophages.

5.2.3. Les milieux de culture utilisés.

5.2.4. Les produits chimiques et radiochimiques.

5.2.5. Matériel de culture.

5.2.6. Les cultures de cellules.

5.2.7. Trypsinisation des cellules.

5.2.8. Comptage des cellules.

5.2.9. Les microcultures en plaques de micropuits.

5.2.10. Méthode spectroscopique au bleu de méthylène.

5.2.11. Incorporation des précurseurs métaboliques marqués

5.2.12. Extraction de l'activité incorporée par les
cellules.

5.2.13. Standardisation des courbes de croissance et des
réponses métaboliques des cellules in vitro.

5.3. RESULTATS.

5.3.1. Les microcultures.

5.3.2. Réponse du système à divers agents modulateurs des
incorporations.

5.3.3. Etalonnage de la courbe d'inhibition par la
thymidine.

5.3.4. Effet des sécrétions de macrophages sur l'incorporation
des précurseurs des métabolismes du DNA des
cellules tumorales in vitro.

5.3.5. Réversibilité de l'effet de la thymidine froide et
des surnageants de macrophages sur l'incorporation
de précurseurs marqués.

5.4. DISCUSSION.

VI. SYNTHÈSE ET RÉGULATION DES NUCLEOSIDES PYRIMIDIQUES DANS LES MACROPHAGES NORMAUX ET TRANSFORMÉS.

6.1. INTRODUCTION.

6.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

6.2.1. Les cellules.

6.2.2. Production de milieux conditionnés par les macrophages et les cellules tumorales.

6.2.3. Le biotest en microculture des surnageants cellulaires.

6.2.4. Chromatographie en couche mince de surnageants de macrophages normaux et transformés.

6.2.5. Incorporation de $^3\text{HTdR}$ par des macrophages normaux et transformés.

6.2.6. Chromatographie en couche mince des surnageants de cellules ayant incorporé le précurseur de la thymidine, l'acide 6- ^{14}C orotique.

6.2.7. Chromatographie sur papier ascendante de surnageant de macrophages normaux incubés avec $^3\text{HTMP}$. Séparation des nucléosides et nucléotides.

6.2.8. Test de la thymidine kinase dans les macrophages normaux et transformés et dans les cellules tumorales.

6.3. RESULTATS.

6.3.1. Modulation de l'incorporation de thymidine tritiée $^3\text{HTdR}$ dans les cellules de mélanome par les milieux conditionnés.

6.3.2. Inhibition de la croissance cellulaire par la TdR.

6.3.3. Les macrophages péritonéaux de souris sécrètent de la thymidine in vitro alors que les macrophages transformés ne le font pas.

6.3.4. Incorporation de $^3\text{HTdR}$ par les macrophages normaux et transformés.

6.3.5. Synthèse de thymidine par les macrophages péritonéaux.

6.3.6. Test de la thymidine kinase dans les macrophages normaux et transformés.

6.4. DISCUSSION.

VII. ETUDE DE L'EFFET DU SERUM ANTIMACROPHAGE SUR DIVERSES FONCTIONS DU MACROPHAGE.

7.1. INTRODUCTION.

7.2. MATERIEL ET METHODES.

7.2.1. Les animaux.

7.2.2. La culture de macrophages.

7.2.3. Préparation du serum antimacrophage.

7.2.4. Epuisement du serum.

7.2.5. Titrage du serum par le test au chrome.

7.2.6. Recherche de la spécificité.

7.2.7. Action du serum sur l'étalement, la phosphatase acide, et la cytotoxicité du macrophage.

7.2.7.1. Mesure de l'étalement du macrophage.

7.2.7.2. La phosphatase acide.

7.2.7.3. La cytotoxicité du macrophage.

7.2.7.4. Protocole de traitement des péritonées de souris par le serum antimacrophage.

7.3. RESULTATS.

7.3.1. Titre du serum.

7.3.2. Spécificité du serum.

7.3.3. Effet sur l'étalement, la phosphatase acide et la cytotoxicité du macrophage.

7.3.3.1. La phosphatase acide.

7.3.3.2. L'étalement des macrophages.

7.3.3.3. La cytotoxicité du macrophage.

7.4. DISCUSSION.

VIII. CONCLUSIONS GENERALES.

IX. ABREVIATIONS.

X. BIBLIOGRAPHIE.

ADDENDA A L'INTRODUCTION.

ADDENDA A LA BIBLIOGRAPHIE.

II

AVANT PROPOS

L'immunologie est l'étude du système immunitaire et de ses expressions biologiques. Jusqu'à présent, l'idée que l'on se faisait de ce système est qu'il fonctionnait de manière hautement et exclusivement spécifique avec pour outil principal l'immunoglobuline (17). Cette manière de penser est due en grande partie à l'acquisition des connaissances de l'immunologie sérologique qui précèdent celles de l'immunologie cellulaire. Dans ce nouveau domaine, les effecteurs moléculaires que l'on peut appeler régulateurs ou modulateurs ne sont plus uniquement des immunoglobulines mais d'autres facteurs synthétisés et sécrétés par des cellules du système immunitaire qui participent à l'interaction et, si l'on peut dire, à la communication harmonieuse entre les cellules dans le cadre de "l'orchestre immunologique". (7,18,56,79,85,111,113)

La plupart des facteurs cellulaires participant à la régulation du système immunitaire ne sont connus qu'en fonction de leurs activités biologiques. Leur isolation et purification ne sont entreprises que lorsqu'ils sont suffisamment stables pour traverser les processus sans être dénaturés.

C'est ainsi que certaines lymphokines ont été isolées et purifiées en fonction de leurs propriétés biochimiques telles que poids moléculaires, points isoélectriques, sensibilité aux variations de pH et de chaleur et leurs profils électrophorétiques. Parallèlement les populations ou sous-populations de cellules responsables de leurs synthèses et sécrétions sont mises en évidence. (30,31,32)

Il est frappant de constater que certaines de ces molécules varient de la plus simple molécule telle que la thymidine à la plus complexe telle l'interleukine 2 (IL2) en passant par les facteurs du complément et les prostaglandines, sans oublier les immunoglobulines. (49,77,91,229)

Il est cependant remarquable de constater que ces dernières ne jouent souvent qu'un rôle d'induction dans la plupart des mécanismes de régulation cellulaire. (7)

Une autre propriété des régulateurs d'interaction de l'immunologie cellulaire est qu'ils ne sont pas réduits par le complexe majeur ou autre de l'histocompatibilité. Certaines lymphokines de souris sont susceptibles d'agir sur le système humain et vice versa. (198)

Fondamentalement, ce qui a induit le développement de l'immunologie cellulaire, c'est à la fois l'immunologie de transplantation et l'immunologie des tumeurs. Cette dernière a conduit à l'immunothérapie des tumeurs dont les résultats sont loin d'être fructueux. Un problème conceptuel réside dans la question principale suivante : "Les néoantigènes tumoraux existent-ils ?" Si oui, comment les mettre en évidence et les utiliser dans les cas où ils apparaissent. Si non, le système immunitaire est-il capable par des voies non spécifiques indépendantes des immunoglobulines de moduler une croissance tumorale (positivement ou négativement) et par quels moyens ?

Selon le principe bien connu, les réponses qui se dessinent déjà à ces questions en amènent d'autres telles que : quelles sont les cellules effectrices indispensables ? L'orchestre immunologique est-il dirigé par un chef unique ? Joue-t-il à la manière d'un orchestre de chambre ? Est-ce une grande formation ? Quels sont les instruments de la symphonie immunologique ? Et finalement, pouvons-nous décoder son langage et le rendre rationnel ?

Le macrophage est une des cellules effectrices centrales de cet enchevêtrement d'actions concomitantes et parfois apparemment antagonistes. Le système immunologique n'est pas manichéen. De sa compréhension critique dépendent bien des développements de la thérapeutique spécifique des affections cancérologiques et autres.

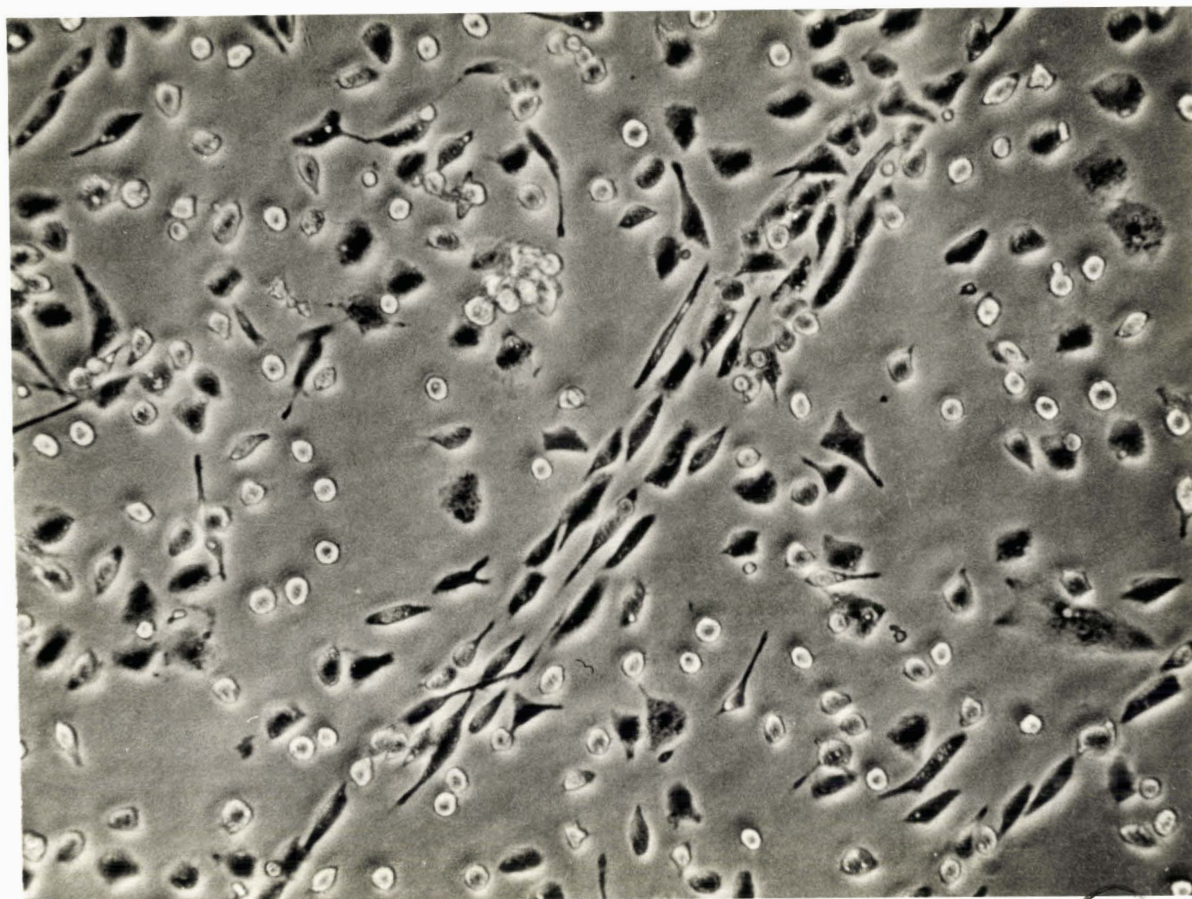


Fig. 3-1

Macrophages péritonéaux de souris Balb/c après 24 heures d'adhérence
Microscope à contraste de phase - Nikon.

Grossissement : 100 x.

III

INTRODUCTION ET RAPPEL HISTORIQUE

C'est Elie Metschnikoff (164) qui le premier, en 1887, publie ses observations sur l'existence de cellules amiboïdes mononucléées, libres et mobiles, ayant la propriété de phagocytose et qu'il appelle macrophages. Ces cellules capables de phagocyter des bactéries et d'autres cellules ainsi que diverses substances particulières telles les billes de latex ou le fer jouent un rôle non seulement dans les réactions inflammatoires mais aussi dans les réactions immunitaires. (143)

Malgré les formes diverses sous lesquelles les macrophages peuvent être observés, ils possèdent de nombreuses caractéristiques communes. Leur membrane ondulante leur permet d'assurer une résorption intense appelée endocytose (phagocytose et pinocytose) et d'adhérer fermement aux surfaces. (34)

L'origine des macrophages fut étudiée par Volkman (215) et par Van Furth, Cohn et Coll (221-223,30-32). Ces auteurs étudiant les macrophages péritonéaux et alvéolaires, les cellules de Kupffer et les macrophages du derme (221) ont démontré l'existence d'un précurseur situé dans la moëlle osseuse. Celui-ci, après divisions répétées, donne naissance aux promonocytes et aux monocytes. Ces derniers, quittant le compartiment sanguin et atteignant les tissus, deviennent à la phase mature et terminale (end cells) des macrophages tissulaires. Les macrophages résidents ne se divisent plus, bien qu'ils soient encore capables de croissance sous certaines conditions. Cette activité mitotique a été constatée en particulier in vivo aux sites de lésions inflammatoires. Les macrophages les plus susceptibles de mitoses sont les macrophages tissulaires et périvasculaires. Les macrophages résidents ont une moins grande capacité de prolifération (Van Furth : Mononuclear Phagocytes). (222,230,158)

Le système des macrophages tissulaires n'est plus appelé "système réticulo-endothélial". Ce système incluait les cellules réticulaires et les cellules endothéliales. Or, ces dernières ne sont en fait que des phagocytes facultatifs et sont - du moins si l'on suit l'attitude dogmatique de Van Furth (221) - à exclure du système actuellement appelé "système des phagocytes mononucléés" (41). Le tableau I rapporte, légèrement modifiée, la nomenclature des macrophages proposée par Langevoort et Coll (131). Nous y avons ajouté les macrophages des tumeurs solides puisque grâce aux observations de Lejeune (135,142) et celles d'Evans (60) nous savons à présent que les cellules phagocytaires du mélanome et d'autres tumeurs solides sont identiques aux macrophages péritonéaux (118).

Les diverses propriétés des macrophages sont énumérées dans le tableau II.

La fonction principale du macrophage est l'endocytose. C'est au cours de la transformation du monocyte en macrophage, qu'apparaissent les propriétés d'endocytose. En effet, les observations de Cohn et Coll (30-32) ont démontré que la formation d'une membrane ondulante permet d'une part la capture, d'autre part la résorption de substances solubles. Ces phénomènes sont appelés respectivement phagocytose et pinocytose.

Ils impliquent l'invagination de la membrane ondulante et la formation de vacuoles de phagocytose et de pinocytose. Ensuite, ces vacuoles sont mises en rapport avec les lysosomes primaires qui peuvent fusionner avec elles et leur inoculer des enzymes hydrolytiques. Ils constituent ainsi les lysosomes secondaires. Les hydrolases acides dégradent alors le matériel endocyté. Cohn et Coll (30-32) ont démontré que le concept de de Duve (43) sur le système lysosomal peut être appliqué aux macrophages. L'une de leurs découvertes les plus importantes est celle qui démontre que l'endocytose du matériel métabolisable est le stimulus de la formation de lysosomes et de la synthèse des enzymes lysosomiaux (6,173).

La capacité de phagocytose des macrophages est analogue à leur capacité de s'étaler. On peut en effet concevoir que l'étalement ou l'adhérence sur un support de verre ou de plastique constituent une

des formes les plus évoluées de la phagocytose, du moins dans sa première phase. North (177) a montré que les deux phénomènes de phagocytose et d'étalement ont une relation mutuelle et dépendante du système énergétique de l'ATP (29).

Cependant, l'étalement et l'adhérence les plus rapides sont accomplis par des macrophages dits "activés". C'est le cas lorsque du BCG (156), du *Corynebacterium Parvum*, du glucan ou d'autres immunostimulants ou bien des cellules tumorales servent de stimuli (1166). Ce phénomène peut être également produit par des substances sécrétées par les lymphocytes (211).

La capacité d'adhérence des macrophages offre la propriété assez remarquable de résister à la trypsine. C'est la seule exception connue à la règle qui prétend que toute cellule de mammifère étalée puisse être détachée de son support par la trypsine. Cette dernière, à des concentrations critiques, est un promoteur de (60) l'étalement et de l'adhérence des macrophages. Les diverses méthodes qui permettent l'isolement des macrophages sont reprises dans le tableau III.

En opposition avec ses fonctions de résorption, le macrophage a la capacité de sécréter. Au cours de son activité de phagocytose, il largue des enzymes lysosomiaux dans le milieu ambiant (145). Il a la propriété de synthétiser une peroxidase (127) et du lysozyme (31), ce qui explique son pouvoir bactéricide à l'instar des polynucléaires (201).

Les macrophages sont des cellules ubiquitaires, polymorphes issues de monocytes et subissant une différenciation dans les différents tissus de l'organisme. Par exemple, le métabolisme des macrophages péritonéaux est différent de celui des macrophages alvéolaires. Le premier est anaérobique facultatif, le second est aérobique strict (86,173).

La préparation et la caractérisation des macrophages est importante lors de l'étude de ces cellules du fait de leur hétérogénéité structurale et fonctionnelle et de leur contamination possible par différents éléments (en particulier certaines sous-populations de lymphocytes) (233).

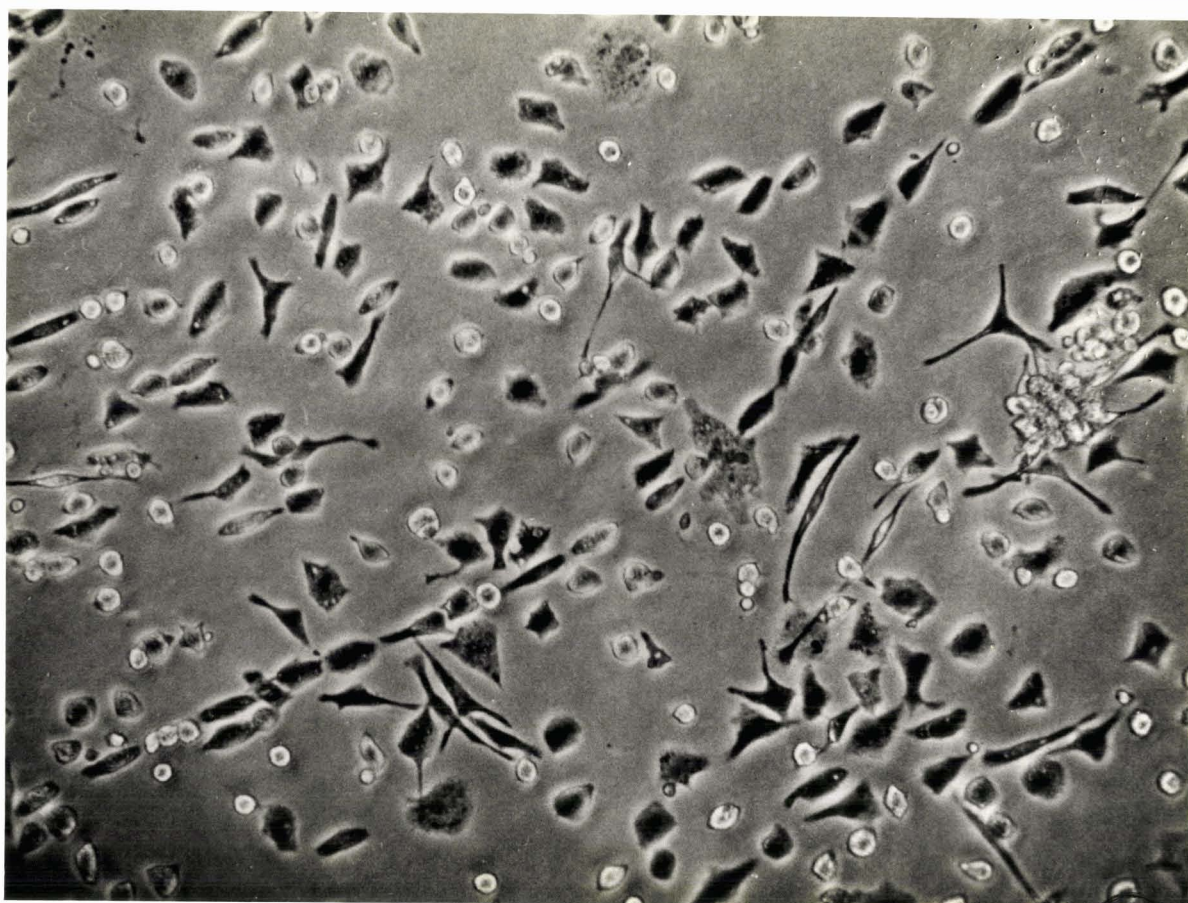


Fig. 3-2

Macrophages péritonéaux de souris Balb/c après 24 heures d'adhérence
Microscope à contraste de phase - Nikon.
Grossissement : 100 x.

3.1 LE MACROPHAGE ET LE SYSTEME IMMUN

Dans toute réaction immunologique on peut distinguer deux arcs. L'arc afférent et l'arc efférent. L'arc afférent est la phase d'induction au cours de laquelle l'antigène stimule les cellules immunocompétentes. L'arc efférent est la réponse constituée par des cellules activées (immunité cellulaire : lymphocytes T, helper, killer et suppresseur ainsi que les macrophages) et par des anticorps (immunité humorale : les lymphocytes B, issus de la moëlle osseuse, sécrètent des anticorps soit directement, soit en se transformant en plasmocytes) (200).

La réaction primaire est celle qui se déroule lors de la première rencontre avec un antigène. La réaction secondaire est celle qui se déroule après la première lors de la représentation de l'antigène. Cette réaction implique l'existence de mémoire immunitaire par les lymphocytes T (memory cells).

Si cette réaction se passe dans la peau, elle prend classiquement le nom d'hypersensibilité retardée en présence d'une réponse cellulaire (exemple : la réaction à la tuberculine). Elle porte le nom d'hypersensibilité immédiate (exemple : l'anaphylaxie) si elle met en oeuvre des anticorps circulants (128).

Il est actuellement accepté que la capture et le traitement des antigènes par les macrophages constituent la première étape de la réaction immune (5).

La stimulation in vitro des lymphocytes par certains antigènes nécessite la présence de cellules adhérentes (72). Par exemple, il a été établi que la sensibilisation des souris avec de l'albumine sérique bovine donne des titres en anticorps plus élevés lorsque l'antigène est préalablement lié au macrophage (208).

Les macrophages sont capables de fixer à leurs surfaces de très nombreux antigènes qu'ils peuvent conserver plusieurs jours sous une forme immunogène (217). La fixation de cet antigène peut être due à la présence d'immunoglobulines cytophiles présentes à la surface des cellules telles les IgE (25,117).

Les lymphocytes qui sont sensibilisés contre un antigène sont simultanément affectés par certaines propriétés des macrophages qui leur ont présenté cet antigène (192). L'existence de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (13) est primordial.

L'interaction entre l'antigène et la surface du macrophage est un facteur déterminant de la réponse immune (186).

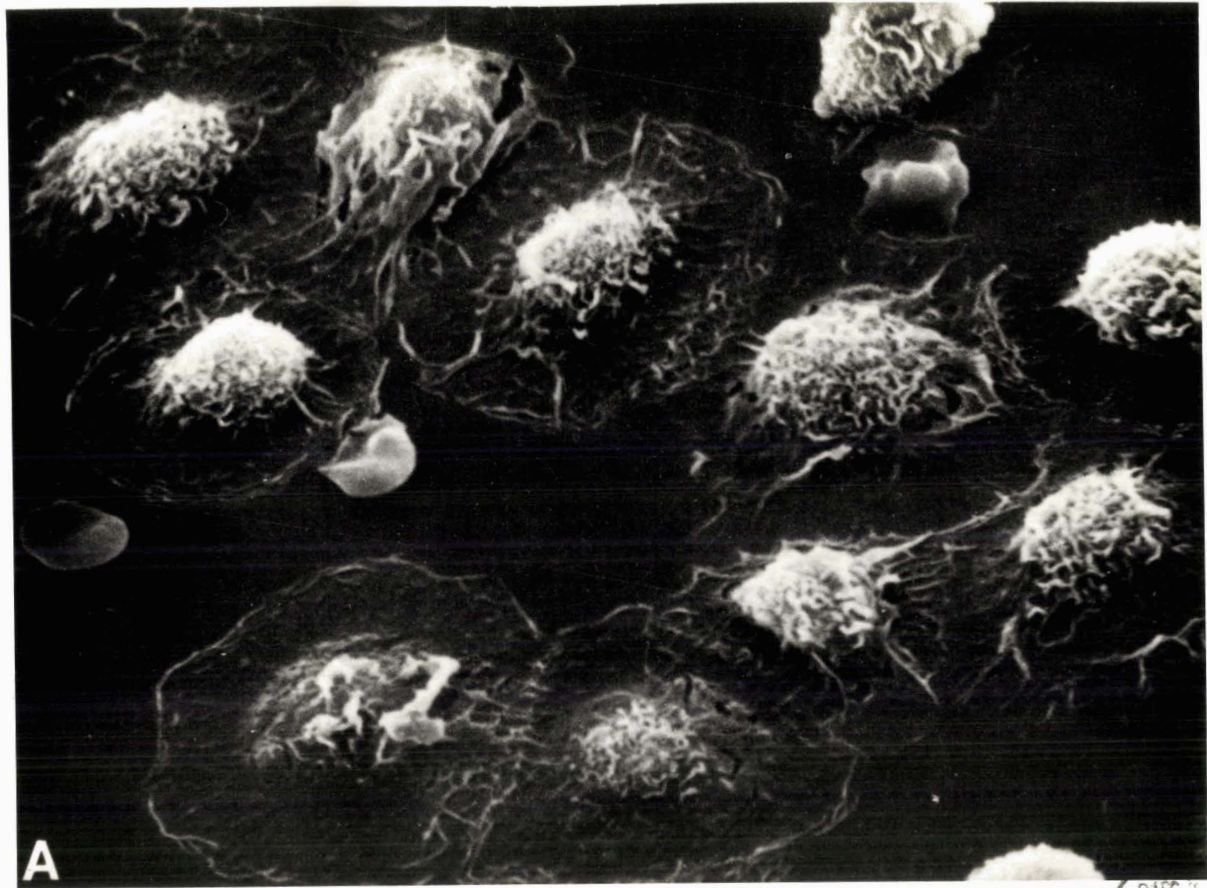
L'opsonisation est le traitement par les immunoglobulines d'antigènes, de bactéries, de cellules tumorales ou de toute particule adsorbant les Ig, permettant ou favorisant la phagocytose de celles-ci par les phagocytes (10).

Au cours de l'étape suivante de la réaction immunitaire, les macrophages coopèrent avec les lymphocytes T et B. Fishman (67) a démontré que la synthèse d'anticorps par les lymphocytes est induite par un ARN extrait de macrophages. Ensuite Gottlieb et Coll (84,85) ont mis en évidence que les antigènes "traités" par les macrophages sont des fragments antigéniques appelés "carrier". Ils sont liés à une molécule ribonucléo-protéique pré-existante (RNA). Bien que la notion de complexes ARN-Antigènes soit acceptée (73), certains auteurs l'ont contestée en suggérant qu'il s'agit d'artéfacts (15). Les macrophages peuvent sécréter des substances qui augmentent la réponse des lymphocytes aux mitogènes (78). Inversément, les macrophages peuvent jouer un rôle dans la suppression de la réponse immune lorsqu'elle n'a plus de raison d'être (227).

La notion de macrophages en tant qu'"accessory cells" a été mieux définie grâce aux études faites sur les phénomènes de restriction immunologique liés chez la souris à l'antigène majeur d'histocompatibilité H-2. Erb et Kappler (7) ont découvert que les lymphocytes T, d'un animal non initié à un antigène, n'avaient pas d'affinité particulière pour celui-ci. Le traitement de l'antigène par les macrophages de souris permet à ceux-ci de "traiter"

l'antigène en lui adjoignant de petites particules antigéniques portant des déterminants H-2. Les cellules T sont alors capables de reconnaître ce complexe et d'être activées (223).

L'interaction des macrophages avec les lymphocytes se fait principalement au travers de médiateurs biochimiques tels l'acide arachidonique (42) et certains facteurs cytokinétiques baptisés monokines à l'instar des lymphokines lymphocytaires (7,168). La production de monokine peut être induite au demeurant par des lymphokines (57,58,176).



A

BUS
LILL

Fig. 3-3

Observation au microscope électronique à balayage de la morphologie de macrophages alvéolaires de lapin adhérant à différents substrats. (133')

Le macrophage est par excellence une cellule modulatrice du système immun puisqu'il participe tant au niveau de l'arc afférent que efférent à la régulation de la réponse en l'amplifiant ou en la freinant. L'hypersensibilité retardée (HSR) est le prototype de l'immunité cellulaire. On en trouve un exemple dans la réaction à la tuberculine pour laquelle un examen histologique révèle une accumulation de lymphocytes et de macrophages. Les lymphocytes sécrètent aussi des molécules auxquelles le macrophage est sensible. Le MIF (migration inhibition factor) est sécrété par des lymphocytes sensibilisés. Le facteur inhibe la migration des macrophages d'animaux non sensibilisés. Ce facteur serait responsable de l'immobilisation des macrophages dans le site de la réaction d'HSR. D'autres sous-populations de lymphocytes spécifiquement sensibilisés peuvent libérer un "facteur d'activation des macrophages" MAF (inséparable du MIF). Ce dernier provoque l'augmentation de l'adhérence, l'étalement, la motilité, la phagocytose, l'oxydation du glucose (23,172) et la cytotoxicité de et par les macrophages.

Le facteur d'activation MAF et le MIF ne peuvent pas être complètement dissociés. Les deux effets diffèrent par leur succession dans le temps (193).

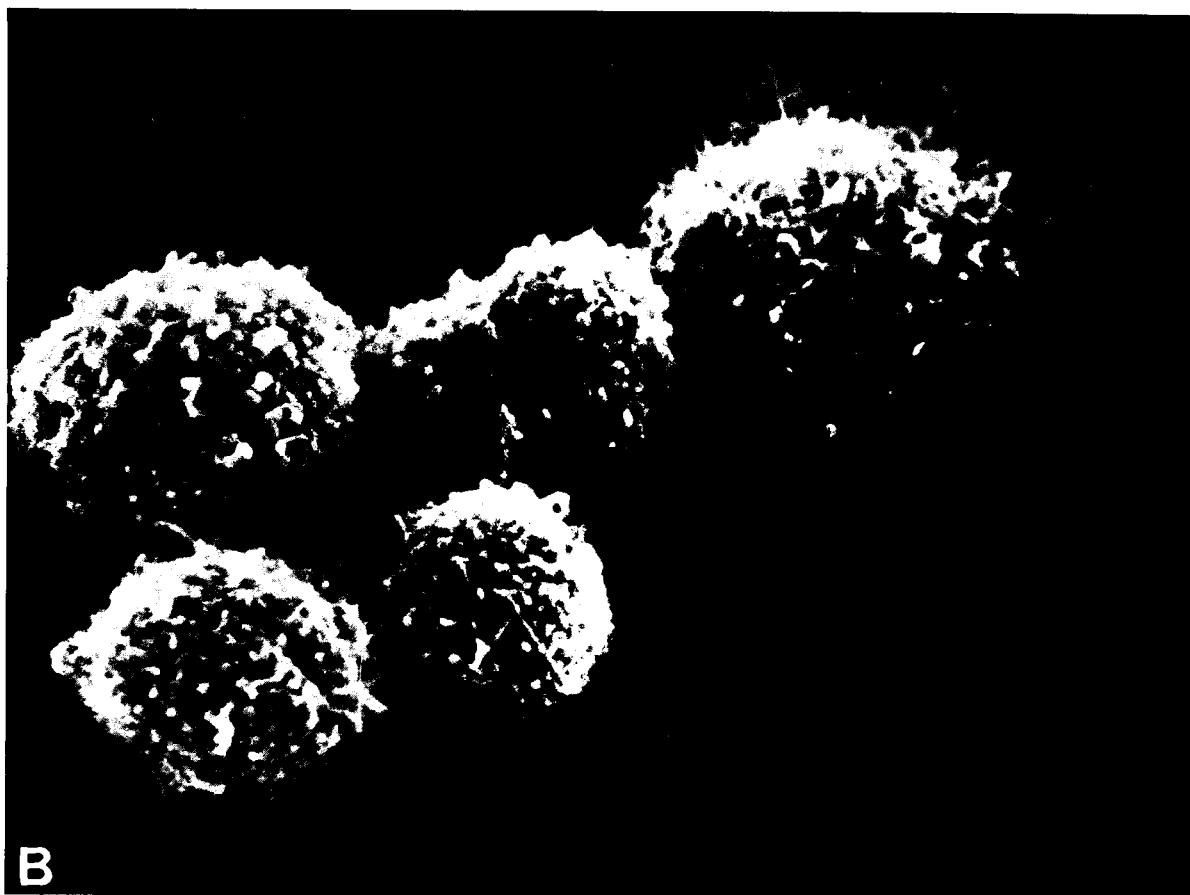
De telles propriétés ont été appliquées dans l'étude du mélanome humain (143). Dans les conditions de réaction secondaire in vitro, les lymphocytes libèrent des substances appelées lymphotoxines à activité cytotoxique non spécifique. En outre, ils sécrètent un facteur chimiotoxique, actif uniquement sur les macrophages. Ces deux substances ont été séparées des deux précédentes par des méthodes biochimiques (172).

Les macrophages peuvent être activés spécifiquement par des lymphocytes T sensibilisés. Ces dernières cellules libèrent un SMAF (specific macrophage arming factor) qui leur permet d'acquérir une cytotoxicité antitumorale spécifique dans certains modèles expérimentaux (3,58).

DISTRIBUTION ET NOM PARTICULIER DES MACROPHAGES

Adapté de (143)

<u>Site anatomique</u>	<u>Localisation et nom de la cellule</u>
Foie	Cellules de Kupffer jouxtant les cellules hépatiques.
Rate	Dans la pulpe rouge, dans le système lymphoïde (follicules de Malpighi). Macrophages spléniques.
Ganglions lymphatiques	Dans les sinus circulaires et nodulaires et les follicules du cortex. Macrophages thymiques.
Thymus	Un peu partout, dans certaines espèces, dans les corpuscules de Hassal.
Moëlle	Un peu partout. Macrophages et cellules-souches promonocytes et monocytes.
Poumon et plèvre	Alvéoles, liquide pleural, lait.
Péritoine	Liquide péritonéal.
Système nerveux central	Plexus choroïde, microglia.
Sang	Monocytes.
Articulations	Fluide synovial.
Tissus sous cutanés, intestin, utérus, ovaire, testicules	Tissu conjonctif.
Autres sites	Sites inflammatoires et certaines tumeurs solides.



BUS
LILLE

Fig. 3-4

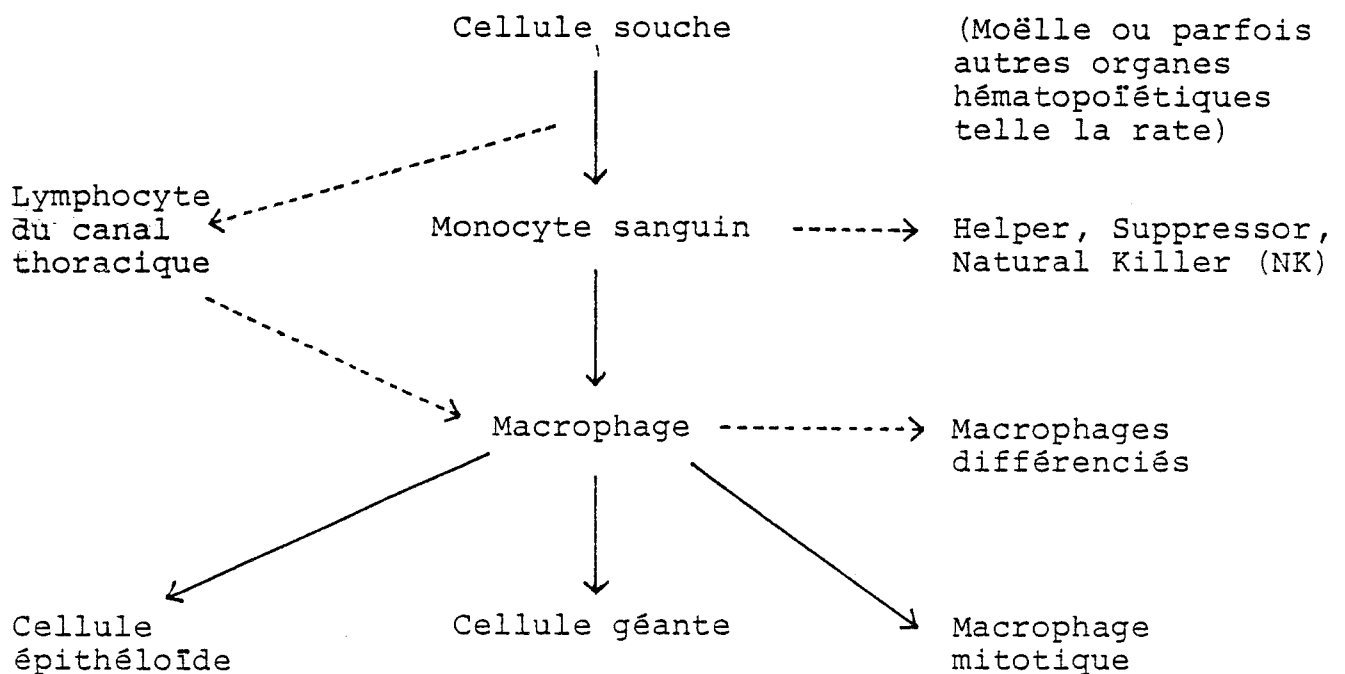
Observation au microscope électronique à balayage de la morphologie de macrophages alvéolaires de lapin adhérant à différents substrats. (133')

3.2 ORIGINE ET METABOLISME DU MACROPHAGE ET SON ROLE BIOLOGIQUE

Les macrophages ont pour cellules souches des cellules de la moëlle. Balmer (1963) et Roser (1970) (192) injectent des cellules de moëlle dans des souris irradiées et obtiennent ainsi des macrophages péritonéaux chimères sensibles aux anticorps dirigés contre le donneur. Les macrophages d'exudats inflammatoires sont des monocytes du sang qui, après un certain nombre de divisions mûrent en macrophages qui ne se diviseront plus sauf dans des conditions (1,20) particulières. Le schéma ci-dessous montre l'origine et les transformations possibles du macrophage (81,82).

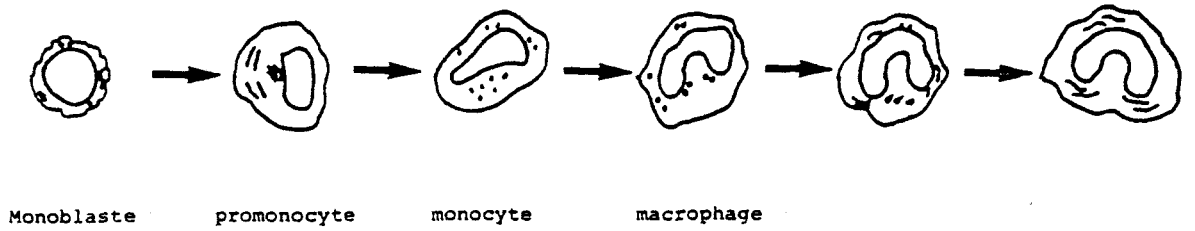
Ligne pleine : prouvé.

Ligne pointillée : voie peu courante et souvent controversée
(Macrophages and immunity) (173).



Points de vue divergents concernant l'ontogénèse du macrophage résident.

VAN FURTH



DAEMS

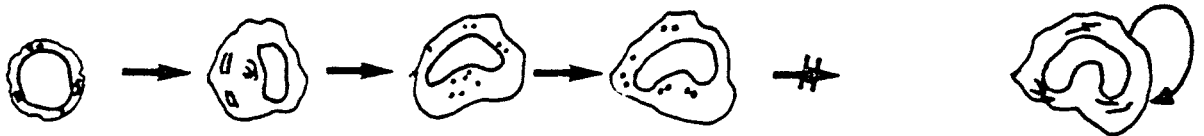


Fig. 3-5

Extrait d'un article de Jos van der Meer : Predestination of monocytes, Immunology Today, 1980, 1, 4, i. (219)



Un autre schéma est celui repris par J. F. Bach (7) dans son traité d'immunologie caractérisant les différents compartiments dans lesquels peut se retrouver le macrophage.

La moëlle est 400 fois plus efficace que la rate dans la production de cellules souches de macrophage (193). Bien que pendant longtemps on ait pu croire que la cellule souche des cellules phagocytaires, lymphocytaires et érythrocytaires était unique, les expériences de Chen et Schooley (7) ont démontré le contraire.

Les macrophages sont capables de se diviser dans certaines conditions inflammatoires. Des macrophages sur couvre-objets implantés en sous cutané chez le rat continuent à se diviser même si l'animal a été irradié (Spector et Ryan) (207). La demi-vie du monocyte chez la souris est de 22 heures (Van Furth et Cohn) (221,1). Chez le rat, ce chiffre est de 72 heures (193), le turn over est d'à peu près 3,6 millions de cellules par jour. L'injection intraveineuse de macrophage ayant phagocyté de l'or (¹⁹⁸Au) colloïdal montre 24 heures plus tard une répartition de 60 % des cellules parmi les cellules péritonéales, 15 % dans le foie et 5 % dans la rate. La concentration cellulaire dans le foie est équivalente à celle du péritoine (Russell & Roser, 1966) (194). Une hypothèse intéressante de Russell suggère qu'un macrophage passant d'un tissu dans la circulation et atteignant le foie peut devenir une cellule de Kupffer. Les macrophages pénètrent le péritoine par une voie bien définie, les tâches laiteuses de Ranvier, et en sortent par les canaux lymphatiques qui y sont branchés avant d'être distribués dans les tissus. Lors de la réaction inflammatoire, les macrophages sont mis en mouvement par une substance chimiotactique pour être ensuite immobilisés aux sites de la réaction par le MIF produit par les lymphocytes (7).

Le macrophage possède, à l'instar de ces fonctions biologiques, des fonctions métaboliques fort complexes (122,211).

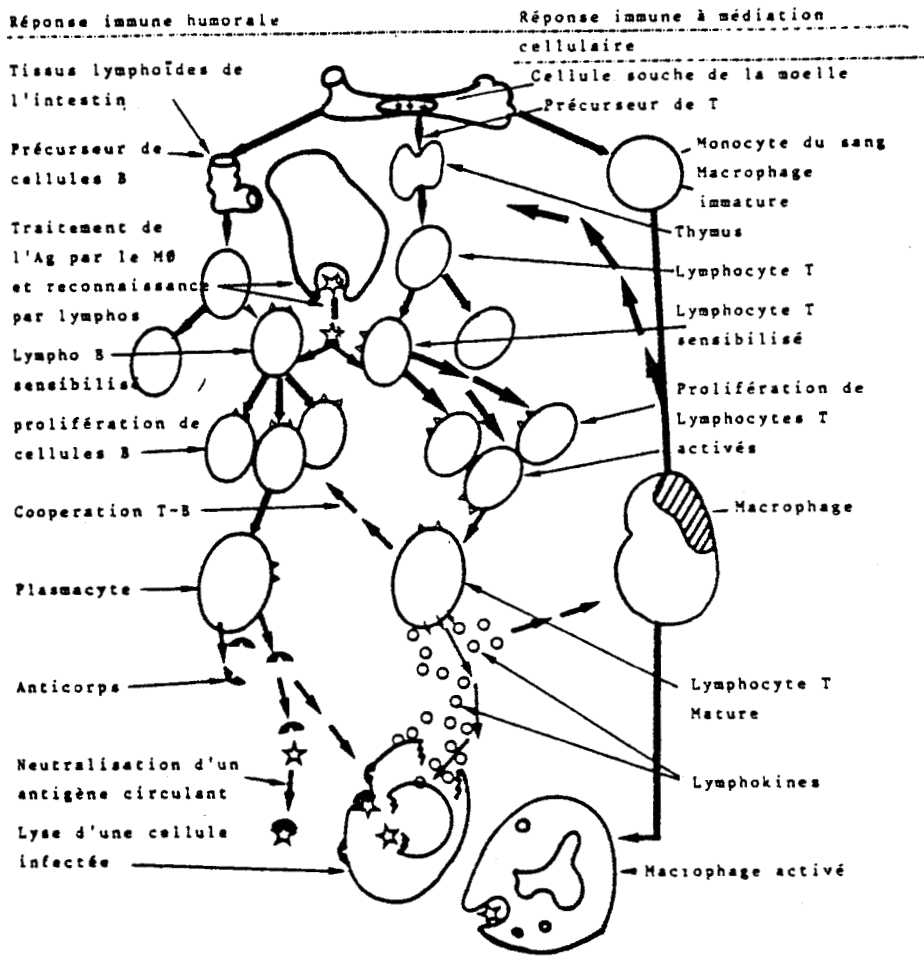
Au niveau de la structure des organites cytoplasmiques, le macrophage possède de nombreuses mitochondries de taille variable contrairement aux polynucléaires.

SITE	METHODES D'ISOLEMENT DES MACROPHAGES	REFERENCES SELECTIONNEES
Péritoine	1. Adhérence au plastique.	32
	2. Adhérence et étalement sur collagène. Détachement à la collagénase.	74
	3. Macrophages chargés d'huile ou d'hydrates de carbone. Gradient de Ficoll.	187
	4. Macrophages obtenus par stimulation au thioglycollate. Gradient de Ficoll discontinu.	232
Ganglions lymphatiques et rate	Adhérence à des billes de verre.	151
	Culture sélective	221
Moëlle osseuse	1. Digestion à la Collagénase - Flottation.	193
	2. Phagocytose de fer. Centrifugation différentielle.	48
Poumons	Lavage du tractus broncho-alvéolaire.	133
Tumeurs solides	Incubation de la suspension cellulaire en solution de trypsine.	60

PROPRIETES DES MACROPHAGES

PROPRIETE	TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE	REFERENCES SELECTIONNEES
Membrane ondulante	Microscopie électronique	110,112
Absence de prolifération en culture	Incorporation de thymidine tritiée	221
Antigénicité	Sérum antimacrophage	216
Endocytose		173
Phagocytose	Voir revue par NELSON	31
Pinocytose	Or colloïdal radioactif Peroxydase de raifort	212
Lysosomes	Détection cytochimique	
	- de la phosphatase acide	136
	- de la β glucuronidase	136
Sécrétion		
- d'enzymes lysosomaux	Phagocytose in vitro	30
- de collagénase	Méthode isotopique in vitro	225
- d'activateur du plasminogène	in vitro	218
- d'interféron	- inhibition virale - inhibition de la prolifération cellulaire	205 91
- d'agents stimulateurs des lymphocytes	PHA	78
- d'inducteurs de colonies	par les cellules souches de la moëlle	28
Adhérence et étalement	- culture sur plastic - résistance à la trypsine - facilitation par la trypsine	31 60 188
Anticorps cytophiles	Rosettes EA	116
Récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines	Rosettes EAC Test cytotoxique	13 63
Peroxydase	Réaction cytochimique	221
Opsonines	Phagocytose de cellules allogéniques	10





REPRESENTATION DE LA REPOSE IMMUNE

Fig. 3-6

D'après J-F Bach, Immunologie, Flammarion Médecine Sciences. (7)



Le reticulum endoplasmique est lui aussi plus développé chez le macrophage et la densité des ribosomes peut être très importante lorsque les macrophages proviennent de foyers inflammatoires ou d'animaux "immunostimulés".

Le complexe de Golgi est important dans les macrophages et monocytes. Par contre, le nombre de lysosomes du macrophage au repos est inférieur à ceux que l'on trouve dans les polynucléaires et varie en fonction de la situation immunitaire et du degré d'activation de la cellule (33).

Les micro-filaments ou micro-tubules jouent un rôle important dans les mécanismes de phagocytose et de mobilité cellulaire. La phagocytose est une fonction exponentielle exprimée selon la formule $K = \frac{\log C_0 - \log C_t}{t}$ où C_0 et C_t sont les concentrations en particules de carbone aux temps 0 et t . (Cette formule ne tient pas compte du poids du foie et de la rate qui peuvent être modifiés au cours de certains traitements immunostimulants ou selon l'âge ou la lignée des animaux. Si l'on veut tenir compte de ces paramètres, on exprime les résultats sous forme d'un index phagocytaire corrigé $\alpha = {}^3 K \frac{Pa}{Pf + Pr}$ où Pa est le poids de l'animal, Pf le poids du foie et Pr le poids de la rate) (213).

Cette phagocytose peut être quantifiée par diverses méthodes telle celle de l'¹⁹⁸Au colloïdal qui mesure plus particulièrement la pinocytose (96), les billes de latex, les bactéries marquées au ³H ou au ¹⁴C (212).

Le système lysosomal et ses enzymes ont retenu l'attention de nombreux scientifiques pendant des années. Z. A. Cohn a été le premier à étudier extensivement le fonctionnement de la digestion des particules phagocytées (221).

Comme l'a dit D. S. Nelson (173), "les macrophages sont capables comme les enfants d'ingérer n'importe quoi". Le système lysosomal et la production d'hydrolases par les macrophages ne sont induits que si les particules ingérées sont digestibles. L'ingestion

d'érythrocytes fixés à la gluteraldehyde induit la production d'hydrolases alors que des microsphères de polystyrène ne le font pas (7).

Des gamma-globulines bovines précipitées par la chaleur sont avidement phagocytées et dégradées, les macrophages induisant chez celles-ci un taux d'enzymes élevé alors que des granules d'amidon qui sont plus lentement digérés induisent moins d'enzymes. L'immunisation des animaux par l'injection de cellules irradiées augmente de façon significative les lysosomes et la phosphatase acide (136).

La cytochimie des phagocytes mononucléés a été revue par Braunsteiner et Schmalzl (20).

Les déshydrogénases ainsi que les enzymes hydrolytiques sont repris. La phosphatase acide est un des enzymes lysosomiaux les plus caractéristiques des macrophages. Leurs cytoplasmes (8,136,59) montrent une intense activité en phosphatase acide commençant au alentours du noyau en relation avec l'hypertrophie de l'appareil de Golgi et l'accroissement du nombre de lysosomes lors de la phagocytose et l'activation de la cellule (31,32).

Outre les hydrolases et enzymes protéolytiques, les enzymes appartenant à la chaîne de la glycolyse sont détectés dans le macrophage (20,115). Les déshydrogénases gluco-6-phosphate, 6-phosphogluconate, lactique et alpha glycerophosphate mitochondriales augmentent tout comme les hydrogénases NAD dépendantes isocitriques, maliques et succiniques.

Le macrophage est une cellule qui s'adapte remarquablement à son micro-environnement physiologique. Il est cependant très sensible aux pH basiques à partir de 7,2 alors qu'il résiste à des pH acides jusqu'à 2,5 sans problème. Dans un milieu adéquat, il peut survivre de nombreux mois in vitro. Selon la composition du milieu, sa cytochimie variera. Un milieu riche en protéine induira un métabolisme en esterase et en protéinase de type cathopsin C. La production d'hydrolases est bien sûr déprimée par les inhibiteurs de synthèse protéique (33,20,115) ainsi que par la chloroquine qui induit la formation de vacuoles autophagiques dans les macrophages (65). Le taux d'activité de ces enzymes permet de différencier les monocytes des macrophages. Ceux-ci sont morphologique-

ment plus grands et plus phagocytants. Les activités des esterase^s NaF résistantes, naphtyl amidase, lysozyme, beta glucuronidase et autres galactosidases indiquent le degré d'activation enzymatique des macrophages. Le macrophage issu du monocyte est la cellule ayant une compétence spécifique dans les mécanismes de défense et de réparation ainsi que dans les mécanismes de régulation immunologiques et non spécifiques des croissances tumorales (123,145).

3.3 LE MACROPHAGE ET LES TUMEURS

Govaerts (87) a démontré que le rejet d'allogreffes rénales est dû à l'action cytotoxique de cellules lymphoïdes. Ultérieurement, ces observations ont été reproduites et généralisées. Il est acquis que c'est sur l'immunité cellulaire que reposent les mécanismes de rejet, non seulement dans l'immunité de transplantation, mais aussi dans l'immunité anti-tumorale. A l'exception des travaux réalisés sur les lymphomes, peu de choses sont connues sur le rôle des macrophages dans le contrôle de la croissance des tumeurs solides (21

Gorer (84) a été le premier à remarquer la présence des macrophages dans les réactions de rejet des allogreffes. Plus tard, Bennet, Old et Boyse (10) ont démontré le rejet immunologique de cellules tumorales par des macrophages péritonéaux. Depuis lors, de nombreux travaux ont été publiés in vitro confirmant ce phénomène dans des systèmes allogéniques (45,89,90,233) et dans un système syngénique, celui d'Evans et d'Alexander (56,57). Les macrophages sont les seules cellules normales à pénétrer les tumeurs solides. Le mélanome est une des premières tumeurs qui a permis d'établir qu'il existe une immunité anti-tumorale. Lewis (148,149), Muna et coll. (169) et Morton (167) ont découvert, séparément et simultanément, la présence d'anticorps dans les mélanomes humains. Les premiers travaux étaient en faveur d'une antigénicité spécifique individuelle et portée par la membrane des cellules tumorales. Les travaux de Lewis (148) et d'autres auteurs (225,152) ont montré l'existence d'antigénicité croisée, due à une multiplicité d'antigènes. Ces découvertes des anticorps anti-mélanomes suggèraient le rôle primordial de l'immunité cellulaire contre cette tumeur (38,47,71,99,100).

L'immunité tumorale se voyait attribuer un rôle néfaste sous la forme de facteurs bloquant la cytotoxicité des lymphocytes (100, 97,98,101). Ces facteurs peuvent être des immuns complexes faits

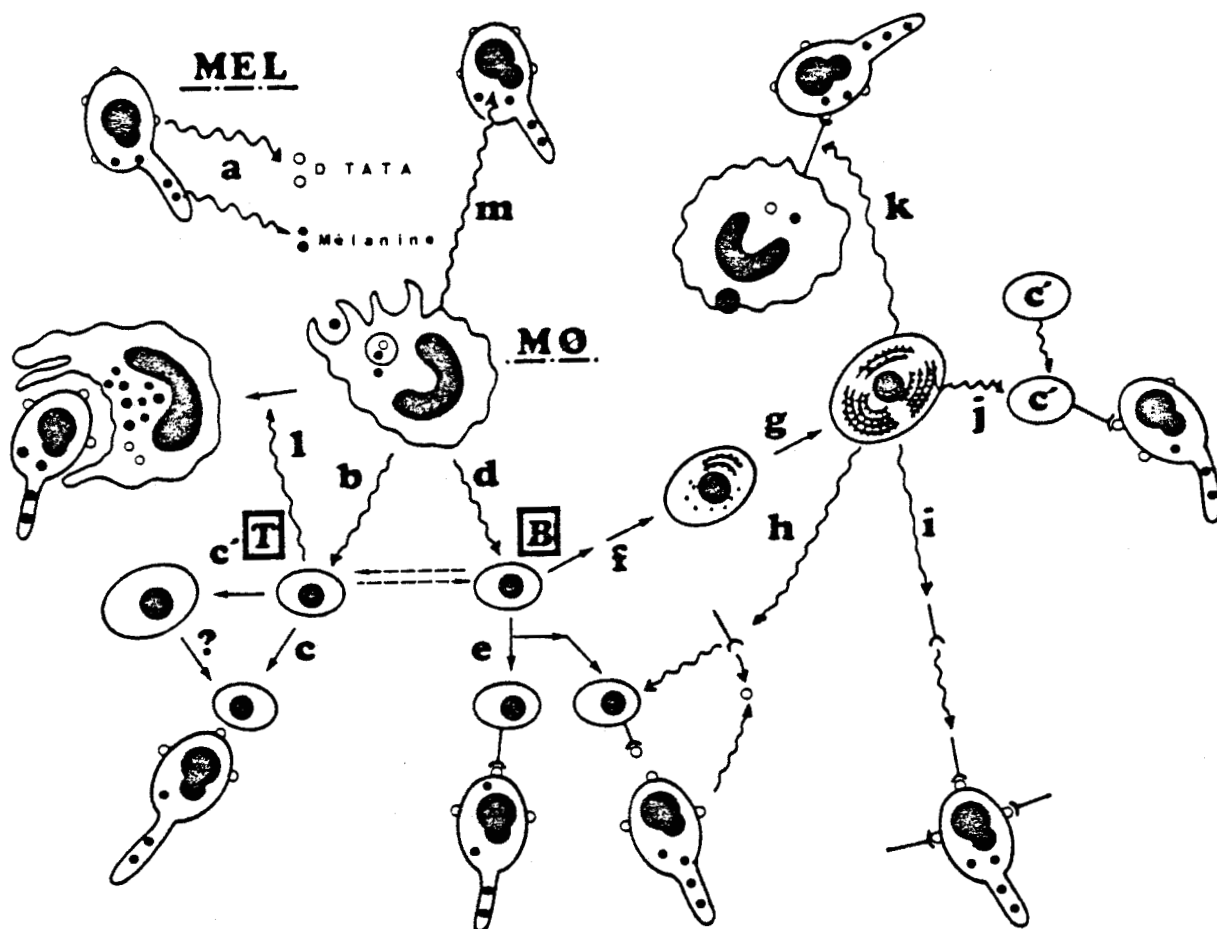


Fig. 3-7

Rôle du macrophage et des lymphocytes dans la modulation et la cytotoxicité spécifique et non spécifique vis-à-vis des cellules tumorales. (122)

- a) Relargage d'antigènes et de marqueurs (mélanine) de la cellule tumorale de mélanome phagocytés et traités par les macrophages.
- b) Le macrophage active la transformation des lymphocytes T en
- c) blastes et cellules tueuses (killer cells) non spécifiques ou
- d) de lymphocytes armés contre les néoantigènes
- e) qui peuvent reconnaître celui-ci et lyser la cellule porteuse ou

BUS
LILLE

- f) induire la prolifération des lymphocytes B en
- g) lymphoblastes producteurs d'anticorps pouvant
- h) armer les lymphocytes cytotoxiques,
- i) reconnaître les antigènes à la surface cellulaire et
- j) lyser la cellule en présence de complément.
- k) Cas particulier où le macrophage peut être armé et devenir une cellule effectrice à caractère spécifique.
- l) A leur tour, les lymphocytes, par l'intermédiaire de lymphokines, peuvent activer les macrophages devenant cytotoxiques de manière non spécifique vis-à-vis des cellules tumorales.
- m) Les macrophages sécrètent des facteurs solubles modulant la croissance des cellules tumorales.

d'anticorps-antigènes avec excès d'antigènes (40,204) et même l'antigène seul (40). Les travaux de Govaerts (88) confirmés plus tard par Perelman et coll. (184) établissent probablement mieux la vérité en développant le concept de l'immunité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC - antibody dependent cellular cytotoxicity). Les lymphocytes sont rendus cytotoxiques en ajoutant dans leur culture des anticorps dilués. Ce phénomène a été confirmé plusieurs fois dans le mélanome (185,100,47,226).

Les cellules effectrices de l'ADCC ne sont pas encore tout-à-fait définies. Les lymphocytes T jouent certainement un rôle mais les macrophages et les cellules K (killer) ou NK (natural killer) sont certainement impliqués. Les travaux de Lejeune et coll. (137) en accord avec les observations de Drochmans (51) effectués sur des biopsies de mélanomes montrent que les cellules effectrices au sein de la tumeur sont des macrophages. (54,195,135,90).

L'interaction cellules effectrices de l'immunité et cellules tumorales n'est pas unilatérale. En effet, les cellules transformées n'ont pas un rôle passif et une action toxique de celles-ci vis-à-vis des macrophages et lymphocytes a été démontrée (64).

Une raison probable pour laquelle l'immunothérapie a essuyé des échecs vient du fait que les cellules transformées, même si elles expriment un néoantigène, sont susceptibles de déjouer l'action du système immun par une action immunosubversive (64) mettant au jour les prostaglandines de la classe E synthétisées et sécrétées par les cellules transformées et les cellules tumorales, tout au moins chez la souris.

3.4 L'ACTION SPECIFIQUE ET NON SPECIFIQUE DES MACROPHAGES SUR LES CIBLES CELLULAIRES

Le rôle du macrophage dans les mécanismes de défense de l'hôte est principalement celui de phagocyte suivi de celui de modulateur et de potentiateur de la réponse immune. Il a cependant été démontré que l'action du macrophage pouvait être plus spécifiquement immunologique.

Les états physiologiques et immunologiques dans lesquels les macrophages peuvent se trouver sont au nombre de cinq.

- 1) Les macrophages normaux ou résidents ont un métabolisme de base normal. Ils n'ont pas d'action cytolytique sur les cellules tumorales. Ils peuvent néanmoins avoir une activité cytostatique à moyen terme (140).
- 2) Les macrophages immuns (45,58) peuvent tuer de manière spécifique des cellules tumorales avec lesquelles l'animal a été immunisé. Leur métabolisme de base est normal, le statut de macrophage immun n'entraînant pas nécessairement une activation de la cellule sauf au moment de la reconnaissance de l'Ag.
- 3) Les macrophages armés sont des cellules obtenues d'animaux non immunisés et rendus cytotoxiques par des facteurs relargués par des lymphocytes immuns. Ces facteurs appelés Specific Macrophage Arming Factors (SMAF) sont dérivés des lymphocytes thymiques (45,58). Au demeurant, il y a une différence marquée dans le degré de cytotoxicité des macrophages immuns et armés.
- 4) Les macrophages activés sont sans doute les plus difficiles à caractériser correctement. En effet, un macrophage peut

être activé par de nombreuses substances à pouvoir antigénique ou adjuvant. L'activation *in vivo* produit généralement une augmentation des niveaux des paramètres métaboliques et particulièrement enzymatiques les rendant plus efficace en matière de toxicité. Nous y reviendrons au chapitre 4 .

- 5) Les macrophages activés-armés : Van Loveren et Den Otter (220) ont montré que des macrophages activés peuvent devenir lytiques lorsqu'ils sont incubés en présence de lymphocytes immuns ou en présence de lymphokines provenant de ces cellules.

L'action cytotoxique anti-tumorale des macrophages peut consister en une action cytolytique où les cellules sont irréversiblement lysées, ou cytotatiques, où la croissance cellulaire est inhibée suite à un blocage métabolique, soit par contact direct avec la cellule effectrice, soit par l'action d'un ou des facteurs solubles sécrétés par celles-ci (2).

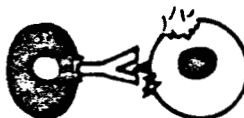
Si les macrophages peuvent être armés ou activés par des lymphocytes immuns, le macrophage a ainsi un effet potentialisateur sur la cytotoxicité des lymphocytes en culture mixte. Lonai et Feldman (66) ont trouvé qu'une quantité critique de macrophages normaux pouvait amplifier la cytotoxicité des lymphocytes sensibilisés *in vitro*. Cependant, d'autres auteurs (156) ont montré, *in vivo*, que seuls des macrophages activés par le BCG pouvaient aider des lymphocytes immuns à rejeter un lymphome allogénique. Si les macrophages peuvent avoir une activité cytotoxique non spécifique, c'est qu'ils sont susceptibles d'être activés et d'atteindre un niveau d'activité métabolique entraînant un relargage d'enzymes lysosomiaux et d'autres facteurs cytotoxiques vis-à-vis des cellules qui y sont sensibles. Toutes les cellules ne sont pas sensibles au même degré aux sécrétions de macrophages. Les cellules tumorales semblent cependant plus sensibles que les cellules normales (39), surtout au niveau de leurs synthèses d'acides nucléiques et de DNA (209).

Les modes d'actions de cette cytotoxicité des macrophages sont

Action directe des anticorps en présence de complément



Cytolyse à médiation cellulaire dépendant des anticorps



Cellules cytotoxiques



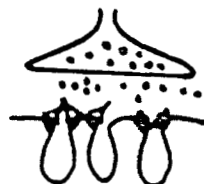
lympho ou cyto toxines



Auto anticorps



Anticorps anti-récepteurs

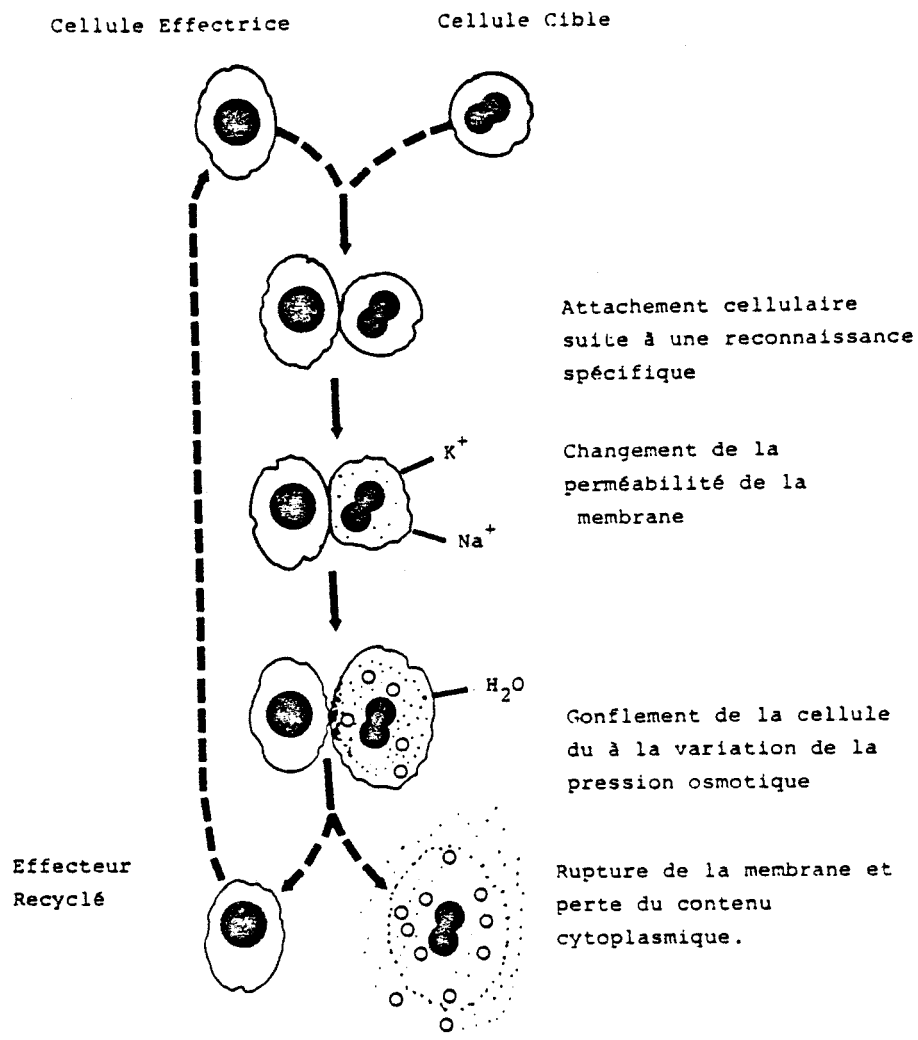


MECANISMES EFFECTEURS EN IMMUNOPATHOLOGIE (J.F. BACH)

Fig. 3-8



variables. Dans certains cas, un contact plus ou moins prolongé de la cellule effectrice et de la cellule cible est indispensable pour que la lyse de cette dernière s'opère (125) (155). D'autres auteurs ont rapporté que les macrophages lysaient les cellules tumorales et non les cellules normales (39) grâce à des facteurs solubles sécrétés par cette cellule. La même controverse s'élève à propos de la cytostase (190,195).



SCHEMA DE LA LYSE PAR CONTACT CELLULAIRE - CELLULE T .
C.S. HENNEY

Fig. 3-9



3.5 L'ACTIVATION DU MACROPHAGE

Les macrophages recueillis *in vitro* adhèrent et s'étalent rapidement sur leur support en déployant une membrane ondulante. L'état "activé" du macrophage peut être amené de différentes manières et mesuré par différents paramètres.

Les activateurs des macrophages sont généralement des particules de corps étrangers. Par exemple des bactéries, des levures, des cellules allogénétiques, des extraits de celles-ci ou encore des antigènes purifiés, des polymères de polysaccharides, des glyco-protéines, des glyco-lipides et certains peptides telle la tuftsin ou le MDP. Il est à noter que certaines substances biochimiquement inertes telles les microsphères de latex qui sont phagocytées, n'entraînent pas une activation des macrophages (119,132,221,228).

La mise en marche du système lysosomal par la fusion des phagosomes-lysosomes est indispensable et requiert une reconnaissance biochimique préalable (43,106).

De manière générale, l'activité métabolique du macrophage est augmentée, telle la consommation d'O₂, la phagocytose, le relargage de superoxyde, l'oxydation du glucose, l'activité de phosphatase alcaline et acide, l'activité peroxidasique, la sécrétion d'enzymes lysosomiaux, la collagenase et l'activateur de plasminogène ainsi que la synthèse de lactate déshydrogénase et du complément (103,218).

L'activation des macrophages peut aussi se faire par les lymphokines (181). Ces lymphokines produites par des lymphocytes stimulés par le PHA ou par un antigène activent les macrophages, même *in vitro* (103,181).

L'activation du macrophage lui confère un potentiel cytotoxique plus élevé, surtout du point de vue de la cytolyse. Cette activité (10

est moins marquée au niveau des produits sécrétés produisant une cytotase. Le macrophage produit du lysosyme de manière continue et ce taux n'est pas particulièrement modifié par l'activation de la cellule (120,48).

La mesure de l'activation du macrophage peut se faire de manière morphologique, augmentation de l'étalement par l'étude de la phagocytose (34) de micro-organismes tués préalablement et marqués par un ^{14}C ou un ^3H , par l'oxydation du glucose ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$. Le contenu de la cellule en DNA n'est pas modifié et le contenu en protéines augmente de 10 à 20 % à 12 heures pour atteindre 100 % à 48 heures (122). La mesure de certains enzymes lysosomiaux telles la β glucuronidase, le N-acetyl glucosaminidase, la Cathepsin D et la phosphatase acide sont de bons paramètres de l'activation (8). tout comme la production de collagénase ainsi que la lactate déshydrogénase, enzyme non sécrété par la cellule et l'activateur du plasminogène (145).

3.6 L'INTERACTION DU MACROPHAGE ET DES LYMPHOCYTES DANS LA REPOSE IMMUNE ET LEURS MODULATIONS RECIPROQUES

Les lymphocytes T et B forment avec le macrophage la trilogie de l'immunité cellulaire. S'il est indéniable que les lymphocytes jouent un rôle prépondérant comme effecteurs de la réponse immunitaire, l'importance du rôle du macrophage a été soumise à de nombreuses fluctuations depuis les travaux de Metchnikoff sur la phagocytose. La découverte des anticorps et du complément a éclipsé le macrophage jusqu'au moment où Fishman et Adler (68) montrèrent que les macrophages pouvaient transmettre un RNA spécifique de l'antigène aux lymphocytes, découverte qui fut reléguée au second plan quand il fut prouvé que les RNA en question étaient couplés avec de l'antigène. Actuellement, on attribue un rôle fondamental au macrophage mais en dehors de la spécificité antigénique. Son rôle important dans la digestion de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes ont été démontrés à suffisance. Sa présence en tant que modulateur de la réponse à l'antigène et aux mitogènes est de plus en plus documentée. Divers auteurs (113,31,48) ont montré que l'élimination des cellules adhérentes aux fibres de nylon, aux surfaces plastiques ou phagocytant les microsphères de carbone ferrique déprimait la réponse proliférative en présence de mitogène tel que la conconavaleine A (Con A) et la phytohémagglutinine (PHA). (150)

Les interactions ont pu être étudiées par la mise en évidence de l'agglutination des lymphocytes auteurs des macrophages péritonéaux. La réaction s'effectue en deux temps. La première étape (29), observée dès la première heure, est indépendante de la présence d'antigène. Elle est réversible, nécessite la présence de calcium, et l'intégralité du métabolisme du macrophage et de ses récepteurs membranaires. Elle est inhibée par l'addition de cytochalasine B, inhibiteur de microtubules , ou par le traitement des macrophages par la trypsine. Les lymphocytes B ou T provenant d'animaux allogénétiques ou syngénétiques sont agglutinés. La deuxième étape,

observée à 24 heures, est dépendante de l'antigène. Seuls les lymphocytes T provenant d'un donneur syngénique sensibilisé à l'antigène sont agglutinés. Il s'agit d'un phénomène irréversible, insensible à la cytochalasine B nécessitant l'intégralité des métabolismes des macrophages et des lymphocytes. L'addition d'allo-anticorps inhibe ce phénomène. Cette interaction macrophage-lymphocyte s'effectue par l'intermédiaire des antigènes d'histocompatibilité contrôlés par la région I du complexe majeur d'histocompatibilité. L'addition d'antisérum dirigé contre les antigènes Ia portés par les macrophages inhibe la transformation en présence d'antigène. Chez l'homme, l'addition d'anticorps anti-HLA-DR supprime la réponse proliférative (7). Ce phénomène est lié à ce qu'on appelle la restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité dont le système général est dénommé H-2 chez la souris et HLA chez l'homme.

La présence de déterminants antigéniques HLA associés à l'antigène et aux substances entrant en jeu dans les mécanismes de prolifération lymphocytaire et de formation d'anticorps optimalise la réaction immunitaire. Ces propriétés du système immunologiques ont été particulièrement étudiés chez la souris (tableau IV).

Les effets stimulants des monocytes-macrophages sont observés pour des lymphocytes de donneur sensibilisé avec des macrophages portant les mêmes antigènes d'histocompatibilité. La réponse proliférative induite par l'antigène peut donc être considérée comme une réaction lymphocytaire mixte autologue vis-à-vis d'antigènes "self" (Ia ou HLA-DR) associés à l'antigène spécifique introduit.

Outre cette interaction directe avec les lymphocytes T, les macrophages ont un effet régulateur de la réponse proliférative, s'exerçant par l'intermédiaire de médiateurs tumoraux, amplificateurs (Lymphocyte Activating Factor, LAF) ou à l'inverse suppresseurs (low molecular weight suppressor), ainsi que d'autres facteurs solubles encore mal connus qui seront étudiés dans ce travail.

Si les macrophages ont un effet sur les lymphocytes, ces derniers peuvent aussi moduler l'activité des macrophages. Un des facteurs les plus connus est sans doute le MIF (Migration Inhibitory Factor) (191).

La libération de MIF par des lymphocytes sensibilisés et cultivés en présence de l'antigène est décelable dès la sixième heure, c'est-à-dire à un stade où ni la transformation blastique ni l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ ne sont décelables. Le MIF est une sialoglycoprotéine correspondant à un poids moléculaire de 20 à 60.000 daltons sensible au chauffage à 56° et altérée après 4 jours de conservation à $+4^\circ$ et par l'action de la trypsine et de la neuraminidase. Le MIF n'est pas une immunoglobuline. Il est cytophile et adsorbé par le macrophage sur des récepteurs contenant du fucose. L'addition de fucose inhibe par compétition l'activité du MIF (7).

Une autre lymphokine active sur le macrophage est le MAF qui augmente la biosynthèse des lipides et glycoprotéines et les taux en enzymes protéolytiques de la cellule ainsi que son pouvoir de phagocytose et de cytolysse non spécifique. La liste (voir tableau IV) des substances médiatrices des fonctions lymphocytaires et macrophagiques est loin d'être épuisée, et de nombreux travaux la documentent ou la renforcent au fil des années (171).

EFFETS BIOLOGIQUES DES PRODUITS D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES (7)

Cellule-cible	Facteur	Effets observés
Macrophage	MIF Facteur d'inhibition de la migration	Inhibition de la migration des macrophages in vitro. Modifications de la membrane.
	MAF "macrophage agglutinating factor"	Agglutination des macrophages en suspension.
	MSF "macrophage spreading inhibitory factor"	Inhibe l'étalement des macrophages sur la surface d'un hématimètre.
	CF "chemotactic factor"	Provoque la migration des macrophages ou des monocytes à travers les pores d'une membrane.
	MAF "macrophage activating factor"	Augmente la consommation d'oxygène, la biosynthèse des lipides et la glycolyse. Stimule la lyse intracellulaire des bactéries phagocytées et la lyse des cellules allogéniques.
	"macrophage arming factor" (1)	Induit ou augmente l'effet cytotoxique des macrophages vis-à-vis de cellules tumorales.
	Anticorps cytophiles	Confèrent une certaine spécificité antigénique à la phagocytose (et à d'autres fonctions du macrophage ?)
Lymphocytes	MMF "macrophage mitogenic factor"	Provoque l'incorporation de thymidine marquée et la multiplication des macrophages.
	Facteur suppresseur	Inhibe le transfert d'HR, se fixe sur les macrophages, supprime l'inhibition de migration des macrophages.
	MF ou BF "mitogenic factor" ou "blastogenic factor"	Provoquent la transformation lymphoblastique et la division de lymphocytes B normaux
	TF "transfer factor" (2) ou "transfer factor-like mediator"	Rend les lymphocytes de sujet non immuns capables de réagir spécifiquement au contact de l'antigène.
	Facteurs "helper" ou suppresseurs	Spécifiques ou non de l'antigène, associés ou non aux antigènes codés par le complexe majeur d'histocompatibilité.



Cellule-cible	Facteur	Effets observés
Polynucléaires neutrophiles	LIF "leucocyte inhibitory factor"	Inhibent la migration des polynucléaires neutrophiles.
	NIF "neutrophil inhibitory factor"	
	CF "chemotactic factor"	Accélère le passage des polynucléaires neutrophiles à travers les pores d'une membrane.
Polynucléaires éosinophiles	ECF "eosinophil chemotactic factor"	Attire les éosinophiles. Agit seul ou en présence de complexes antigène-anticorps.
	"Eosinophil promoting factor"	Augmente la migration des éosinophiles en gel d'agarose.
Lignées cellulaires	LT "lymphotoxine"	Effet cytotoxique sur certaines lignées cellulaires (surtout les cellules L).
	PIF "proliferation inhibitory factor"	Inhibent la prolifération cellulaire et la formation de clones (cellules Hela).
	CPIF "cloning inhibitory factor"	
	IF "interféron"	Diminue l'effet cytopathogène des virus sur des cellules en culture.
Cellules hématoïétiques	CSF "colony stimulating factor"	Stimule la différenciation de cellules souches médullaires en cellules myéloïdes ou monocytaires.
Ostéoclastes	OAF "osteoclast activating factor"	Augmente l'activité ostéoclastique mesurée par libération du ^{45}Ca à partir d'os d'embryon in vitro.
Effets in vivo	SRF "skin reactive factor"	Augmente la perméabilité capillaire mesurée par la diffusion extravasculaire d'albumine marquée. Favorise une réaction inflammatoire dans la peau du cobaye avec infiltration par des cellules mononucléées.
	LNAF "lymph node activating factor"	Augmente le poids du ganglion lymphatique, augmente le nombre de cellules dans les zones thymo-indépendantes.

Cellule-cible	Facteur	Effets observés
	MIF (?)	Diminue le taux des monocytes circulants.

1. Le "macrophage arming factor" a été aussi appelé "specific macrophage arming factor" (SMAF), par référence à une éventuelle spécificité pour l'antigène. On le distingue du "macrophage activating factor", dont l'action n'est pas spécifique de l'antigène.
2. Ce terme est mal choisi car il risque de prêter à confusion avec le facteur de transfert dialysable, facteur extrait des lymphocytes d'un sujet sensibilisé. Le "transfer factor-like mediator" est libéré par les lymphocytes sensibilisés lors d'un contact avec l'antigène spécifique.

CARACTERISTIQUES DES LYMPHOKINES DE COBAYE
ET DU FACTEUR DE TRANSFERT DIALYSABLE HUMAIN (7)

	MIF	Facteur chimio-tactique	Lympho-toxine	Facteur blastogénique	"Skin reactive factor"	Facteur de transfert
Nature chimique	Protéine	Protéine	Protéine	Protéine	Protéine	Ribonucléotide
Poids moléculaire	23 000 à 55 000	35 000 à 55 000	35 000 à 55 000	25 000		700 à 400 (dialysable)
Protéase	Sensible				Sensible	Résistant
DNAase	Résistant		Résistante		Résistant	Résistant
RNAase	Résistant		Résistante		Résistant	Résistant
Neuramidase	Sensible	Résistant	Résistante			Résistant
Chaleur (56°)	Stable	Stable	Sensible		Sensible	Stable
Autres caractéristiques	Mobilité de l'albumine	Mobilité de l'albumine	Mobilité de l'albumine			Non antigénique



3.7 BUT DU TRAVAIL

Les nombreux travaux cités plus haut (parties 1, 2 et 3) ont fait pressentir l'importance du rôle des macrophages dans l'immunologie des tumeurs et en particulier du mélanome.

La présence de nombreux macrophages normaux au sein de ces tumeurs solides et leur rôle démontré d'effecteurs de la réaction immune contre ces tumeurs nous a incité à étudier les mécanismes impliqués dans les effets antitumoraux des macrophages. Dans l'action antitumorale des effecteurs de l'hôte, peu d'éléments immunologiques spécifiques entrent en jeu. La raison en est que la tumeur n'est pas reconnue comme "non soi". Son expression néoantigénique est soit inexistante, soit masquée par les déterminants majeurs d'histocompatibilité, soit excessivement faible. Peu de travaux convaincants ont montré les capacités spécifiques des effecteurs tels les lymphocytes et les macrophages vis-à-vis des tumeurs. Au contraire, des travaux ultérieurs ont établi le rôle non spécifique des cellules effectrices dans la défense de l'hôte contre sa tumeur.

Notre travail a ainsi surtout porté sur l'action non spécifique des macrophages sur les cellules tumorales in vitro. Nos efforts se sont focalisés sur l'étude de deux paramètres. La cytolyse qui est la capacité pour un effecteur de lyser la cellule cible et la cyto-stase qui est la capacité d'inhiber sa croissance et son métabolisme. La cytolyse a été étudiée dans la partie 4. Le nombre d'effecteurs étant très important, il nous a paru intéressant d'étudier un paramètre plus discret de la cytotoxicité, la cyto-stase. Dans la partie 5 nous avons développé et standardisé un système en microculture de cellules in vitro capable de déceler les plus fines perturbations des métabolismes des cellules cibles grâce à l'utilisation des précurseurs radioactifs. Nous avons pu de ce fait étudier, entre autre, l'effet des sécrétions de macrophages sur divers paramètres métaboliques de la cellule cible et en particulier ceux des synthèses

pyrimidiques précurseurs du DNA. La mise en évidence d'un des facteurs cytostatiques sécrétés par les macrophages nous a conduit à explorer le phénomène. Nous avons pu démontrer que le macrophage produit une quantité très importante de thymidine. Les mécanismes de production et de régulation ont été étudiés chez cette cellule dans des populations normales et transformées par des méthodes biochimiques (partie 6).

Alors que les macrophages normaux peuvent produire des substances capables d'affecter les métabolismes des cellules tumorales, les macrophages activés par divers immunoadjuvants peuvent montrer d'autres propriétés effectrices.

C'est l'objet de la partie 7 où nous avons étudié l'activation des macrophages par le glucan et l'interférence d'un serum antimacrophage, dont nous avons déterminé le titre et la spécificité, sur ce processus.

IV

ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DU MACROPHAGE
SUR DES CELLULES TUMORALES IN VITRO

4.1 INTRODUCTION

4.1.1 La cytolyse.

Un effecteur cellulaire ou autre peut avoir une action toxique vis-à-vis d'une cellule. Le test du relargage du chrome 51 permet de détecter et d'évaluer l'action cytolytique de l'effecteur vis-à-vis de la cible. Le principe en est le suivant : l'ion chromate ($^{51}\text{Cr O}_4$)²⁻ est incorporé par la cellule cible et est retenu dans le cytoplasme pour une période de temps relativement longue pour autant que la cellule soit intacte. Le relargage spontané du chrome dans le milieu est relativement faible. Lors de la lyse cellulaire, le ^{51}Cr est rapidement relargué et permet de quantifier le phénomène de cytolyse. Bien que peu de choses soient connues sur les propriétés biochimiques de la molécule marquée libérée, il semble que cette molécule ne soit pas réincorporée dans des cellules non lysées ou par les cellules effectrices cytotoxiques comme les lymphocytes ou les macrophages (22,47,50).

On peut donc dire que le ^{51}Cr relargué est fonction de l'effet cytolytique des cellules effectrices dans ce cas (12).

Ce test est limité à des cellules qui ont un taux de relargage spontané assez faible. Généralement, 24 heures est une période d'incubation maximum. De plus, un nombre relativement grand de cellules est requis (minimum 10^4 cellules pour un milliCurie de $\text{Na}_2^{51}\text{Cr O}_4$ ml^{-1}) et le nombre de cellules effectrices doit être au moins égal

à celui des cellules cibles.

Les résultats sont calculés en pourcentage de relargage de ^{51}Cr par la formule :

$$\% \text{ de lyse spécifique} = \frac{\text{CPM } ^{51}\text{Cr testé} - \text{CPM } ^{51}\text{Cr spontané}}{\text{CPM } ^{51}\text{Cr max.} - \text{CPM } ^{51}\text{Cr spontané}}$$

Le relargage maximum est obtenu par la lyse totale des cellules (NaOH 1N par ex.).

Dans ce chapitre, nous montrerons, outre la standardisation de la méthode au ^{51}Cr et la comparaison de l'action de divers effecteurs, son utilisation dans l'étude de la cytotoxicité des macrophages normaux ou activés vis-à-vis de cellules tumorales in vitro.

4.1.2 Les paramètres de la cytolysse due au macrophage.

La cytotoxicité due au macrophage dépend beaucoup de son état d'activation, mais aussi du rapport cellules effectrices - cellules cibles, du temps d'action et éventuellement de produits augmentant la cytotoxicité de la cellule comme le lysozyme. Dans ce chapitre, nous étudierons l'incidence de ces divers paramètres sur la réponse du système.

Ce chapitre traitera également de la comparaison entre cytolysse et cytostase grâce, respectivement, au test de relargage du chrome 51 et au test d'incorporation de thymidine tritiée.

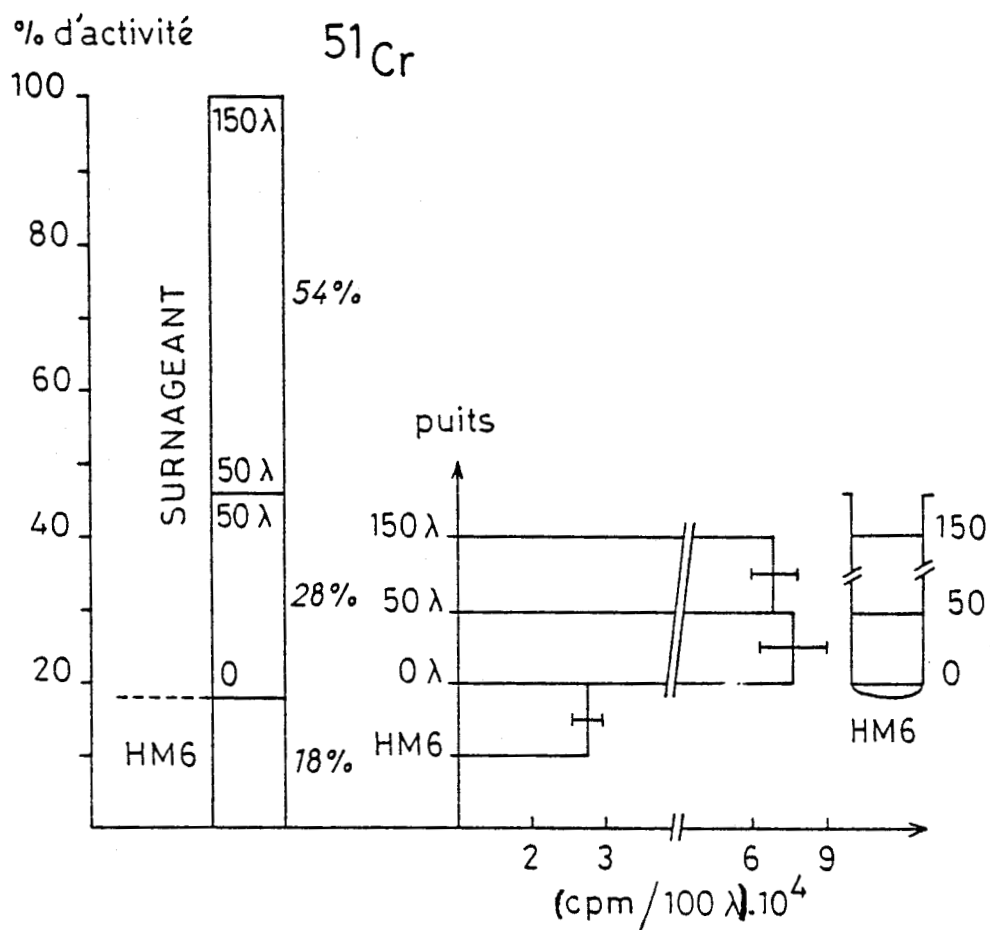


Fig. 4-1

Etude du gradient de concentration en ^{51}Cr relargué par les cellules cibles dans les puits. Nombre de cellules : $1,5 \cdot 10^4$ HM6 par puit.

4.2 MATERIEL ET METHODES

4.2.1 Mesure de la cytolyse par le test de relargage du ^{51}Cr chrome.

On incube généralement les cellules pendant 24 heures dans un milieu de culture adéquat contenant de 10 à 15 μCi de ^{51}Cr par ml. Ce marquage peut se faire dans le récipient "banque" avant la trypsinisation, le lavage et la distribution dans les micro-puits de 200 μl ou dans les puits eux-mêmes après distribution des cellules. Dans le cas de cellules très adhérentes tels les macrophages qui résistent à la trypsine, la distribution préalable est indispensable.

Après le temps d'incubation, on enlève le milieu de marquage, on lave trois fois avec du PBS et on ajoute 200 μl de milieu contenant les effecteurs cellulaires ou autres (Fig. 4-1).

A la fin du temps d'incubation décidé, un aliquot ou même la totalité du surnageant est récupéré et compté au compteur γ (Packard). On traite les valeurs recueillies par l'équation reprise dans l'introduction.

Les tests sont effectués en triplicats. Les résultats sont exprimés par la moyenne des trois valeurs et l'erreur standard. Afin de discerner le seuil de probabilité de certaines valeurs, on utilisera le test de Student. Lors du prélèvement des puits, il n'y a pas de différence entre le taux de comptage des 50 premiers μl et celui des 100 μl suivants. La prise de surnageants peut se faire à n'importe quelle hauteur dans le puit, pour autant que l'on n'aspire pas de cellules.

4.2.2 L'activation des macrophages.

4.2.2.1 In_vivo.

72 heures avant le prélèvement des cellules effectrices macrophages, les souris sont traitées i.p. par une injection de 1 mg/ souris de BCG (Institut Pasteur Production, Paris), de glucan (don de Mr. Di Luzio, New Orleans, U.S.A.) ou de corynebacterium parvum (Wellcome Corporation) dans 1 ml PBS. Les témoins reçoivent 1 ml PBS i.p.

4.2.2.2 In_vitro.

Le lysozyme (don du Prof. Schnek, Laboratoire de chimie des protéines, ULB) est ajouté aux concentrations prévues lors de la mise en culture des cellules effectrices sur les cellules cibles.

4.2.2.3 Test_d'incorporation_de ³HTdr.

La méthode utilisée est décrite au chapitre suivant, ainsi que les cellules et lignées cellulaires utilisées (page 71).

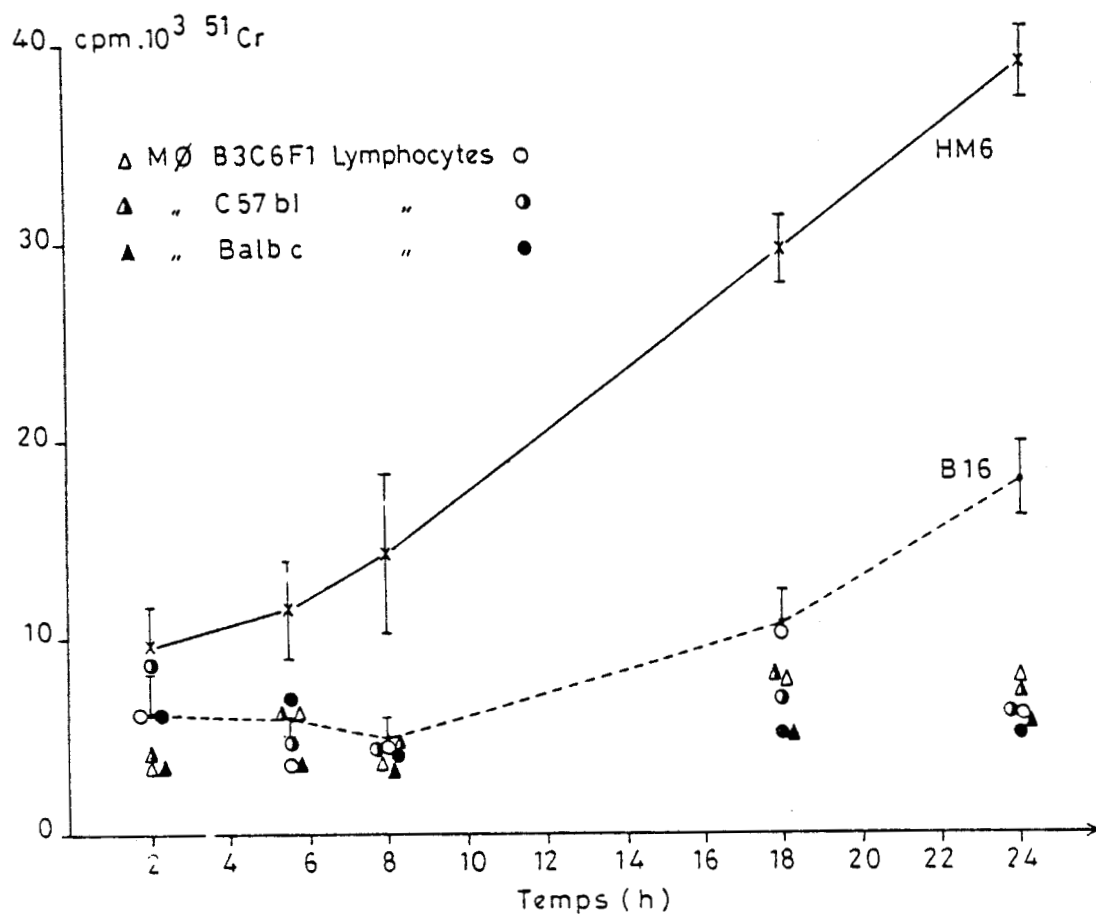


Fig. 4-2

Cinétique d'incorporation du ^{51}Cr par $2 \cdot 10^4$ cellules de macrophages, lymphocytes, mélanome humain HM6, mélanome B16 dans les micropuits.



4.3 RESULTATS

La figure 4-2 nous montre d'une part une incorporation croissante de marqueur par les cellules tumorales et d'autre part une stagnation de l'incorporation par les macrophages et les lymphocytes. Nous pouvons en conclure, pour ces deux derniers, à une saturation des membranes et du cytoplasme due au fait que ces cellules ne se reproduisent pas dans des conditions normales. Les cellules tumorales sont en croissance quasi exponentielle et, après 24 heures, ont incorporé jusqu'à 20 % de l'activité du milieu.

Le relargage spontané des cellules cibles utilisées dépasse rarement les 30 % après 24 heures. La figure nous montre ce phénomène pour des cellules HM6. Le point à 1 heure post ensemencement correspond à la période d'adhérence des cellules.

4.3.1 Effet de divers effecteurs cytotoxiques sur le relargage du ^{51}Cr .

Afin de quantifier et d'obtenir des valeurs de références nous permettant de comparer les effets de toxicité cellulaire, nous avons testé le système dans différents types de conditions de toxicité. La figure 4-4 nous montre l'effet de la variation du pH vers le basique sur le relargage du ^{51}Cr ainsi que l'effet de la variation de la pression osmotique sur le paramètre de lyse cellulaire. La figure 4-5 illustre l'effet de l'anticorps antimacrophage décrit dans le chapitre 7 en présence et absence de complément de cobaye. La lyse du macrophage en absence de complément exogène s'expliquerait par le fait que le macrophage est lui-même producteur des facteurs du complément. La partie centrale de la figure 4-5 montre l'effet du gel/dégel sur le relargage du ^{51}Cr par les cellules lysées.

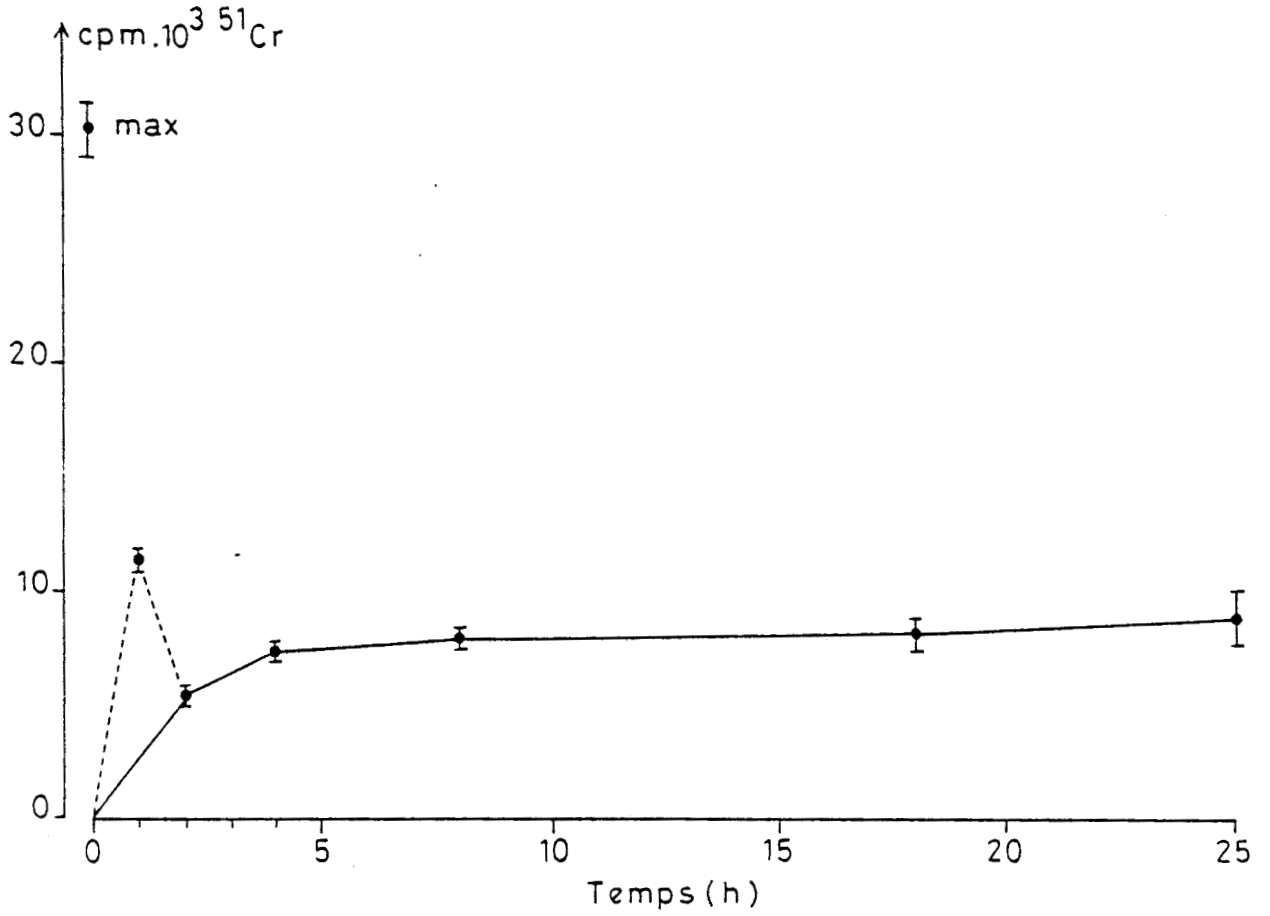


Fig. 4-3

Relargage spontané de ^{51}Cr par $7 \cdot 10^4$ HM6 par puit. Le premier point artéfactuel correspond à l'aspiration de cellules non encore adhérentes.



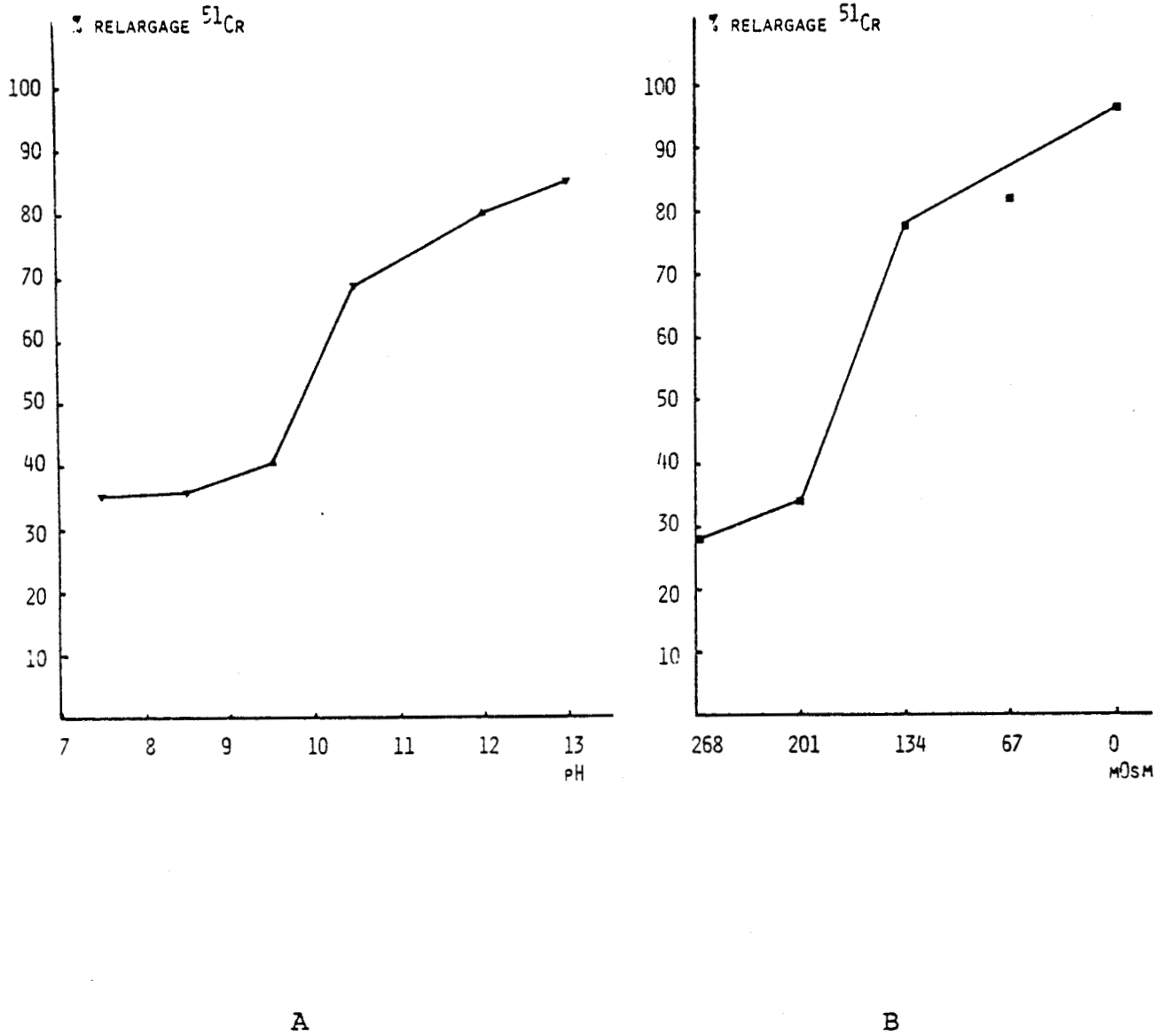


Fig. 4-4

- a) Effet de la variation du pH de 7 à 13 sur le relargage du ^{51}Cr par des cellules cibles HM6.
- b) Effet de la variation de l'osmolarité sur ce même phénomène.



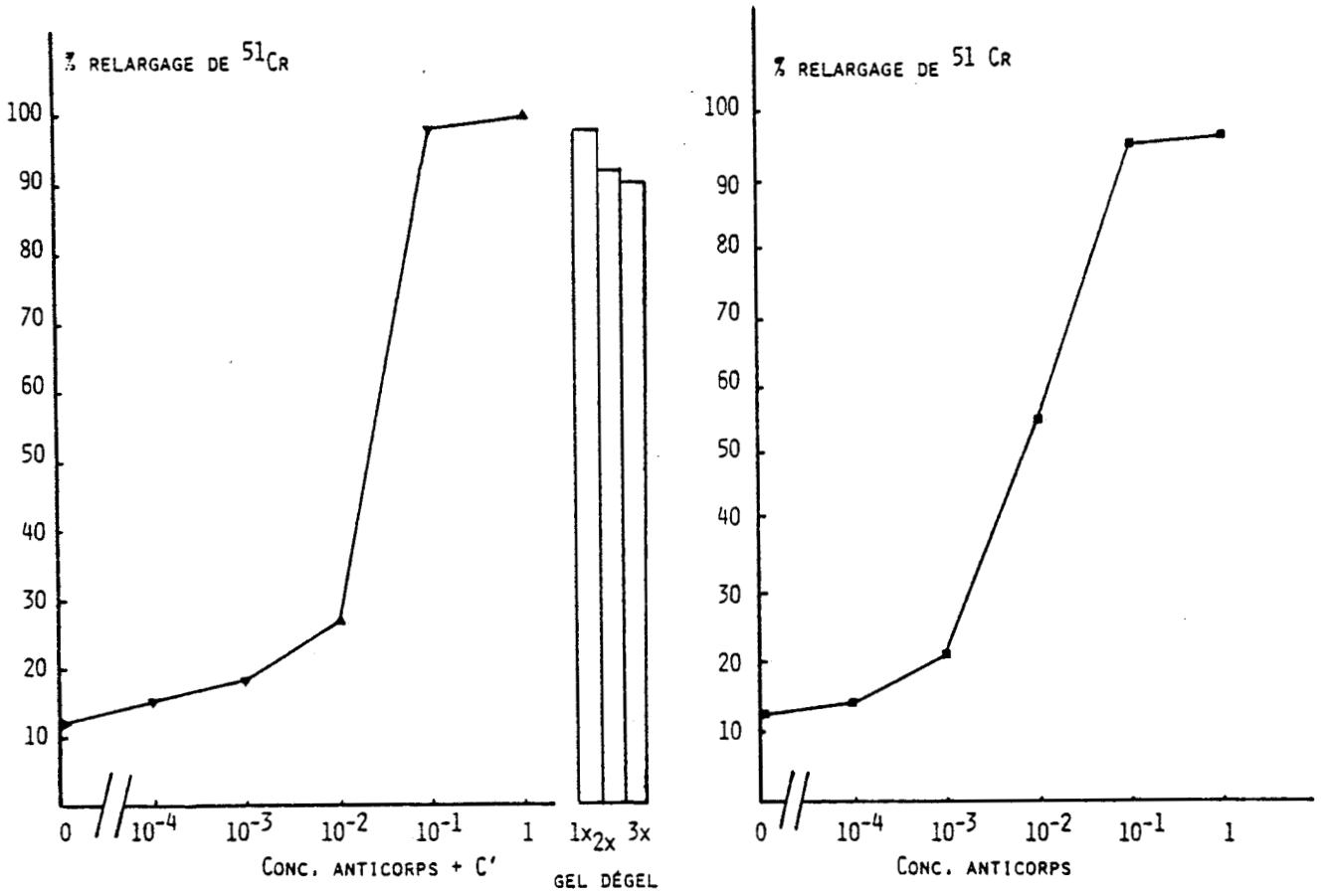


Fig. 4-5

Effet de l'anticorps antimacrophage sur la lyse de cette cellule avec et sans complément de cobaye. Centre : effet de gel/dégel sur la lyse cellulaire.

BHS
LILLE

4.3.2 Effet du rapport cellules effectrices / cellules cibles.

Un des paramètres les plus délicats à maîtriser est celui du rapport cellules effectrices / cellules cibles. En effet, d'une expérience à l'autre, la réponse varie sensiblement sans que l'on puisse vraiment y appliquer un coefficient de correction.

En général, on obtient une réponse significative au-delà de 10 : 1 et parfois jusqu'à 5 : 1 lorsque les cellules effectrices sont bien activées et ce pour une cytotoxicité non spécifique. Nous ne parlerons pas ici du cas de cytotoxicité cellulaire dépendant de la présence de l'anticorps qui est un phénomène plus complexe, difficilement perceptible au niveau des interactions tumeurs-cellules immunitaires.

Le taux de cytotoxicité des macrophages est fonction, outre de la sensibilité des cellules cibles, du nombre de cellules effectrices, du temps d'incubation, de l'état d'activation métabolique des macrophages mais aussi des constituants de l'environnement cellulaire.

Les figures 4-6 (a) et (b) montrent l'effet du rapport cellules effectrices / cellules cibles des macrophages résidents et activés par le BCG et le glucan.

Le milieu de culture et ses constituants sont aussi très importants. La figure 4-7 montre l'effet de synergie du lysozyme sur l'action cytolytique des macrophages résidents et activés.

La figure 4-8 nous montre l'effet du rapport macrophages/cellules HM6 sur le relargage du ^{51}Cr . Les macrophages sont des cellules normales non activées.

L'activation du macrophage par des immunoadjuvants comme le glucan, le BCG ou le corynebacterium parvum apporte à ceux-ci une cytotoxicité plus élevée.

L'état d'activation des macrophages stimulés par des substances immunoadjuvantes ou plutôt immunomodulatrices, le rapport cellules

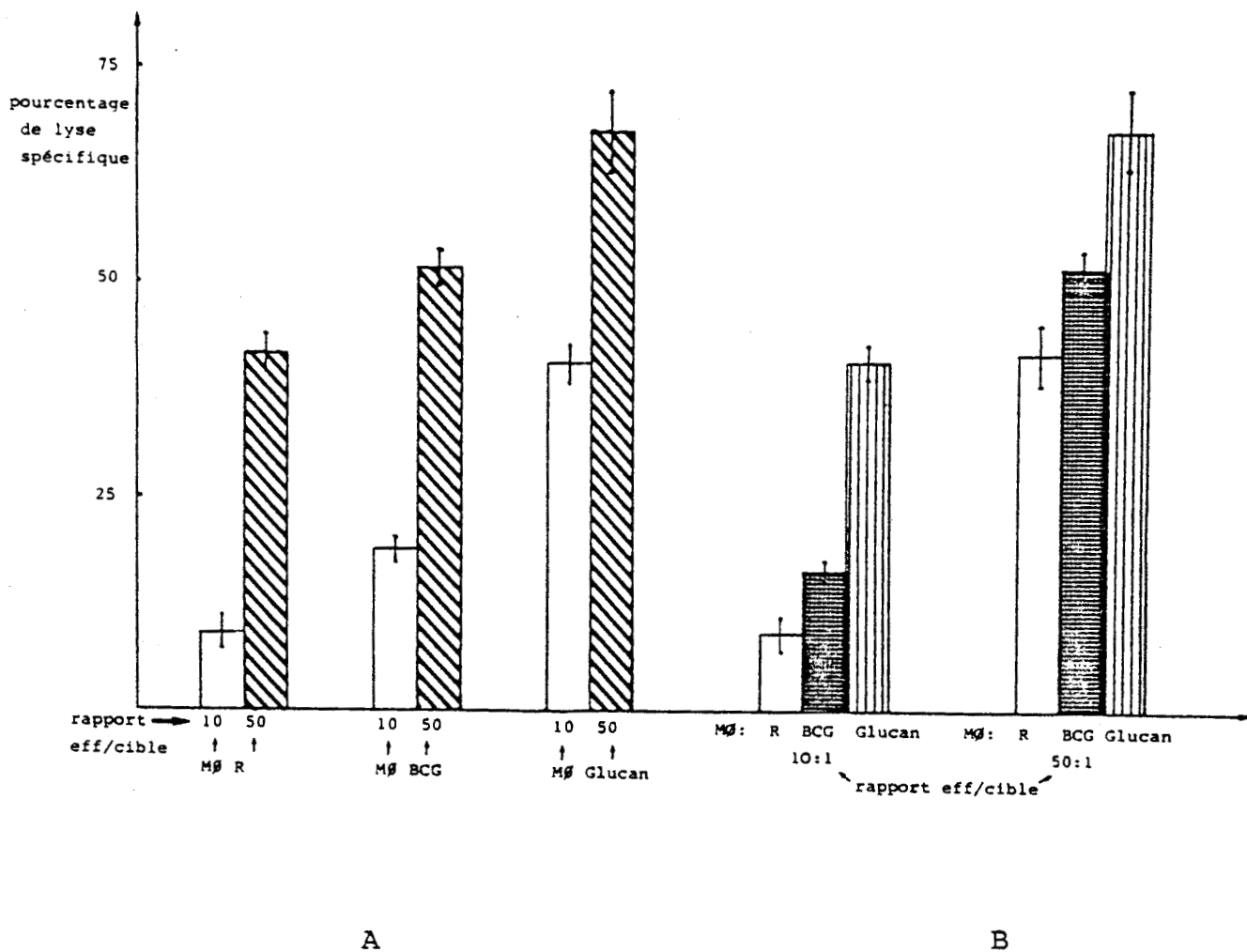


Fig. 4-6

Etude de la cytotoxicité des macrophages résidents et activés par le BCG et le glucan et de l'effet du rapport cellules effectrices/cellules cibles à 10 et 50 contre 1.



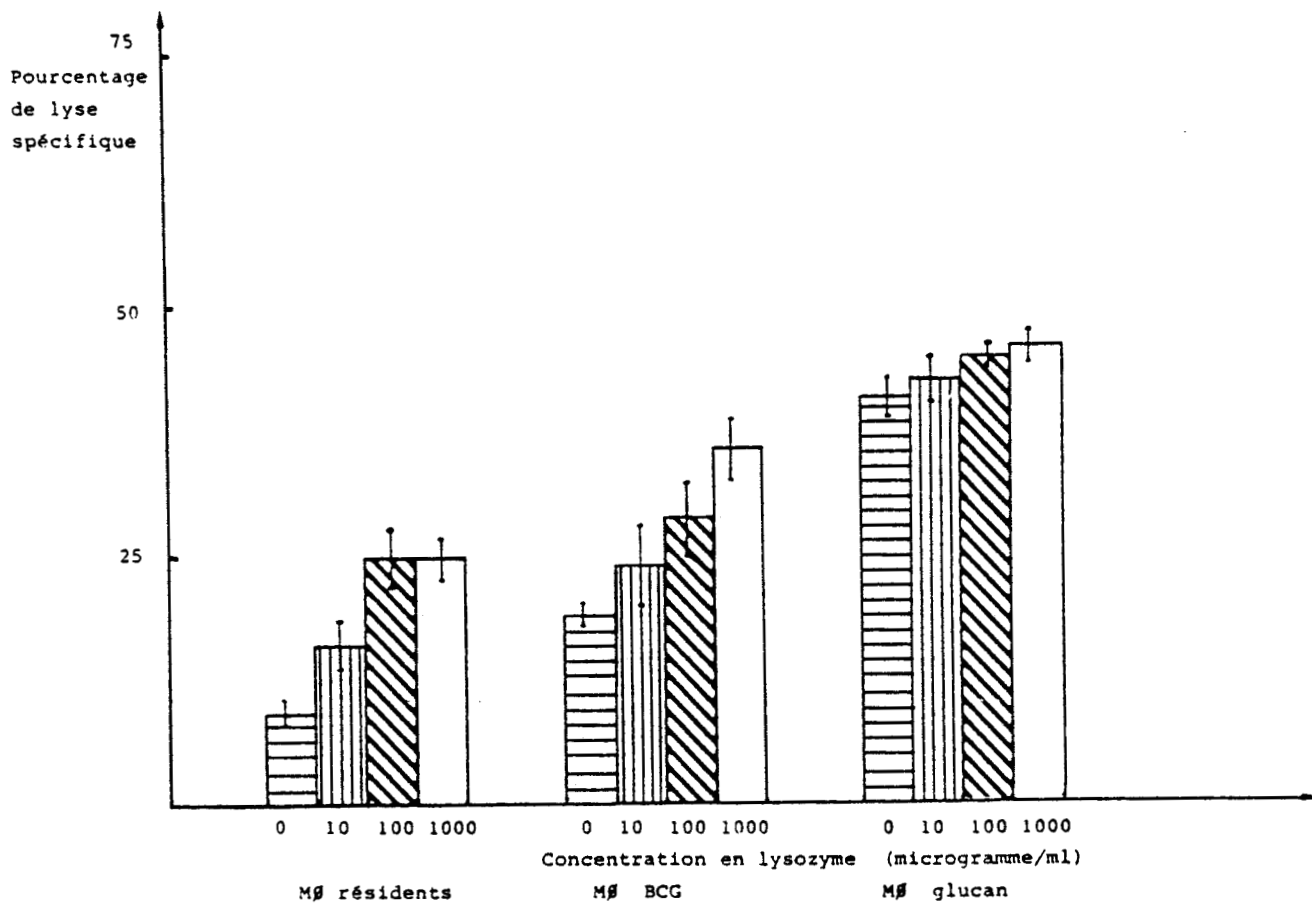


Fig. 4-7

Effet d'amplification de la cytotoxicité des macrophages résidents et activés par le BCG et le glucan, par le lysozyme.



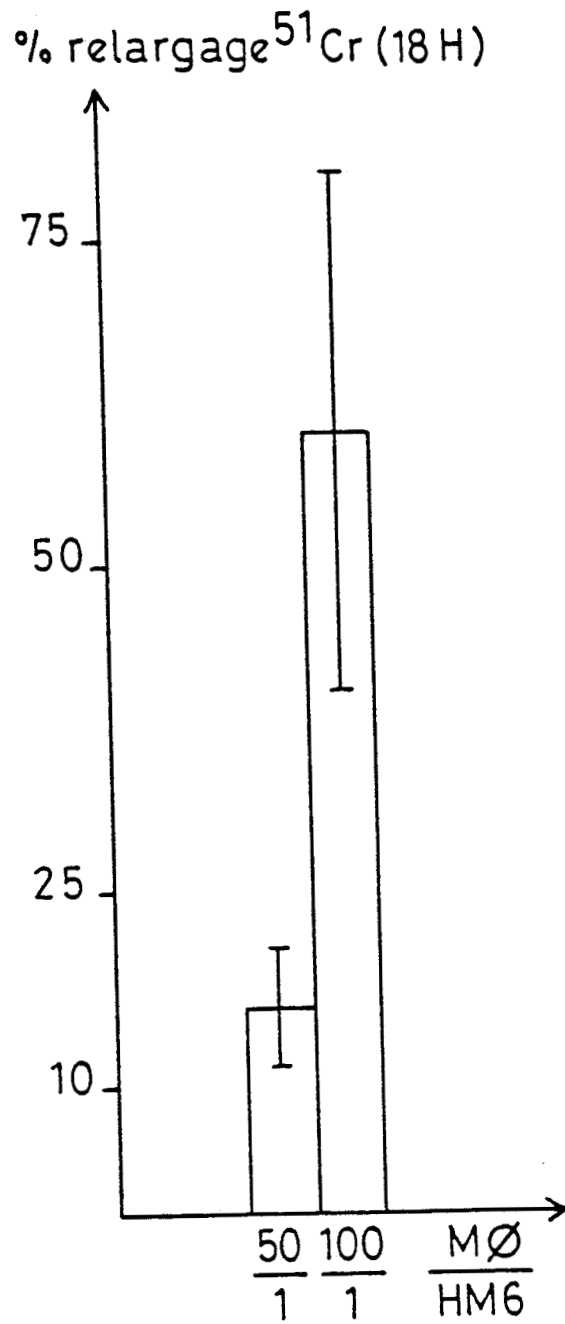


Fig. 4-8

Pourcentage de relargage du ^{51}Cr par les HM6 sous l'influence cytotoxique des macrophages Balb/c non activés. Effet du rapport effecteur/cible macrophage/HM6.



effectrices/cellules cibles, le temps d'action et les compléments de lyse sont les paramètres essentiels de la cytotoxicité cellulaire. Le β 1-3 glucan apparaît comme étant l'activateur le plus efficace vis-à-vis de la cytotoxicité résultant de l'activation des macrophages, dans les expériences de relargage de ^{51}Cr par les cellules cibles constituées du mélanome B16 de souris.

Le mécanisme de cytotoxicité est fort complexe et mal connu. Certaines substances, telle la cytochalasine B, sont capables de l'inhiber et d'autres susceptibles de l'augmenter. Tel est le cas du lysozyme.

La figure 4-7 nous montre l'effet complémentaire qu'a le lysozyme sur la lyse des cellules cibles B16 par des macrophages normaux et activés. Ce type de complémentarité s'apparente à celle décrite par Muschel et al. (170) où le lysozyme augmente la cytotoxicité de l'anticorps + complément vis-à-vis de micro-organismes infectieux.

Les expériences démontrent que le lysozyme a un effet additif vis-à-vis de la lyse par les macrophages. L'effet est d'autant plus marqué que les cellules effectrices sont peu activées. En effet, les macrophages activés relarguent une certaine quantité d'enzymes lysosomiaux qui participent à cette toxicité. L'adjonction de lysozyme potentialise relativement moins les cellules déjà hautement cytotoxiques par elles-mêmes.

4.3.3 Comparaison de la cytolyse et de la cytostase.

Les effecteurs cytotoxiques sont de deux types. Soit directement cytolytiques, soit, de manière plus subtile, cytostatiques. Nous avons vu ce qu'était la cytolyse. La cytostase est en fait l'inhibition de la croissance cellulaire par la perturbation d'un ou de plusieurs métabolismes de base entraînant une paralysie cellulaire et, à terme, une mort suivie de la cytolyse proprement dite.

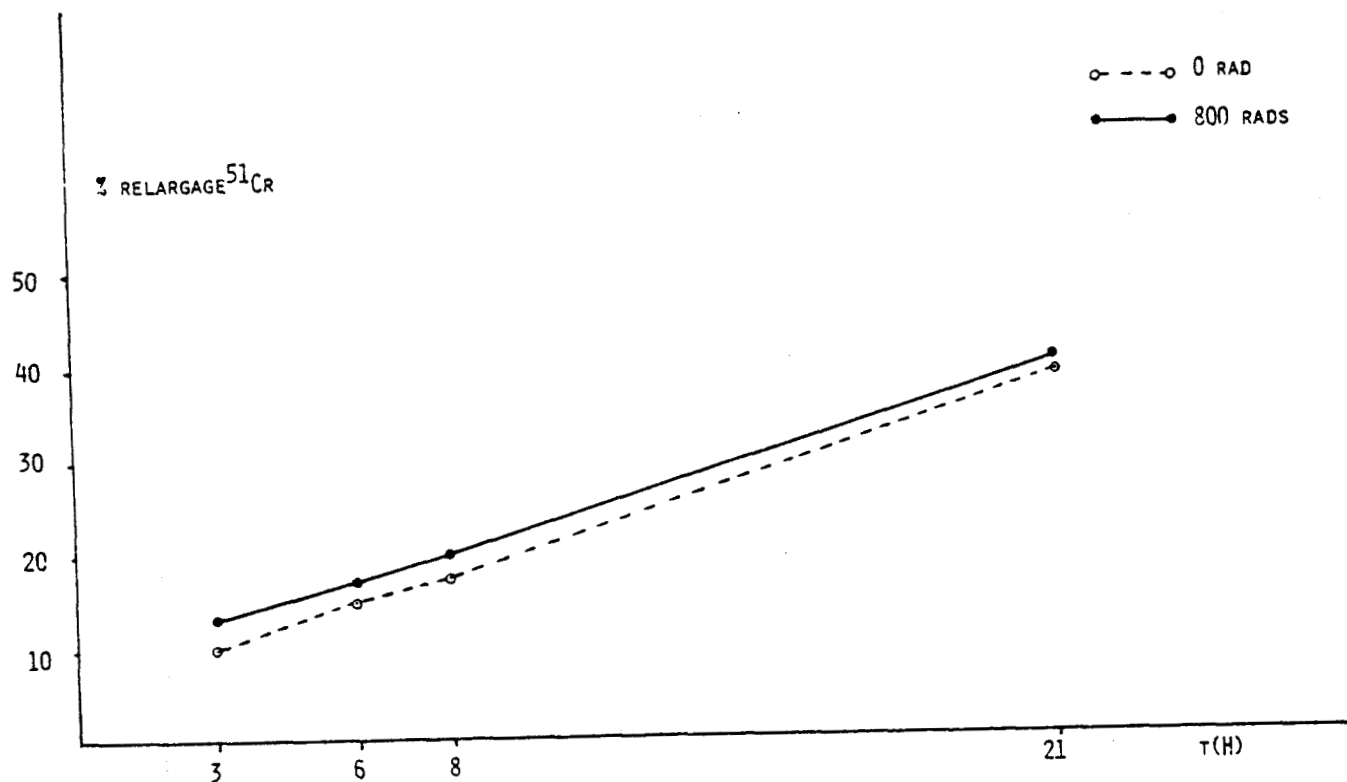


Fig. 4-9 a

- a) Effet de l'irradiation des cellules cibles sur le relargage du ^{51}Cr comparée à (b) l'effet sur l'incorporation du précurseur du métabolisme du DNA, la thymidine tritiée.



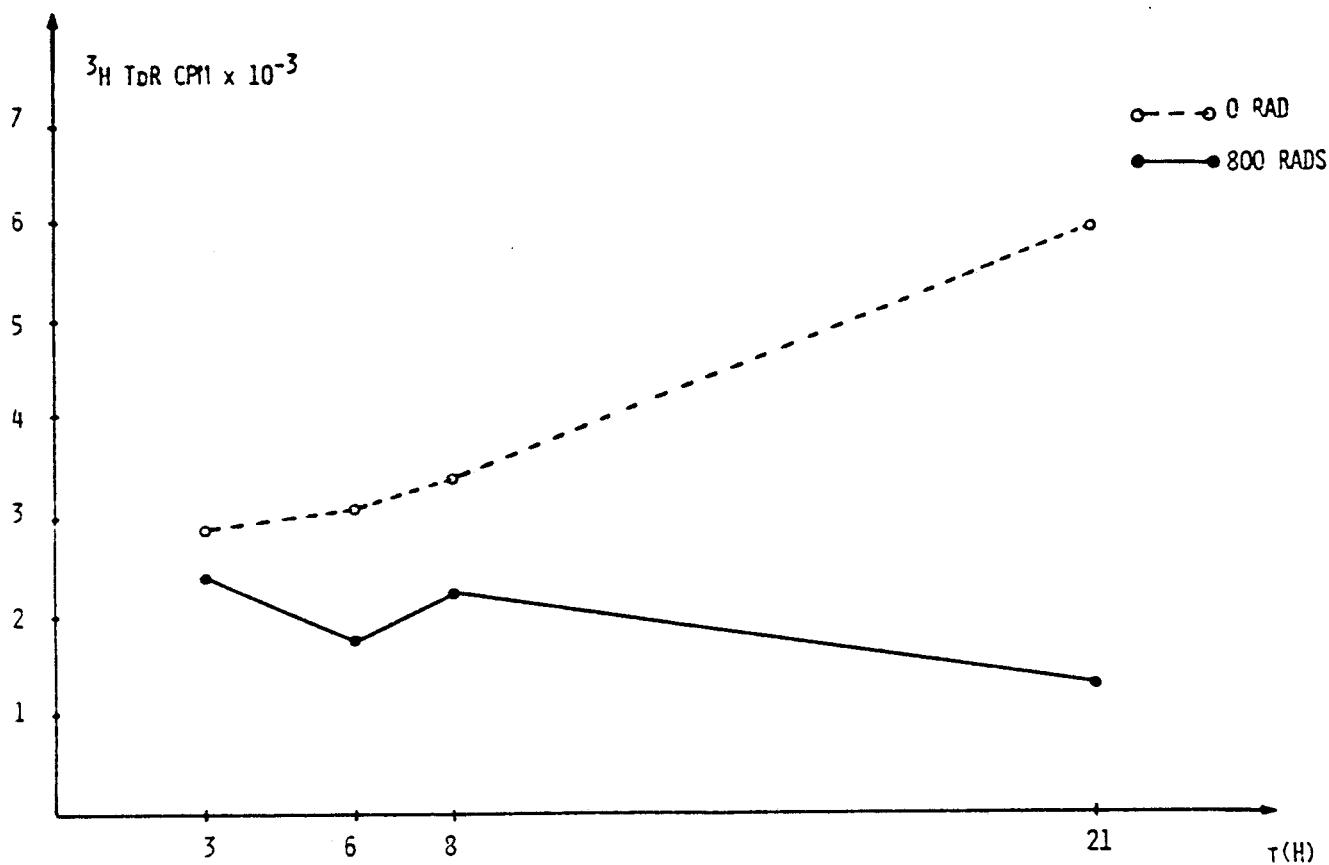


Fig. 4-9 b

b) l'effet sur l'incorporation du précurseur du métabolisme du DNA, la thymidine tritiée.



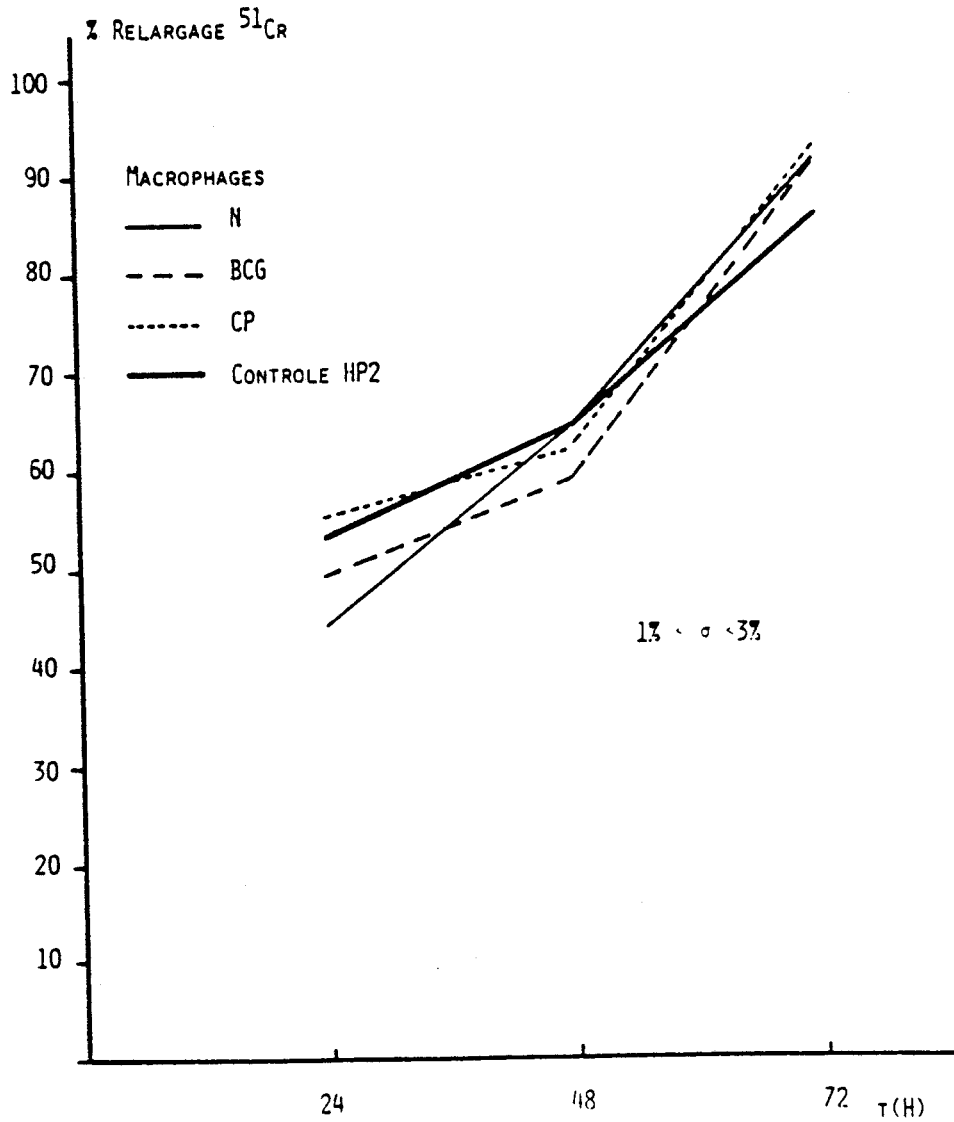


Fig. 4-10 a

Comparaison de l'effet des macrophages au rapport de 1 à 1 sur
 a) la cytolyse des cellules cibles tumorales et

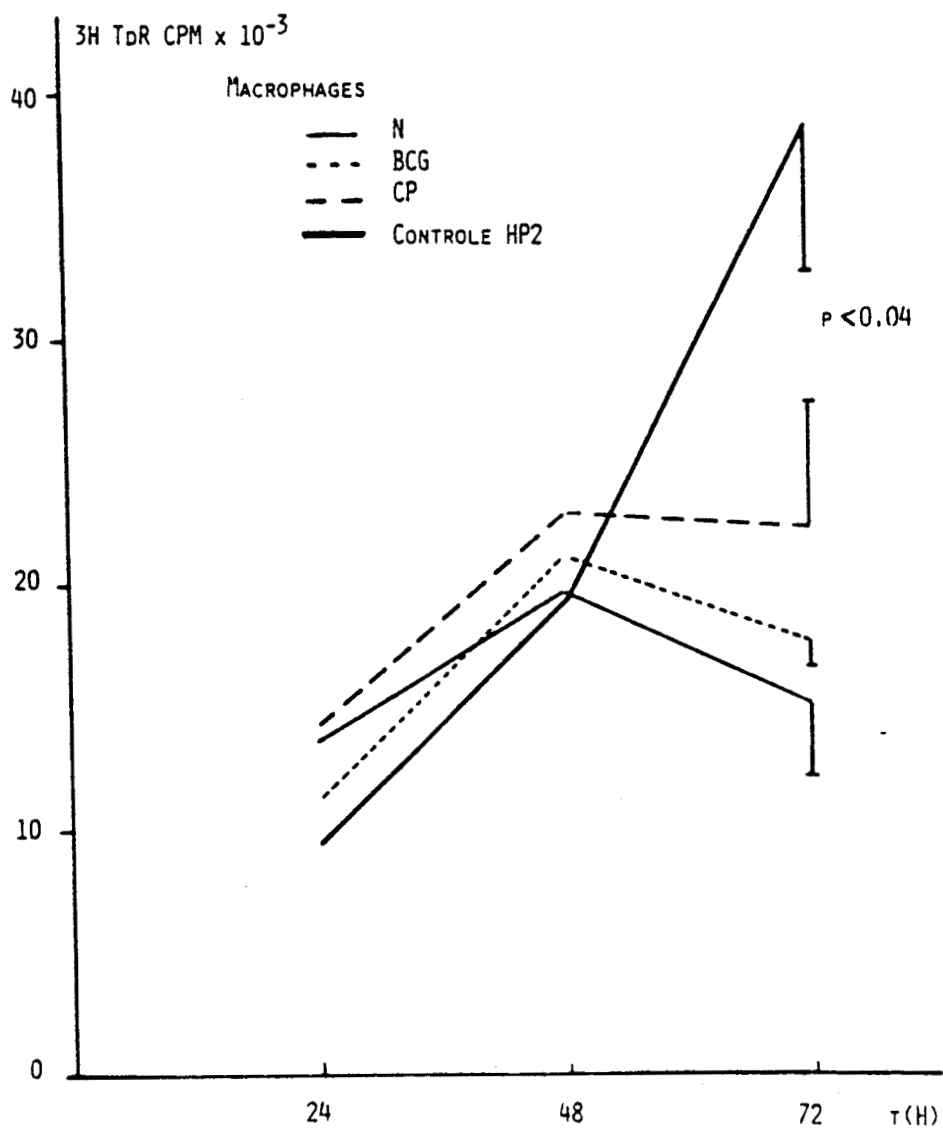


Fig. 4-10 b

b) la cytotostase mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée.



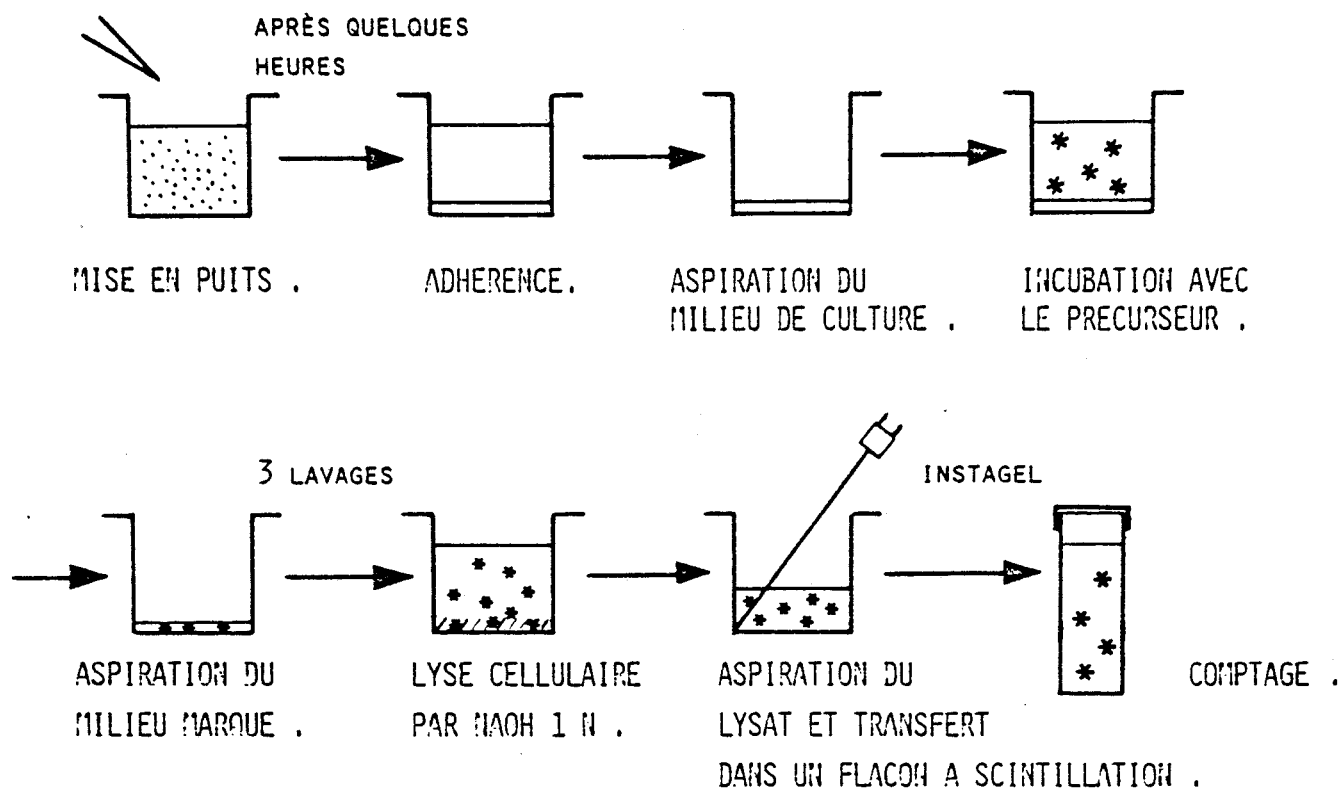
Les figures 4-9 a et b illustrent le cas typique des cellules ayant subi une irradiation de 800 rads. Malgré une légère différence, cette agression ne provoque pas de lyse cellulaire significative à court terme. Par contre, les métabolismes de base sont perturbés et notamment celui de la synthèse du DNA. L'incorporation de thymidine tritiée est fortement déprimée au bout de 24 heures. L'étude des métabolismes spécifiques d'une cellule à l'aide de marqueurs biochimiques appropriés est une méthode plus fine permettant d'évaluer les perturbations provoquées par un effecteur non cytolytique.

Les figures 4-10 a et b montrent en effet la comparaison entre l'action du macrophage sur des cellules de mélanome en utilisant les deux systèmes de mesures, le relargage du ^{51}Cr et l'incorporation de la $^3\text{HTdR}$.

Le rapport cellules effectrices/cellules cibles est ici de 1:1. Dans ce cas, on n'observe pas d'activité cytolytique significative. Cependant, l'utilisation du test de l'incorporation du précurseur de métabolisme du DNA $^3\text{HTdR}$ laisse apparaître au-delà de 48 heures une diminution significative de l'incorporation. L'état d'activation du macrophage ne joue pas de rôle à ce niveau critique de faible interaction.

4.3.4 Discussion.

La cytotoxicité à médiation cellulaire est un phénomène important dans la lutte de l'hôte contre un agent infectieux ou toute autre agression comportant des cellules et en particulier les tumeurs. Il est indispensable de posséder des systèmes permettant de mesurer ce phénomène. Outre les techniques de comptage des cellules viables par exclusion du bleu trypan, nous avons utilisé, en les simplifiant et en les miniaturisant, la technique de relargage du ^{51}Cr et celle d'incorporation de précurseurs métaboliques marqués et en particulier ceux du métabolisme du DNA qui est certainement un des plus essentiels pour la cellule.



SCHEMA DU PROCESSUS DE MARQUAGE DES CELLULES ET D'EXTRACTION DE L'ACTIVITE

Fig. 4-11

Schéma du processus de marquage des cellules par des molécules marquées aux isotopes et extraction de l'activité en microméthode.

Ce chapitre nous permet d'évaluer les résultats très reproductibles de ce test. En effet, les figures 4-6 et 4-7 nous montrent que l'erreur est très faible. La miniaturisation apporte, grâce à sa plus grande maniabilité et son plus faible encombrement, une meilleure reproductibilité que les méthodes utilisant plus de cellules dans une quantité plus importante de milieux de culture en tubes à essais (Fig. 4-11).

Le test au chrome nous donne des valeurs interprétables dans la mesure où il y a bien eu lyse cellulaire. Cependant, dans le cas où la lyse n'est pas évidente mais où l'on soupçonne une lésion ou une perturbation plus fine, la technique d'incorporation de précurseurs de métabolismes tels que la thymidine tritiée est le complément idéal du test de relargage du chrome.

L'expérience comparative de la cytotoxicité cytolytique et cytostatique du macrophage montre que les deux phénomènes se recouvrent partiellement. Les fonctions cytostatiques du macrophage au travers de la sécrétion de médiateurs solubles revêtent une importance considérable si l'on veut comprendre l'interaction des cellules en présence. La découverte de ces modulations fines est aussi passionnante que la mise en évidence d'une cytolyse apparemment plus spectaculaire mais parfois moins perceptible au niveau de la causalité.

ETUDES, IN VITRO, DES METABOLISMES CELLULAIRES
EN MICROMETHODES. MISE EN EVIDENCE DES FACTEURS
CYTOSTATIQUES SECRETES PAR LES MACROPHAGES.

5.1 INTRODUCTION

Pendant longtemps, le seul critère de l'effet d'une drogue, d'un anticorps ou d'un effecteur cellulaire était le comptage des cellules résistantes et viables, soit sous forme du nombre de colonies lorsque les cellules pouvaient cloner sur agar ou plastique, soit au nombre total de cellules viables au bout de quelques cycles mitotiques (114,196).

Le développement des marqueurs moléculaires isotopiques a permis de suivre de manière plus précise l'évolution des métabolismes cellulaires plus spécifiques en relation avec la survie ou la croissance cellulaire. L'autoradiographie, alliée à l'usage de ces précurseurs, a permis de mettre en évidence les sites d'activités métaboliques dans les organes et les cellules. Le désavantage de ces méthodes est d'être assez fastidieux et de ne mesurer qu'un effet à long terme d'un modulateur stimulant ou toxique. L'étude de la viabilité cellulaire à court terme est possible par la méthode du colorant vital telle la méthode d'exclusion du bleu trypan. Outre son côté fastidieux, cette technique ne donne qu'un aspect limité de l'action de l'effecteur. En effet, au dehors d'un effet cytolytique proprement dit, et dont nous parlerons plus loin, une cellule peut être perturbée métaboliquement de manière plus discrète et transitoire par des médiateurs à demi-vie indéterminée et parfois très courte. La mise en évidence in vitro de ces phénomènes est capitale et nécessite des techniques plus raffinées faisant appel à la spécificité des précurseurs, à la reproductibilité et si possible à la

miniaturisation de la technique. Nous avons développé une microméthode de mesure de la synthèse nucléique par l'incorporation de précurseurs de synthèse de nucléosides et nucléotides dans un système de micropuits de culture, avec des cellules transformées ou non. La standardisation et l'étalonnage de ces méthodes nous ont permis d'étudier l'effet de divers agents modulateurs de la réponse et notamment des facteurs solubles sécrétés par des cellules effectrices aux divers stades d'activité ou d'activation tel le macrophage. (24,37,39,45,55,117,122,125,138,139,173-175,182)

5.2 MATERIEL ET METHODES

5.2.1 Les animaux.

Des souris mâles et femelles des souches C57bl, Balb/c, BDF1 (obtenue par la voie du National Cancer Institute Liaison Office à l'Institut Bordet), GIF ESP (Ecole de Santé Publique de l'Université Catholique de Louvain) ont été utilisées dans ce travail.

5.2.2 Les cellules.

5.2.2.1 Les macrophages.

Les macrophages, activés ou non par les immunomodulateurs injectés intrapéritonéalement, sont récoltés par lavage péritonéal des souris à l'aide du milieu de culture MEM + 15 % FCS h.i. Les cellules sont transférées dans une boîte de culture et laissées à adhérer pendant 2 heures en l'absence de sérum. On les rince 4 fois avec du MEM afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Du milieu frais contenant 15 % de sérum de veau foetal est ajouté pour obtenir 10^6 cellules/ml de concentration finale. Les cellules sont comptées en utilisant une grille de l'oculaire du microscope inversé. Quatre champs sont pris au hasard et comptés. Ce nombre nous donne la densité cellulaire par unité de surface. (60,79).

5.2.2.2 Les lignées de macrophages transformés.

IC21 : Macrophages péritonéaux de souris C57bl transformés par le virus SV40 (157,158).

P 388 D₁ : Proviennent de souris DBA/2 porteuses de leucémie
P 388 D (A₂15₁41).

J 774 A : Macrophages de souris transférés par virus (A₂74).

Ces lignées ont été fournies gracieusement par :

J 774 A et P 388 D₁ : Dr Van Loveren, Rijks Universiteit
Utrecht, NL.

IC21 : Dr Mael, Ludwig Institute, Lausanne, CH.

5.2.2.3 Les lignées de cellules tumorales.

Le mélanome Harding-Passey : mélanome murin apparu spontanément sur l'oreille d'une souris brune des laboratoires de l'université de Leeds en 1929. Ce mélanome a depuis été transplanté à plusieurs races de souris : Balb/c, BDF1, NMRI, Swiss Albino et C3H.
(95,137)

5.2.2.4 Cellules tumorales.

Le mélanome de souris B16. Don du Dr. Atassi, Animal screening,
Institut Bordet, Bruxelles.

HM6. Métastase sous cutanée. Mélanome humain isolé et cultivé
à l'Institut Bordet depuis 1973.

L cells. Fibroblastes de souris transformés in vitro.

5.2.2.5 Cellules normales

Lymphocytes de souris activés ou non avec des lectines.

5.2.2.6 Extraction des macrophages. (60,139,182)

La cavité péritonéale est la source habituelle de macrophages. Les souris sont anesthésiées à l'éther et tuées par dislocation cervicale. Après fixation sur le dos par les 4 membres et désinfection de la peau abdominale à l'alcool, une incision longitudinale est faite en son milieu. Un double mouvement de traction vers le haut et vers le bas met à nu le péritoine dans lequel on injecte sur sa ligne médiane 1 à 4 ml de milieu de culture. Après léger massage, l'exsudat est prélevé au niveau des flancs, en créant une poche de liquide (afin d'éviter la contamination ou l'obstruction de l'aiguille par de la graisse ou par l'intestin). Le liquide est versé dans un tube agité ou refroidi par un bain de glace, ce qui empêche l'adhérence des macrophages aux parois. Le dénombrement se fait à l'aide d'un hémacytomètre et on dilue avec du milieu pour obtenir la densité cellulaire désirée. Après répartition et adhérence des macrophages dans les boîtes micro-test, trois lavages successifs éliminent les cellules non adhérentes et permettent la purification des cultures.

5.2.3 Les milieux de culture utilisés.

HAM : nutrient mixture F-10-HAM (1x) with L-glutamine cat.
n° 155 - batch U892403 - gibco Biocult (Glasgow, Scotland)

Dulbecco : modified Eagle Medium. With HEPES 25 mM. cat. 232
batch U902105 (Gibco Biocult).

RPMI : 1640 with L-glutamine - cat. n° 1876 - batch U791008
(Gibco Biocult).

MEM Eagle : (1x) with Earle's salts and 25 mM HEPES - without
L-glutamine - cat. 236 - batch L277406 (Gibco
Biocult).

PBS : fabrication au laboratoire d'après catalogue Gibco Biocult
(solution saline tamponnée).

Foetal Calf Serum : cat. n° 629 - batch L290102S (Gibco Biocult)

Antibiotiques : Pénicilline - Streptomycine 10.000 U ml^{-1} -
cat. n° 514 - batch L882503 (Gibco Biocult).

Kanamycine : 10.000 U ml^{-1} - cat. n° 516 - batch U660604 (Gibco Biocult).

Héparine : Léo Pharmaceutical products (Bruxelles) - $5.000 \text{ U.I. ml}^{-1}$ - n° 76K 22/051.

Fongicide : fungizone : Amphotericin B $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ - cat. n° 529 - batch U783004 - MIC : $1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ - concentration maximum : $25 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Mycostatine : MIC : $3,13 \text{ U ml}^{-1}$ - concentration maximum : 10 U ml^{-1} .

5.2.4 Les produits chimiques et radiochimiques.

Trypsine EDTA : dans PBS (trypsine 0,05 % - EDTA 0,025 %).

Trypsine NBC : 1.300 (Cleveland).

Thymidine froide ($\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{N}_2 \text{O}_5$) pour usages biochimiques.
Article 8206 - batch 6407909 - Merck.

$^3\text{HTdR}$ (methyl - ^3H) thymidine : 18 à 25 Ci. mmole^{-1} - 1 mCi.ml^{-1}
Code TRK 120 - batch 127
(Amersham - England).

$^{14}\text{C.AA}$ mixture : L - (U - ^{14}C) amino-acid mixture : 50 Ci.ml^{-1} .
 $57 \text{ mCi.matome}^{-1}$ carb. - code CFB 104 - batch 61

^3H - glutamic acid : L - (G- ^3H) glutamic acid - 25 Ci.mmole^{-1} .
 1 mCi.ml^{-1} - code TBK 445 - batch 10.

^3H - glucose : D-(6- ^3H) glucose - 500 mCi.m μmole^{-1} - 1mCi.ml $^{-1}$
code TRA 85 - batch 22.

^{51}Cr : chromate de sodium injectable - stérile (env. 3 mCi.ml $^{-1}$
à la date de fabrication ; $T_{1/2}$ = 27,7 jours) env.
400 mCi. mg $^{-1}$ IRE (Fleurus).

5.2.5 Matériel de culture.

Boîtes de Roux 25 cm 2 - stériles n° 3013 - Falcon (California).

Boîtes microtest : plaques microtest stérilisées par irradiations gamma - Nunclon Delta - 96 puits - n° 167008/SI. - Nunc.

Plaques microtest : Nunclon Delta - Multidish 24 - puits n° 169590/SI Nunc (Denmark).

Pipettes : pipetman Gilson - 0 à 200 λ et 0 à 1.000 λ .

Aiguilles : Sherwood Medical Industries LTD, stériles, à usage unique - 38 x 0,7 mm / 38 x 1,2 mm.

Seringues : Sabre gillette Surgical - 1, 2, 5, 10 et 20 ml, stérilisées par gamma irradiation, à usage unique.

Microscope à contraste de phase : Nikon 41918 (Japan).

5.2.6 Les cultures de cellules.

a) Les macrophages péritonéaux sont cultivés dans du Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco) avec 25 mM de tampon HEPES, de la L-glutamine des antibiotiques, soit 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 100 mg/ml de kanamycine, ainsi que 10 à

15% de sérum de veau foetal (FCS) décomplémenté à 56° pendant 30 minutes.

b) Les lignées de macrophages sont maintenues dans du milieu Dulbecco's modified Eagle Medium avec les antibiotiques et le FBS à 15 %.

c) La lignée HM6 est maintenue dans du HAM F10 avec antibiotiques et FCS 15 %. La lignée B16 est maintenue dans du MEM + FCS 15 %. Le PBS avec ou sans Ca^{++} et Mg^{++} est utilisé pour le lavage des cellules ou leur trypsinisation. Les cellules sont passées lorsque les cultures atteignent la confluence afin de les maintenir en phase de croissance exponentielle. Le passage est effectué en trypsinisant les monolayers de cellules contenus dans des flacons NUNC de 75 cm².
(163)

5.2.7 Trypsinisation des cellules.

Stérilement, on lave trois fois le monolayer de cellules à l'aide de PBS afin d'éliminer les traces de FCS contenant des inhibiteurs de la trypsine. On ajoute alors du PBS sans Ca^{++} et Mg^{++} contenant 0,05 % de trypsine (Merck) et 0,025 % EDTA (Merck) afin de recouvrir les cellules. Ceci correspond à un volume de 1 ml. La boîte de culture est alors placée à l'étuve à 37° et observée au microscope toutes les minutes afin d'observer le processus de décollement des cellules dont la vitesse varie en fonction du type de cellules, l'état des cultures, et la fraîcheur de la solution de trypsine. Lorsque le tapis de cellules commence à se détacher, on parachève le décollement avec un jet de seringue à l'aide du milieu de culture adéquat contenant 15 % de FBS qui inhibera également le surplus de trypsine. Les cellules sont remises en suspension à la pipette stérile par 2 ou 3 aspirations et distribuées dans de nouveaux flacons de culture selon le nombre initial de cellules et le besoin. Dans les flacons de 75 cm², 1 à 2x10⁶ cellules sont suffisantes. Selon la taille des cellules, on peut obtenir de 10 à 15x10⁶ cellules à confluence sur cette surface.

5.2.8 Comptage des cellules.

Les cellules en micropuits Linbro de 0,2 ml peuvent être comptées à tout moment d'une expérience à l'aide de l'haemocytomètre. Celui-ci est constitué d'une lame sur laquelle se trouve une grille permettant le comptage. Le volume de l'haemacytomètre est de 10 μ l. N cellules dans une surface de 16 carrés correspondent à $N \times 10^4$ cells/ml. Le domaine de comptage se situe donc pour des suspensions de cellules contenant de 10^5 à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. En deçà, les cellules ne sont pas comptables et au-delà une dilution est nécessaire. Pour compter les cellules d'un monolayer ou trypsiniser celui-là, on resuspend les cellules à la pipette et on prélève un aliquot que l'on place dans l'haemacytomètre.

5.2.9 Les microcultures en plaques de micropuits.

Au début de notre travail, nous avons tenté de miniaturiser les systèmes de cultures afin de pouvoir mesurer un nombre plus important de paramètres tout en réduisant le nombre de cellules, les quantités de milieu de culture et de sérum de veau foetal ou autologue, tout en maintenant une bonne reproductibilité des résultats en utilisant des triplicats ou quadriplicats. 10^3 à 10^5 cellules peuvent être mises en culture dans des micropuits et l'état de leurs différents métabolismes protéiques, glycidiques, nucléiques et lipidiques mesurés par l'incorporation de précurseurs spécifiques marqués habituellement au ^3H , ^{14}C , ^{125}I . Les surface et contenance des micropuits sont de $0,33 \text{ cm}^2$ et 0,2 ml respectivement.

Dans ces conditions de microculture, les cellules peuvent être comptées à l'haemacytomètre à tout moment. Une méthode spectroscopique au bleu de Méthylène peut aussi être utilisée pour mesurer le nombre de cellules dans les micropuits.

5.2.10 Méthode spectroscopique au bleu de méthylène.

A n'importe quel moment de l'expérience, les cellules en micro-puits sont fixées à l'aide d'une solution PBS avec formol à 4 % pendant 2 heures à la température du laboratoire. Elles sont ensuite colorées au bleu de méthylène 4 % dans PBS pendant 10 minutes à 20° C. Les cellules sont ensuite rincées 6 fois avec H₂O. 0,2 ml d'ethanol sont ajoutés pour extraire le bleu de méthylène (selon Martin (155)). Cette solution est lue au spectroscope à 420 nm. Dans le cas où l'on utiliserait le Multiskan Titertek (Flow laboratories) 50 µl d'ethanol suffisent afin d'obtenir une lecture homogène.

5.2.11 Incorporation des précurseurs métaboliques marqués.

Après l'adhérence des cellules dans les puits, on aspire le milieu surnageant et l'on ajoute 100 à 200 λ de milieu marqué. On incube à l'étuve à 37° C, sous atmosphère d'air à 95 % et CO₂ à 5 % saturée en vapeur d'eau, pendant 2 heures ou plus.

5.2.12 Extraction de l'activité incorporée par les cellules.

On rince doucement 3 fois les puits avec du milieu en évitant de décoller les cellules. On extrait ensuite par les procédés suivants :

- Extraction au "MASH" : MASH II n° 393, Microbiological Associates (Washington). Lyse des cellules par choc osmotique (H₂O). Aspiration et filtrage sur millipore (3 x) (glass fiber filter Reeve Angel 934AH - Lot 9481/11/2" x 12" - Whatman Inc (New Jersey)). Ce procédé permet la récupération des noyaux cellulaires et des grosses protéines. Séchage et découpage des papiers filtres et mise en flacons à scintillation pour le comptage des isotopes émetteurs β et en tubes plastiques pour les émetteurs γ (53).

- Lyse par destruction des cellules au NaOH 1 N et aspiration dans les tubes de comptage adéquat. Ce procédé permet de récupérer la radioactivité totale incorporée par les cellules.
- Précipitation par le TCA 5 % à 4° C (Ar 70). Le précipité est dissous dans Na OH 1 N. Aspiration dans les tubes de comptage. Ce procédé permet, comme pour le MASH, de récupérer la radioactivité incorporée dans le DNA et les protéines précipitables par le TCA.

5.2.13 Standardisation des courbes de croissance et des réponses métaboliques des cellules in vitro.

Dans le but d'étudier l'action des effecteurs chimiques, biochimiques, immunologiques, cellulaires ou autres, nous avons défini et mesuré les différents paramètres intervenant dans la réponse des cellules cibles à l'incorporation des précurseurs radio marqués.

Les paramètres dont il faut tenir compte sont :

- le type de cellules étudiées ;
- l'activité métabolique de ces cellules ;
- le nombre de cellules au temps 0 ;
- le temps de doublement cellulaire ;
- la composition du milieu de culture ;
- la quantité de sérum de veau ajoutée ;
- le PH du milieu de culture ;
- la présence du précurseur froid pouvant produire une dilution isotopique de la molécule marquée ;
- l'état de synchronisme des cycles cellulaires ;
- le temps de l'expérience ;
- la taille et la qualité des récipients de culture.

Nous utilisons, tant pour les macro- que pour les microcultures les produits NUNC (Gibco).

Le principe de base est d'utiliser un ou plusieurs précurseurs marqués isotopiquement afin d'étudier les métabolismes et la variation apportés à ceux-ci par des effecteurs chimiques, biochimiques, cellulaires, radiologiques ou autres.

Un nombre N de cellules sontensemencées dans les micropuits dans du MEM avec 15 % de FCS. On laisse les cellules adhérer pendant la nuit. Dans le cas où les cellules ne sont pas adhérentes, l'expérience peut se faire immédiatement.

Les cellules adhérentes offrent l'avantage de pouvoir être lavées sans que l'on doive centrifuger les plaques. On peut par la suite, et à n'importe quel moment, effectuer un pulse de temps prédéfini en ajoutant le précurseur au milieu contenu dans le puit (cas des cellules non adhérentes) ou en remplaçant le milieu préexistant par un nouveau milieu identique contenant le précurseur. Il y a lieu, dans le cas de cellules adhérentes, de laver au moins deux fois les cellules par aspiration afin de perturber le microenvironnement cellulaire qui peut se créer au niveau du "monolayer". En effet, un gradient de métabolites peut empêcher la diffusion efficace des précurseurs aux abords immédiats de la cellule (voir la courbe de réversibilité de la réponse à l'inhibition par la TdR froide). A la fin du pulse, la radioactivité est récupérée par les méthodes d'extractions décrites et les extraits comptés en scintillation pour le β et en cristal solide pour le γ (Packard Instruments).

Il est important que toutes les étapes de la mise en culture jusqu'au comptage soient standardisées.

Une standardisation doit aussi être mise au point au niveau de l'utilisation des précurseurs isotopiques et de la méthode de comptage (5', 14, 21, 62, 183).

- Respect de l'activité spécifique et du nombre de $\mu\text{Ci/ml}$ dans les milieux de marquage ;
- Référence aux courbes de standardisation par standard externe

- Prise en considération des effets de quenching et photoluminescence lors des comptages (53).

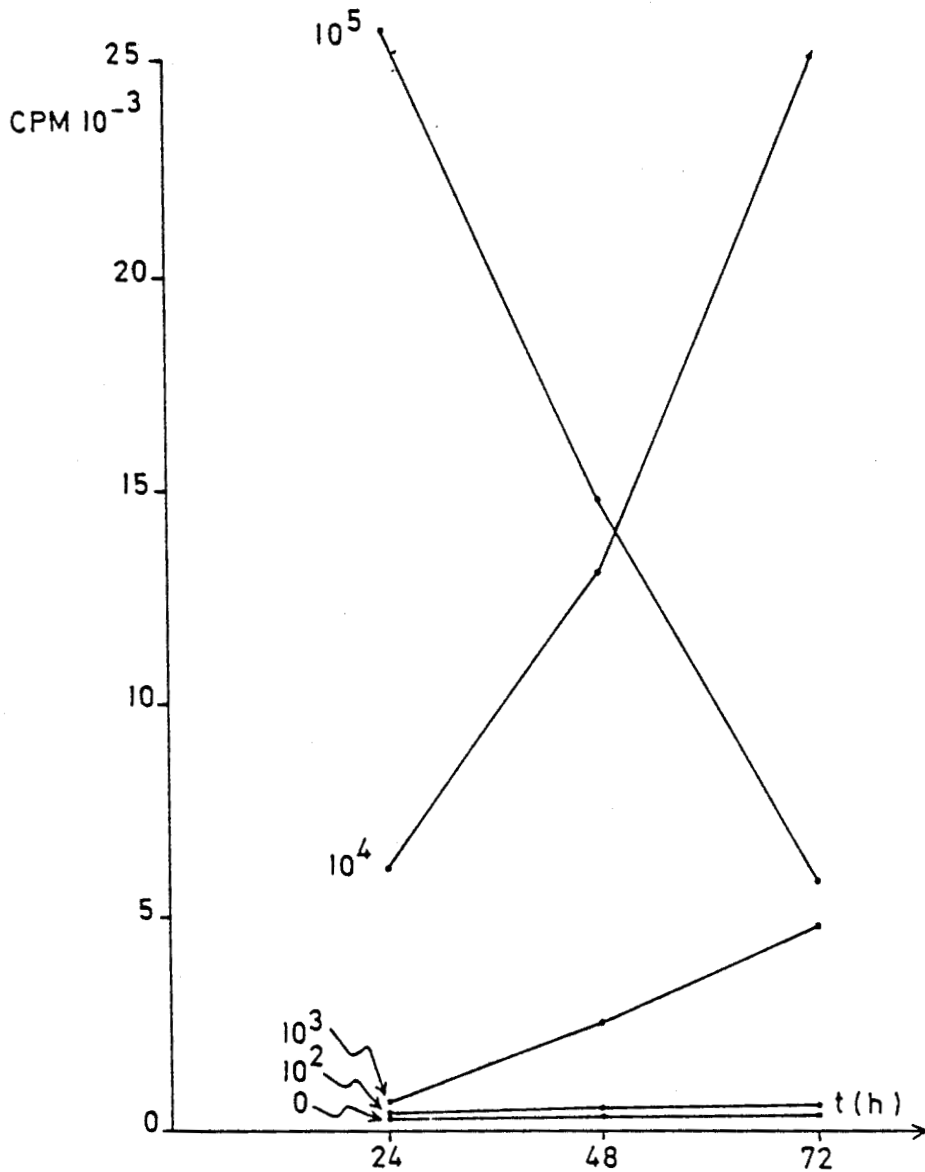


Fig. 5-1

Variation du nombre de cellules cibles et évolution de l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ en fonction du temps. 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules HM6/puit sontensemencées au temps 0. Des pulses d'incorporation d'un précurseur de synthèse des acides nucléiques sont effectués à 24 h, 48 h et 72 h. Les pulses sont de 2 h.

HM6A (Institut Bordet). $^3\text{HTdR}$ $5 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ dans MEM + 10 % FBS.



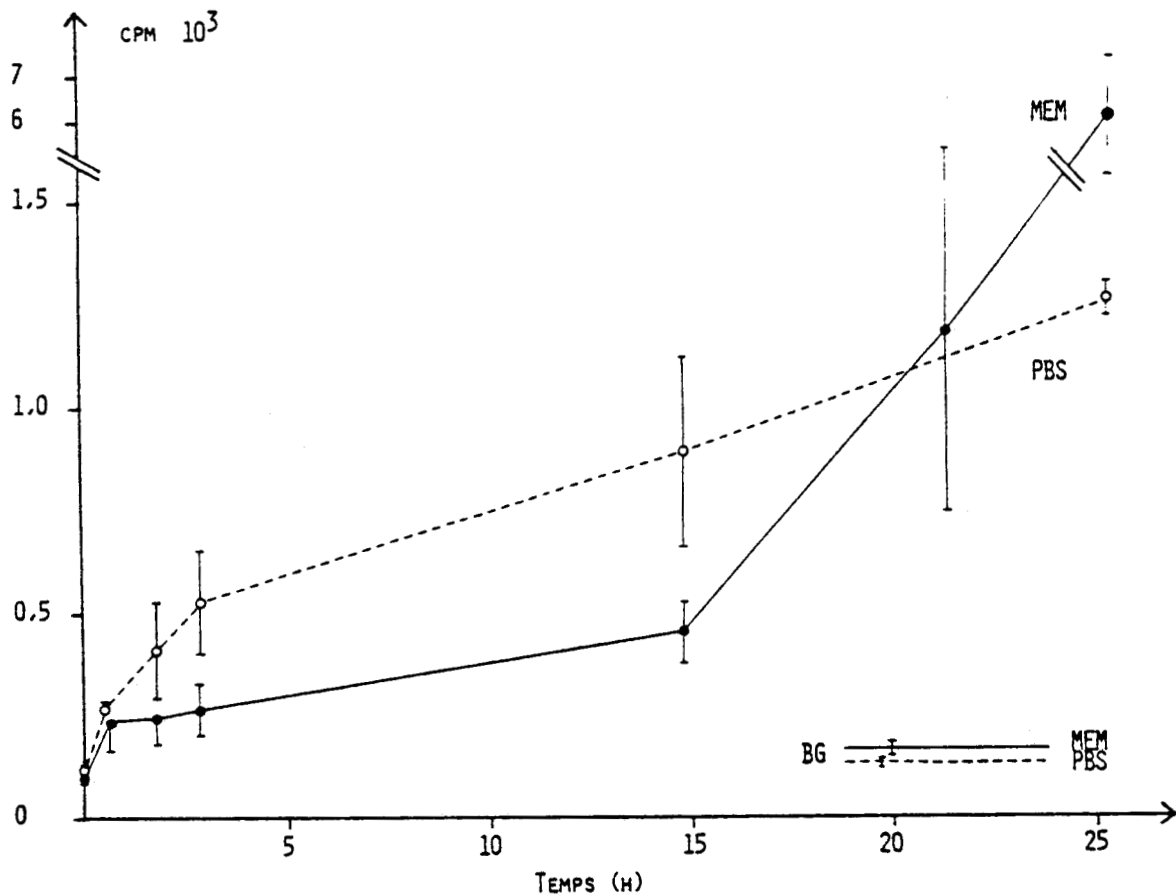


Fig. 5-2

Variation du temps d'incubation. Cellules effectrices macrophages. $4 \cdot 10^4$ MØ par puit/C57bl. Marqueur ^3H glucose $2 \mu\text{Ci ml}^{-1}$. Temps d'incubation 1/2 h, 1 3/4 h, 2 3/4 h, 14 3/4 h, 21 1/4 h, 25 1/4 h. Milieu MEM et PBS.



5.3 RESULTATS

5.3.1 Les microcultures.

La figure 5-1 nous montre l'évolution de l'incorporation de la thymidine tritiée $^3\text{HTdR}$ en fonction du nombre de cellules et du temps. Le domaine optimal de mesure de l'incorporation est celui où l'on utilise entre 10^4 et 10^5 cellules par micropuits. En deçà, le nombre de cellules est trop faible pour noter une bonne incorporation des précurseurs. Au delà, le nombre de cellules est trop élevé, provoquant une surconfluence et un épuisement du milieu de culture (0,2 ml) entraînant la mort des cellules à terme.

Dans le cas de cellules comme le macrophage péritonéal résident qui possède très peu de métabolisme de synthèse de DNA, on utilisera d'autres marqueurs permettant la mesure d'autres voies métaboliques.

La courbe d'incorporation de ^3H -glucose dans des macrophages de C57bl (figure 5-2) en est une illustration. La courbe correspondant au PBS est supérieure à celle correspondant au MEM jusque 20 heures environ. Après cette période, la courbe du MEM dépasse celle du PBS.

La phase d'augmentation rapide de l'incorporation correspond aux phases d'adhérence et d'étalement sur les surfaces de culture. Ces phénomènes s'accompagnent d'une augmentation de métabolisme et d'un taux d'incorporation plus élevé.

Au début, le MEM contenant 1 gl^{-1} de glucose présente un effet de radio-dilution par rapport au PBS exempt de glucose.

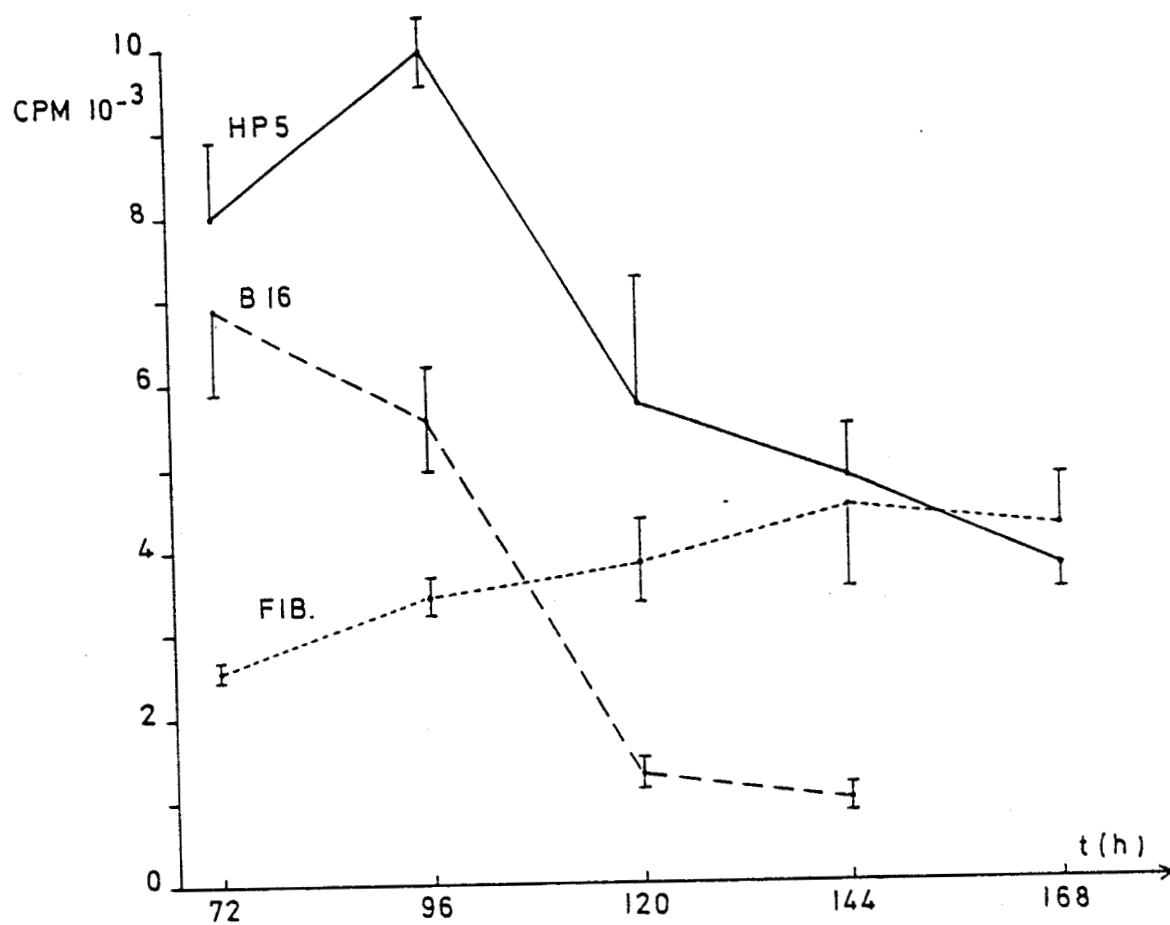


Fig. 5-3

Variation de lignées cellulaires. 10^4 cellulesensemencées au temps
 Lignée HP5 : mélanome Harding-Passey (souris Balb/c).

B16 : mélanome de la souris C57bl.

Fib : fibroblastes de souris Balb/c.



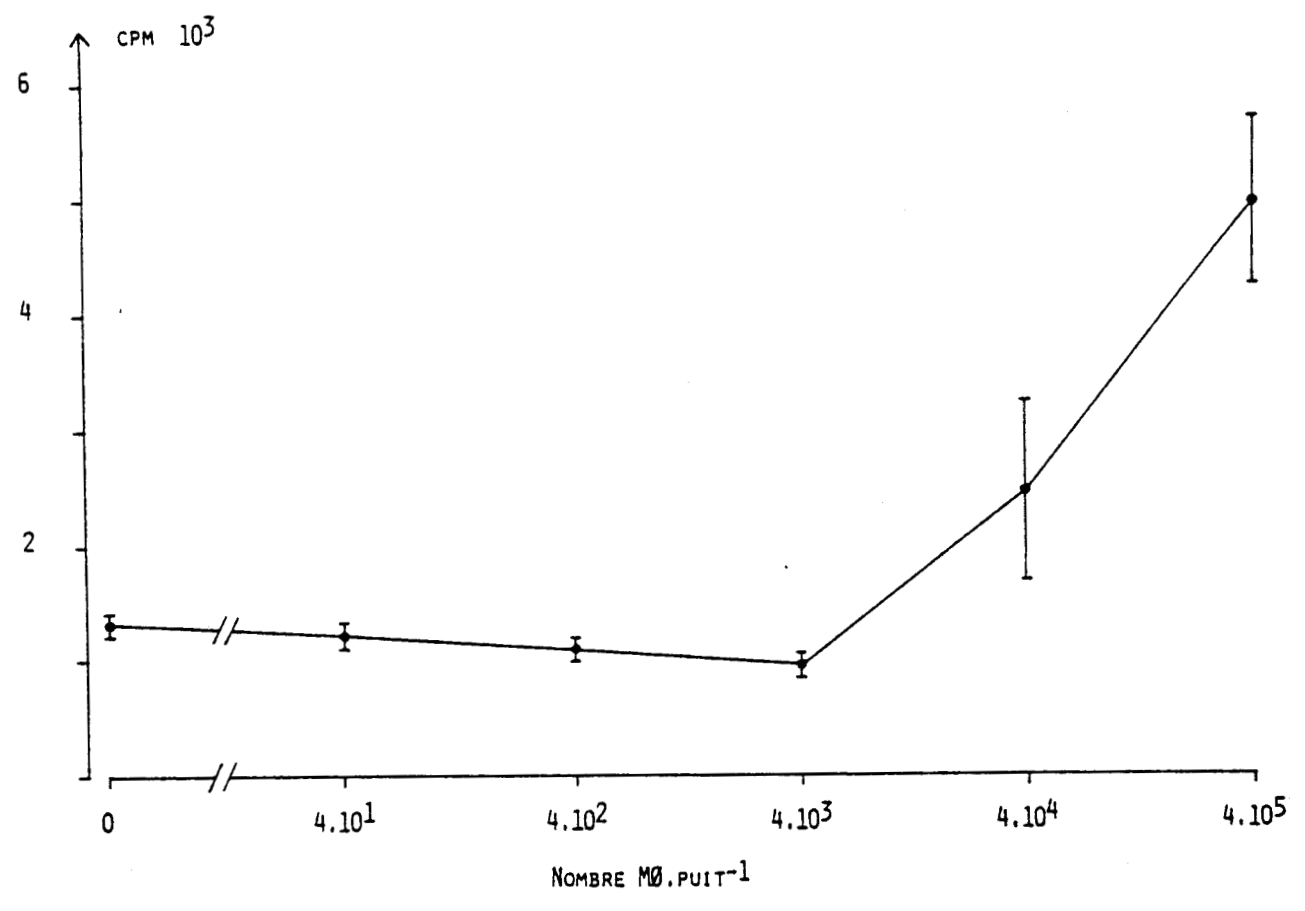


Fig. 5-4

4 10², 4 10³, 4 10⁴ et 4 10⁵ MØ par puit C57bl. Marqueur ¹⁴C amino acid mixture dans PBS. 6 10⁻³ µCi par puit. Incubation 6 h. Plaques microtest 24 puits. Extraction par lyse NaOH triplicats.



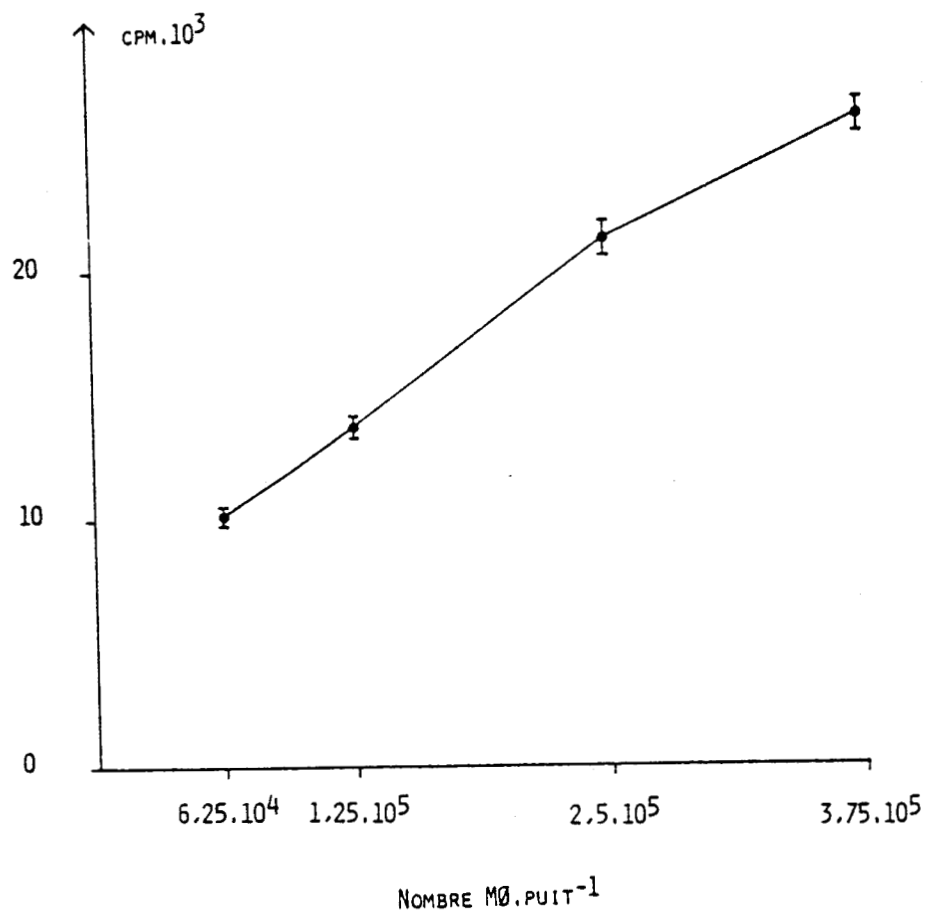


Fig. 5-5

$6,25 \cdot 10^4$, $1,25 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $3,75 \cdot 10^5$ MØ par puit. B3 C6 F1 (souris).
Marqueur ¹⁴C amino acid mixture, 0,375 µCi par puit dans PBS.
Incubation 4 h. Plaques microtest.



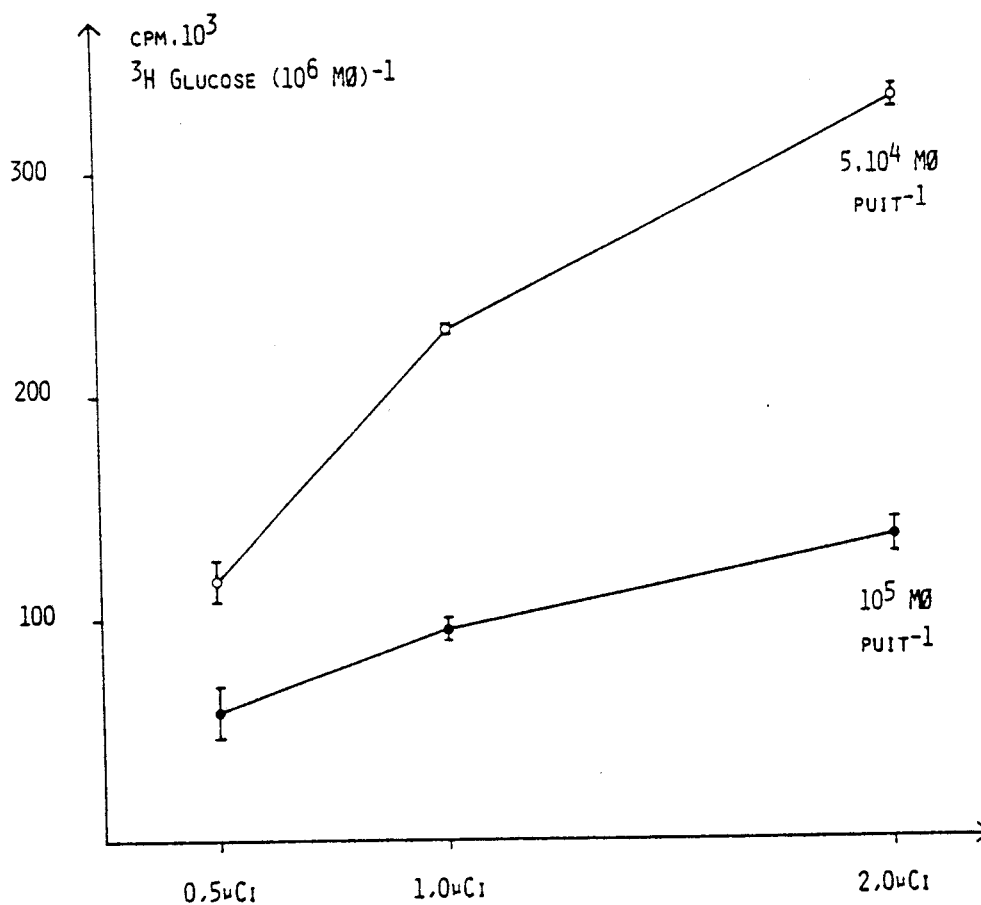


Fig. 5-6

Variation de l'activité. $5 \cdot 10^4$ et 10^5 MØ par puit - Balb/c.
 Marqueur ³H-glucose 0,5 Ci par puit, 1 μCi par puit, 2 μCi par puit
 dans PBS. Incubation 6 h. Plaques microtest 24 puits. Extraction
 par lyse NaOH triplicat.



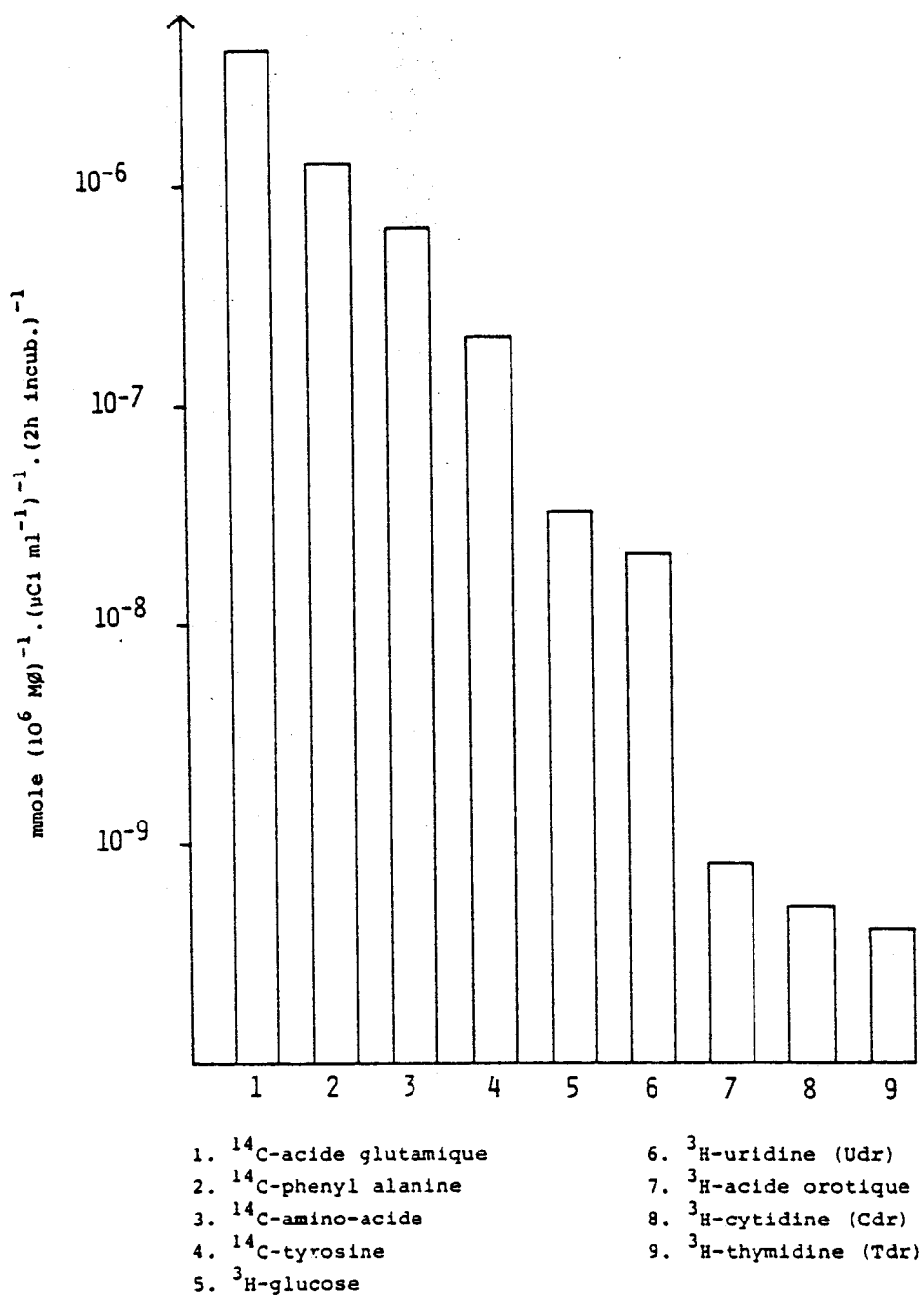


Fig. 5-7

Comparaison d'incorporation de précurseurs métaboliques par des MØ de Balb/c.



Après 15 heures environ, les macrophages mieux adaptés et utilisant les substances nutritives du MEM augmentent leur métabolisme alors que les cellules dans le PBS sont déprimées au bout de ces quelques heures.

On utilisera donc un milieu PBS pour des incubations de courte durée et des milieux nutritifs tels MEM et RPMI, pour des incubations plus longues.

Le métabolisme de base de la cellule peut aussi faire varier les résultats du marquage. La figure 5-3 nous montre le niveau d'incorporation de $^3\text{HTdR}$ dans 3 cultures cellulaires de vitesse de croissance différente.

Pour les macrophages, un nombre de cellules situé entre $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ paraît adéquat pour enregistrer un taux d'incorporation de marqueurs satisfaisants pour une étude de métabolismes. (Figures 5-4 et 5-5). La figure 5-6 montre la variation d'incorporation des précurseurs en fonction de leur activité dans le puit. L'activité spécifique des précurseurs reste constante.

La figure 5-7 apporte la comparaison d'incorporation de précurseurs métaboliques par des macrophages Balb/c. Comme on peut le voir, la réponse des précurseurs des synthèses nucléiques est très faible par rapport aux précurseurs des synthèses glucidiques, protéiques et RNA. Les résultats sont exprimés en millimoles de marqueurs pour 10^6 macrophages pour une activité spécifique de $1 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ dans RPMI pendant deux heures d'incubation. Le choix du milieu d'incubation est essentiel lors de la culture de tissus ou de cellules qui sont plus ou moins exigeantes en éléments nutritifs nécessaires à leur croissance ou survie in vitro. Lors de l'utilisation de précurseurs métaboliques marqués, les substances contenues dans ces milieux peuvent avoir un effet de dilution isotopique réduisant parfois considérablement le comptage. La figure 5-8 nous montre l'effet des milieux sur l'incorporation des α -aminés dans des macrophages. Un autre élément essentiel et souvent indispensable dans la culture de cellules est le sérum de veau foetal. Celui-ci contient des facteurs de croissance difficiles à recréer artificiellement. La plupart des milieux de cultures contiennent de 10 à 15 % de sérum de veau foetal (FCS) (163).

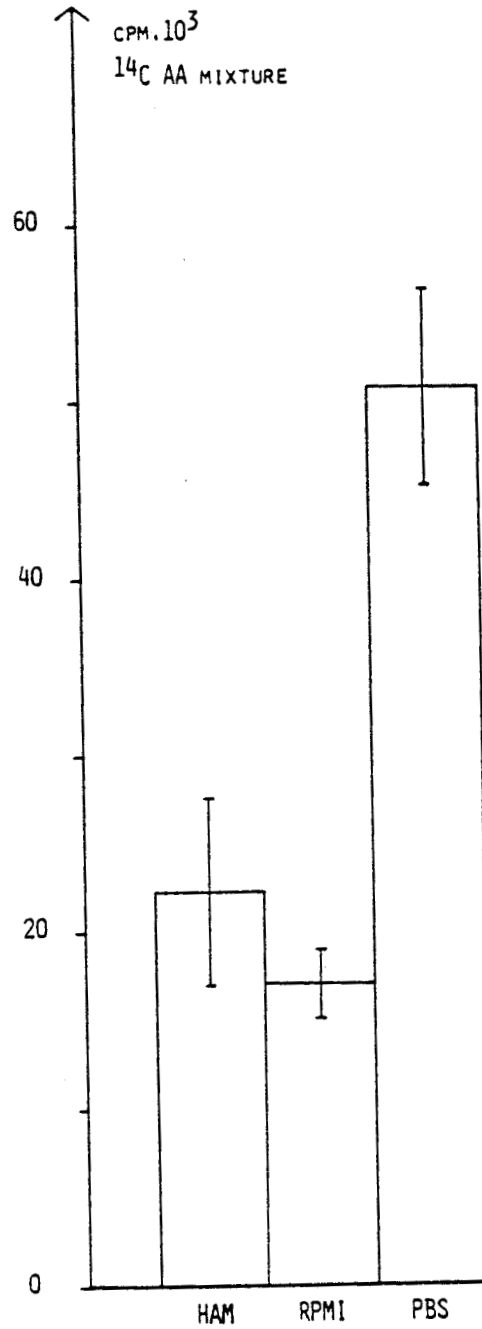


Fig. 5-8

Variation du milieu d'incubation. $2,5 \cdot 10^4$ MØ par puit de C57bl.
Marqueur ^{14}C amino acid mixture. $5 \cdot 10^{-2}$ μCi par puit dans HAM, MEM,
PBS. Incubation 6 h. Plaques microtest 24 puits quadruplicat.



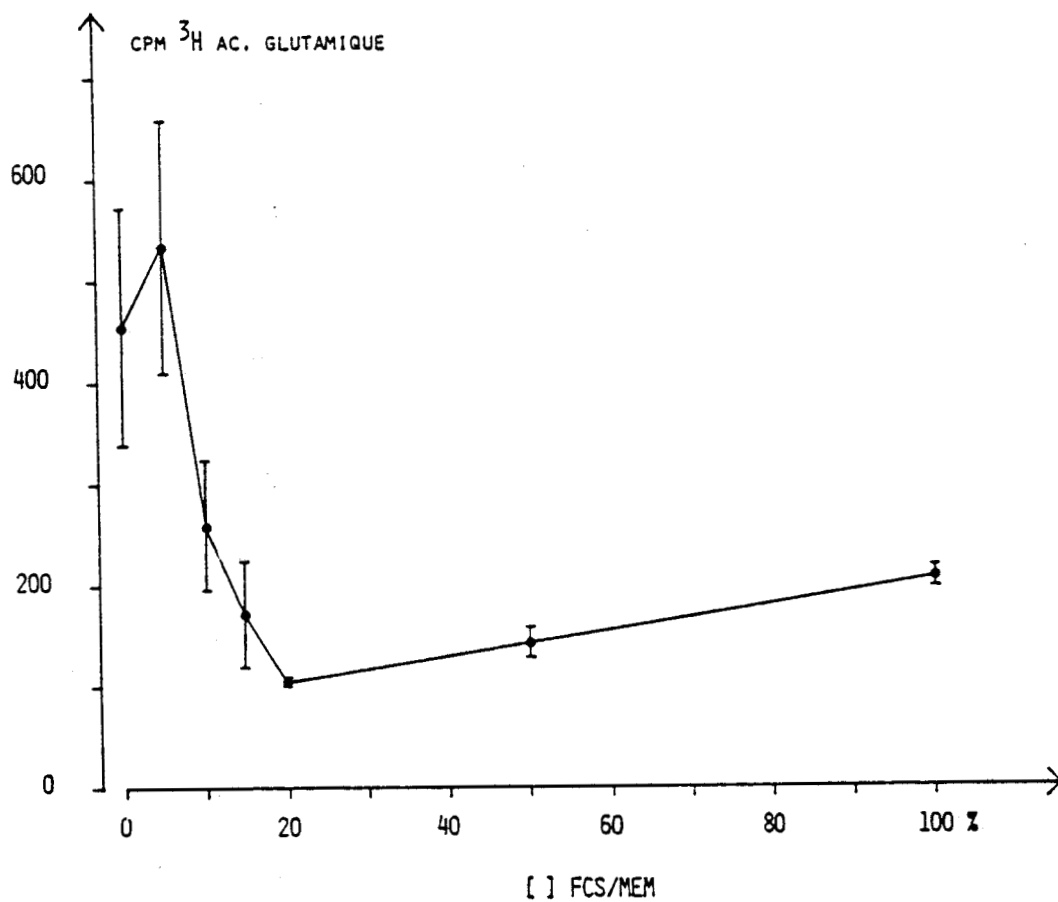


Fig. 5-9

Variation du milieu d'incubation. $5 \cdot 10^4$ MØ par puit Balb/c. Marqueur ^3H acide glutamique 10^{-2} μCi par puit dans RPMI. Pourcentage de sérum de veau : 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 50 %, 100 %. Incubation 5 h. Plaques microtest 96 puits triplicat. Extraction au MASH.



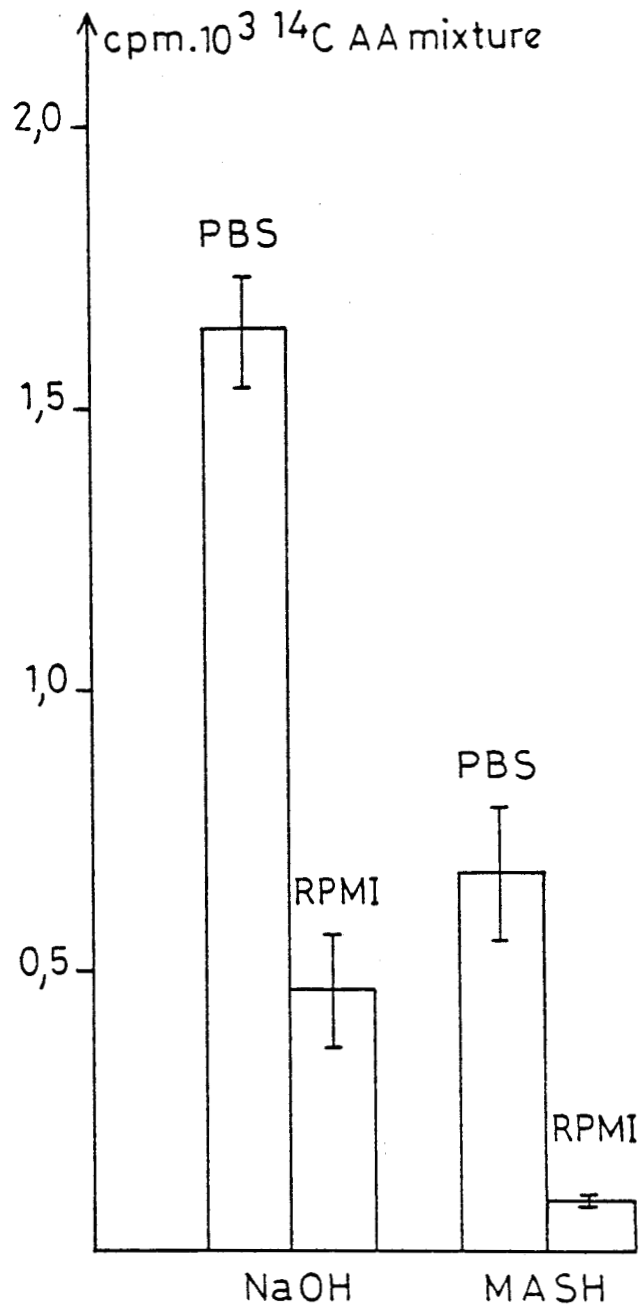


Fig. 5-10

Variation de la méthode d'extraction. $5 \cdot 10^3$ HM6 par puit. Marqueur ^{14}C amino acid mixture $0,1 \mu\text{Ci}$ par puit en PBS et RPMI. Incubation 2 h. Extraction par lyse osmotique au MASH II et lyse totale au NaOH. Plaques microtest 96 puits - triplicat.



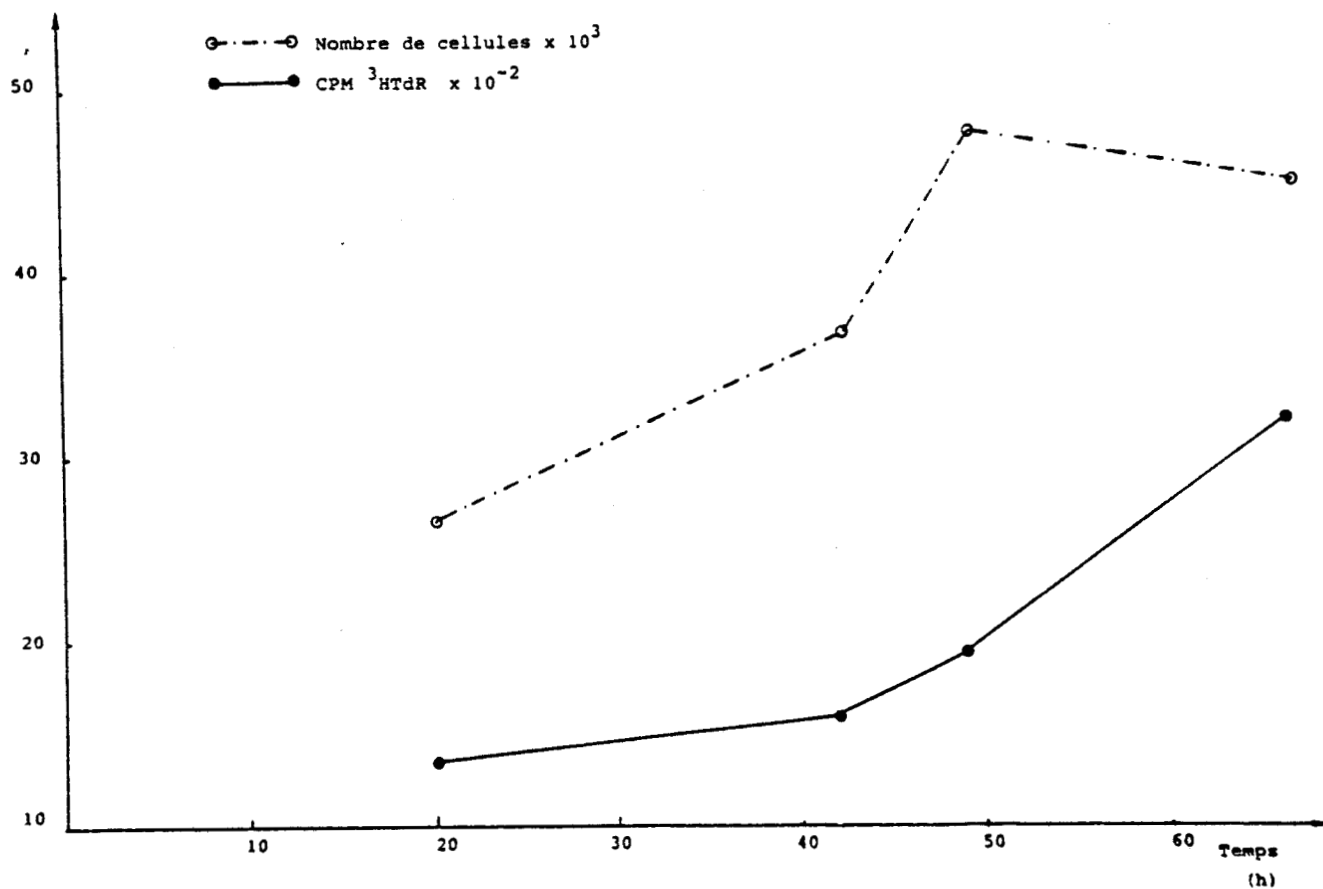


Fig. 5-11

Comparaison de la méthode d'incorporation de la thymidine tritiée et de la méthode de comptage des cellules en phase exponentielle de culture. 5×10^3 cellules sontensemencées au temps 0 et pulsées à la $^3\text{HTdR}$ ou comptées en temps voulu.



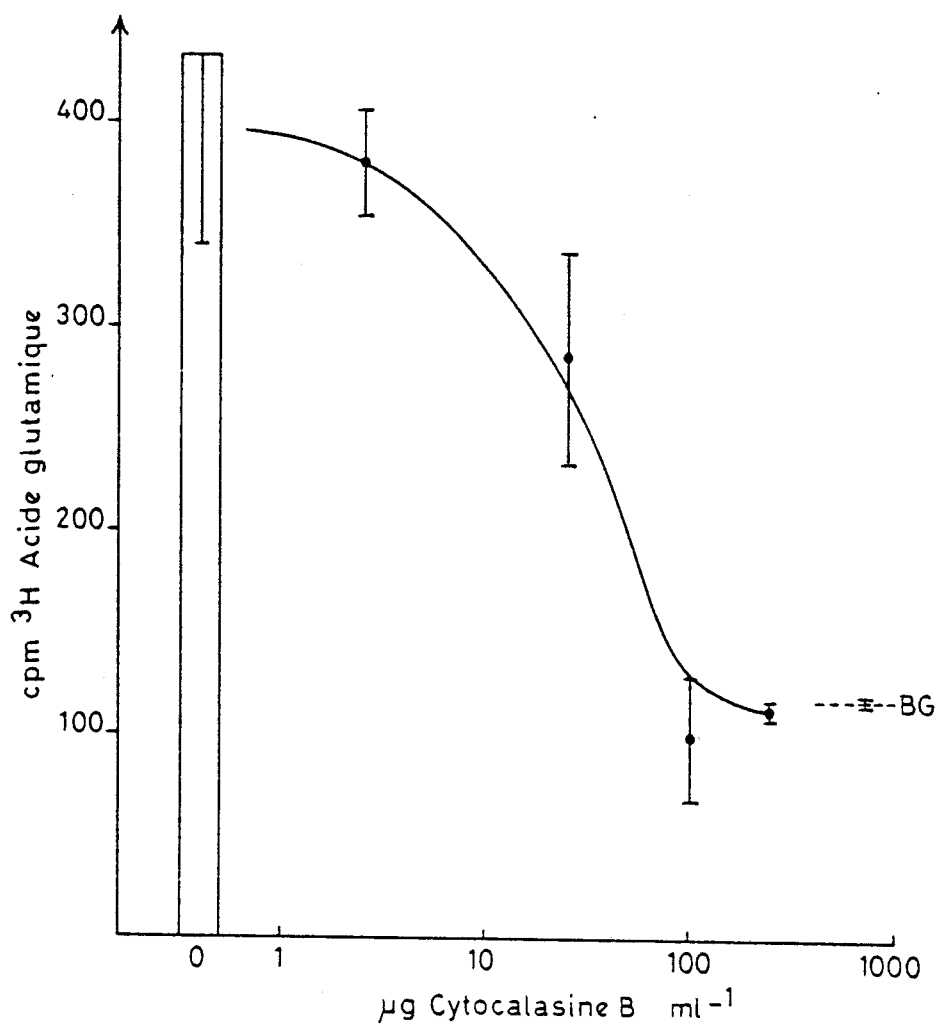


Fig. 5-12

Inhibition par la cytochalasine B de l'incorporation de ^3H -acide glutamique par $2,5 \cdot 10^5$ MØ Balb/c puits $^{-1}$. Incubation 6 h dans RPMI 1640/FCS 10%.



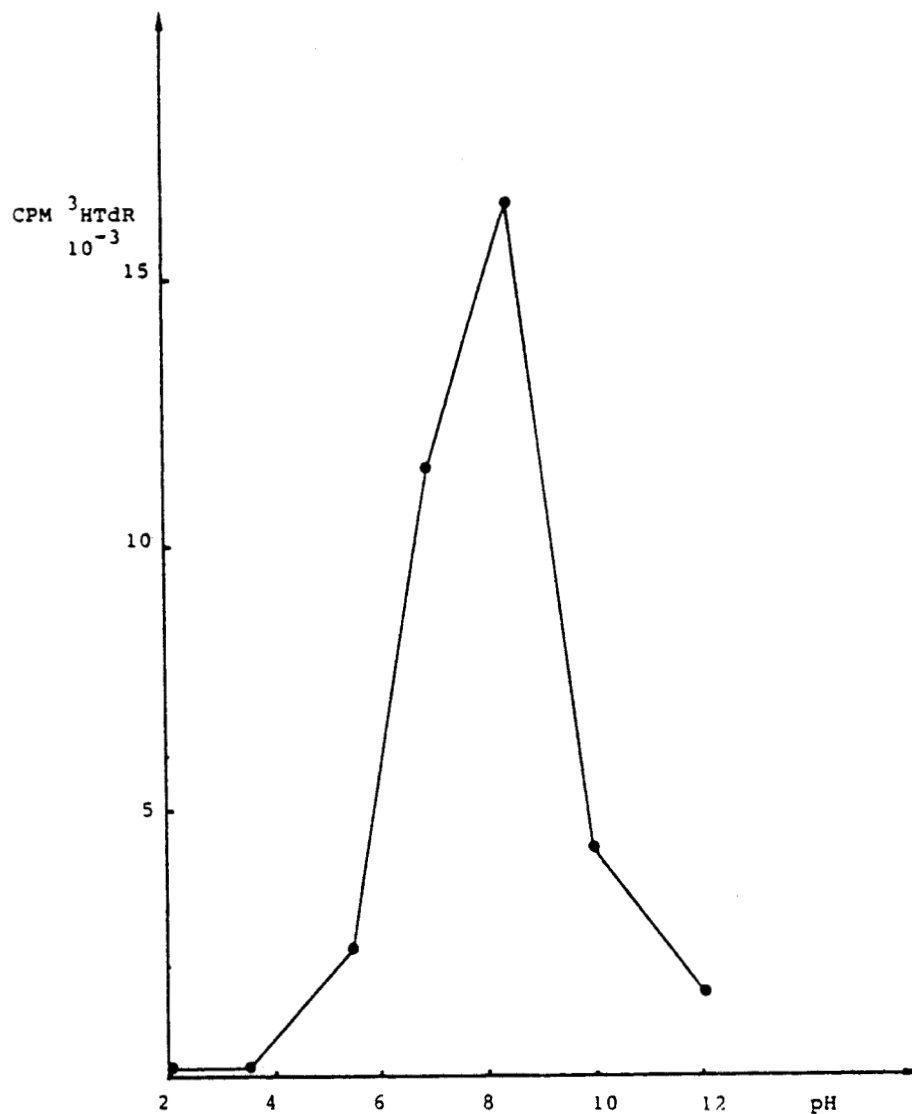


Fig. 5-13

Effet de la variation de pH sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$. 10^4 cellules HM6 sont ensemencées en puits. Le pH varie de 2 à 12.
Temps du test : 2 h pulse $^3\text{HTdR}$.

La figure 5-9 nous montre l'effet de variation de concentration du sérum sur l'incorporation d'un précurseur, dans ce cas le ^3H -acide glutamique dans les macrophages.

La méthode d'extraction de l'activité incorporée par la cellule affecte aussi le rendement de l'expérience. La figure 5-10 nous montre le résultat de deux types d'extraction, soit par lyse totale, soit par le MASH II avec lyse osmotique. Le rendement par lyse totale est évidemment meilleur puisque l'on ne perd pas les petites molécules cytoplasmiques qui passent au travers du filtre du MASH. Cette expérience montre aussi l'effet de radiocompétition entre deux milieux (PBS et RPMI). La figure 5-11 met en évidence l'augmentation de l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ liée à l'augmentation du nombre cellulaire. La phase d'activité maximale d'incorporation du précurseur qui se passe théoriquement dans la phase S précède de peu la phase d'augmentation du nombre de cellules correspondant à la mitose.

(165)

5.3.2 Réponse du système à divers agents modulateurs des incorporation

L'utilisation des précurseurs biochimiques ou immunologiques permet une appréciation plus fine des effets divers que peut enregistrer une cellule en présence d'un effecteur quelconque. Avant de pouvoir interpréter les résultats, il est nécessaire d'évaluer la possibilité de la présence d'artefacts ou d'effets parasites. La figure 5-12 nous montre l'effet d'un inhibiteur de l'endocytose (la cytochalasine B) qui, par son effet anti-microtubules, empêche la phagocytose et la mitose cellulaire. La drogue inhibe également l'incorporation d'acide glutamique, témoin du métabolisme du macrophage.

Cette expérience montre que le système répond et que l'artefact de l'adsorption non spécifique du marqueur au niveau des membranes peut être écarté.

L'effet du pH sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ est illustré à la figure 5-13. Le domaine de survie des cellules se situe entre pH 6,5 et 9,5.

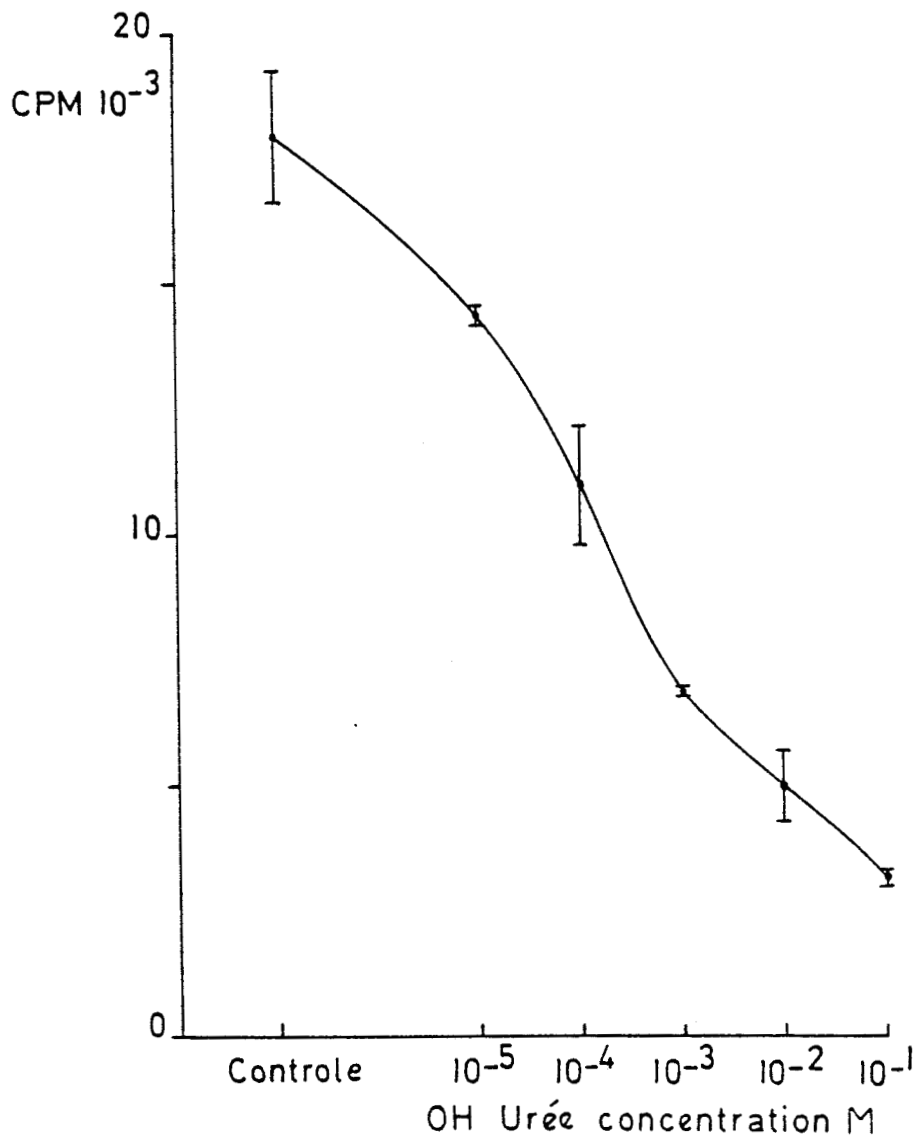


Fig. 5-14

Effet de l'hydroxyurée sur l'incorporation de la thymidine tritiée en fonction de la concentration. $2 \cdot 10^4$ cellules HM6 au temps 0. Temps du test : 4 h.

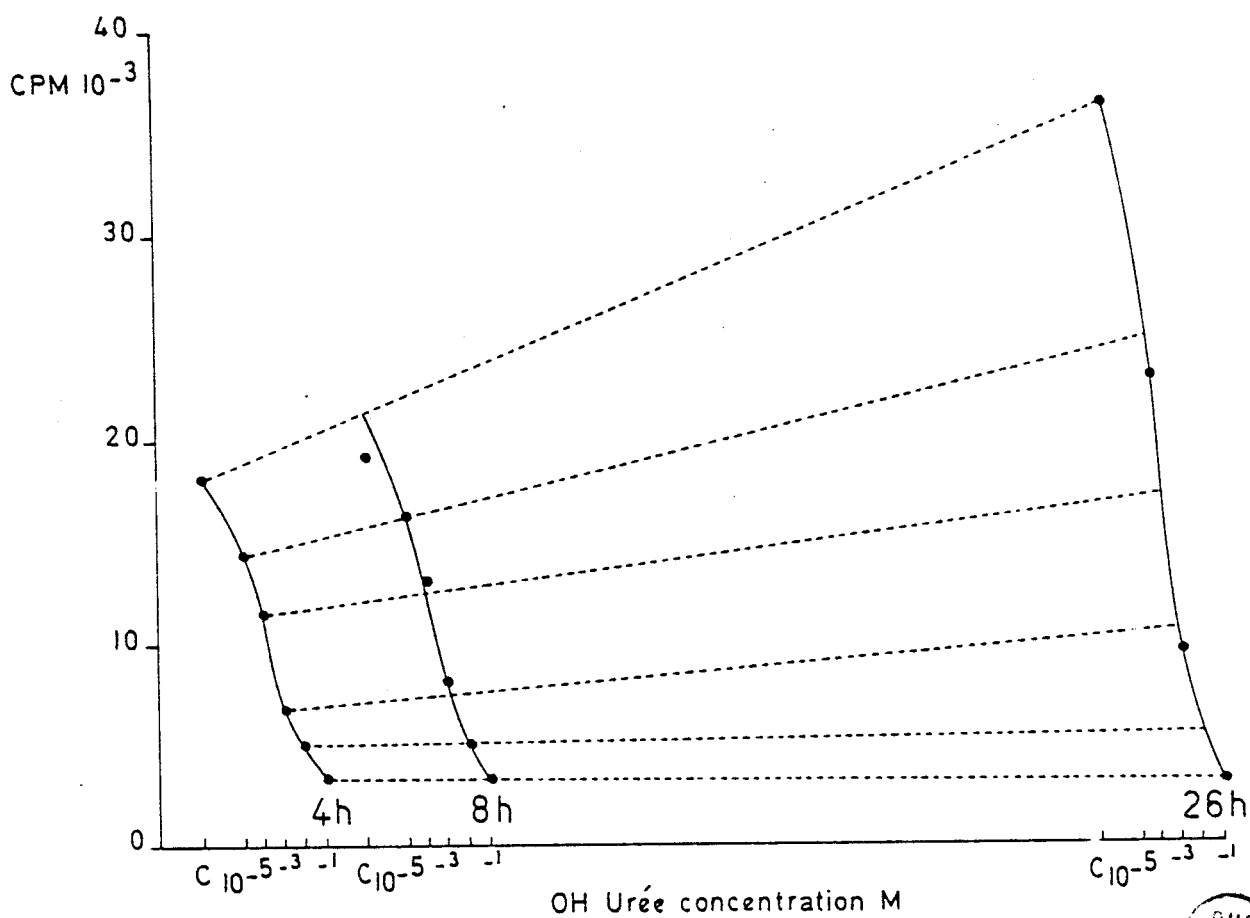


Fig. 5-15

Effet de l'hydroxyurée sur l'incorporation de la thymidine tritiée en fonction de la concentration et du temps.

$2 \cdot 10^4$ cellules HM6 au temps 0. Pulse à 4 h, 8 h et 26 h.

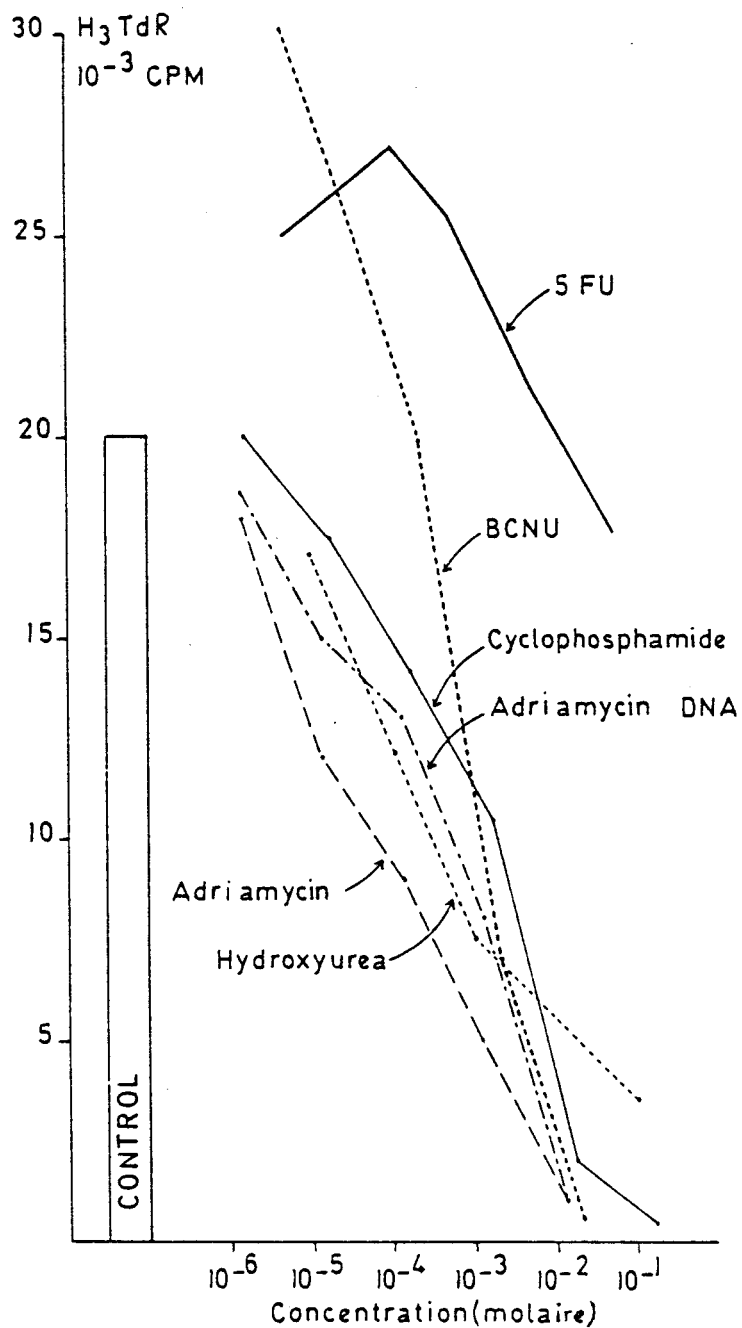


Fig. 5-16

Effet de diverses drogues cytotoxiques sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ en fonction de leur concentration.

$2 \cdot 10^4$ cellules mélanome humain HM6 au temps 0. Pulse à 8 h.

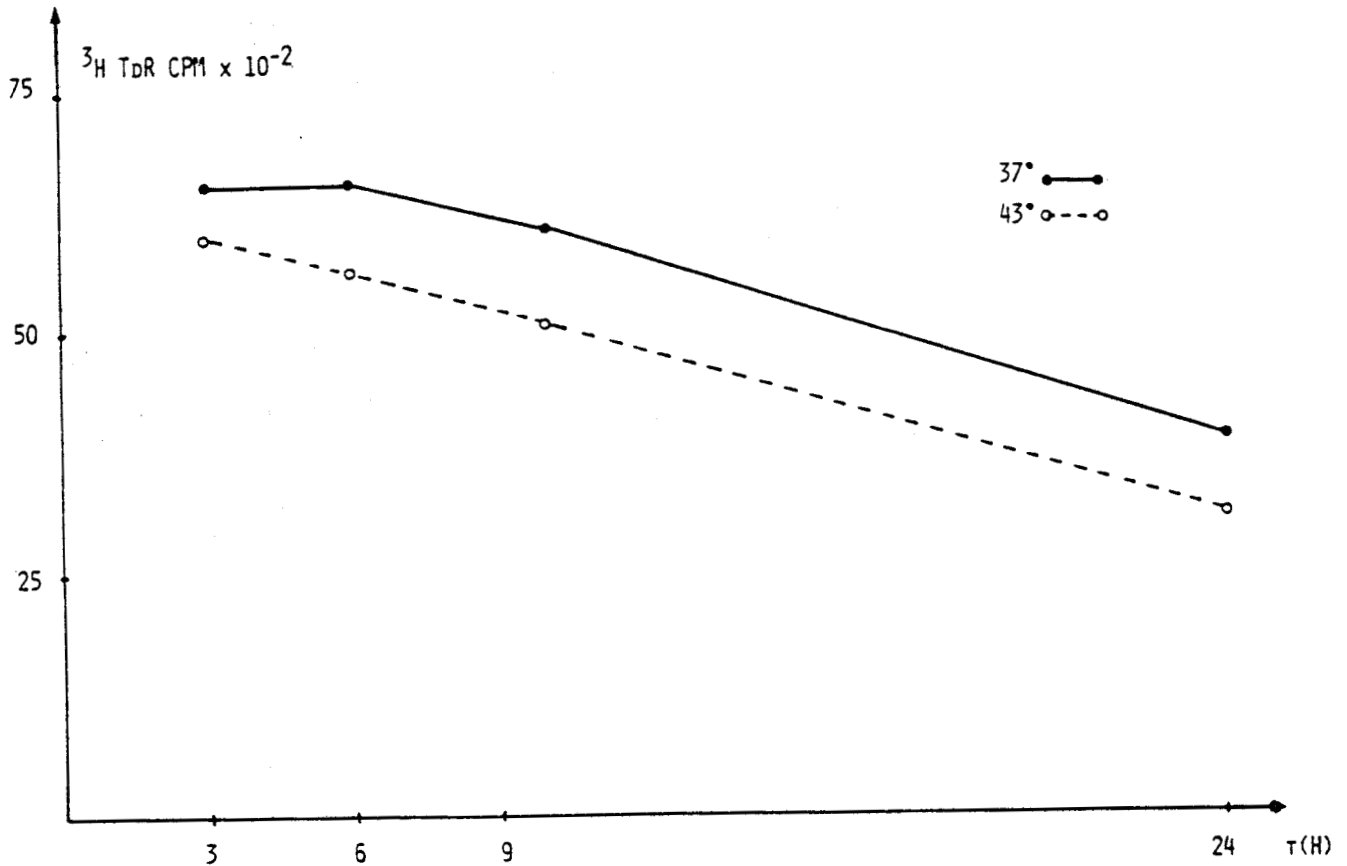


Fig. 5-17

Effets de l'hyperthermie sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ dans les cellules HP4. Choc thermique à $43,5^\circ$ pendant 4 h suivi d'un pulse de 2 h de $^3\text{HTdR}$ à 37°C . Témoin à 37°C . Pulse à 3, 6, 9 et 24 h post choc thermique.

L'hydroxyurée est un inhibiteur classique de la synthèse des pyrimidines (224). Il agit sur la sous-unité B de la ribonucléoside diphosphate réductase. La figure 5-14 nous montre son action sur l'incorporation de la $^3\text{HTdR}$ 4 heures après l'action de la drogue sur les cellules.

La figure 5-15 nous montre la réponse du système après 4 h, 8 h et 26 h d'action de l'hydroxyurée.

Comme on peut le constater, une concentration de 10^{-2} Molaire en HUR inhibe complètement le métabolisme de la cellule alors que la concentration 10^{-3} M montre un reste d'activité métabolique. Ceci illustre la grande maniabilité (plus de 60 points expérimentaux peuvent être traités ou partir d'un même lot de cellules par un même expérimentateur). La reproductibilité est très bonne avec des écarts types de 10 à 15 % maximum. La cohérence interne qu'apporte le paramètre temps permet de repérer et d'analyser les artefacts éventuels.

La figure 5-16 montre une comparaison de la réponse de plusieurs drogues oncostatiques couramment utilisées en chimiothérapie du cancer. Comme on peut le constater, les réponses peuvent varier assez sensiblement suivant les drogues utilisées. L'action des drogues est bien entendu fonction de leur concentration - déplacement de la courbe suivant l'abscisse - mais aussi du type de métabolisme perturbé compte tenu du marqueur utilisé - pente de la courbe -. Lorsqu'on utilise un marqueur tel que la $^3\text{HTdR}$, son incorporation dépendra, outre des paramètres classiques, concentration, temps d'incubation, temps de pulse, d'autres paramètres tels que le niveau du pool interne du précurseur froid et de l'effet éventuel d'une drogue sur celui-ci. En effet, si le pool interne de thymidine est réduit, l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ sera favorisée sans que cela veuille dire que la cellule sera favorisée dans sa croissance à terme. Le cas du 5FU dont nous reparlerons plus loin en est un exemple frappant. Le BCNU (224) pourrait avoir un effet bi-fonctionnel en fonction de sa concentration. A haute concentration, il est toxique et alkylant, alors qu'à plus faible concentration il est susceptible d'avoir un effet amplificateur semblable à celui du 5FU (figure 5-22).

D'autres effecteurs peuvent agir sur le système. La figure 5-17 montre l'effet de la température sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ après

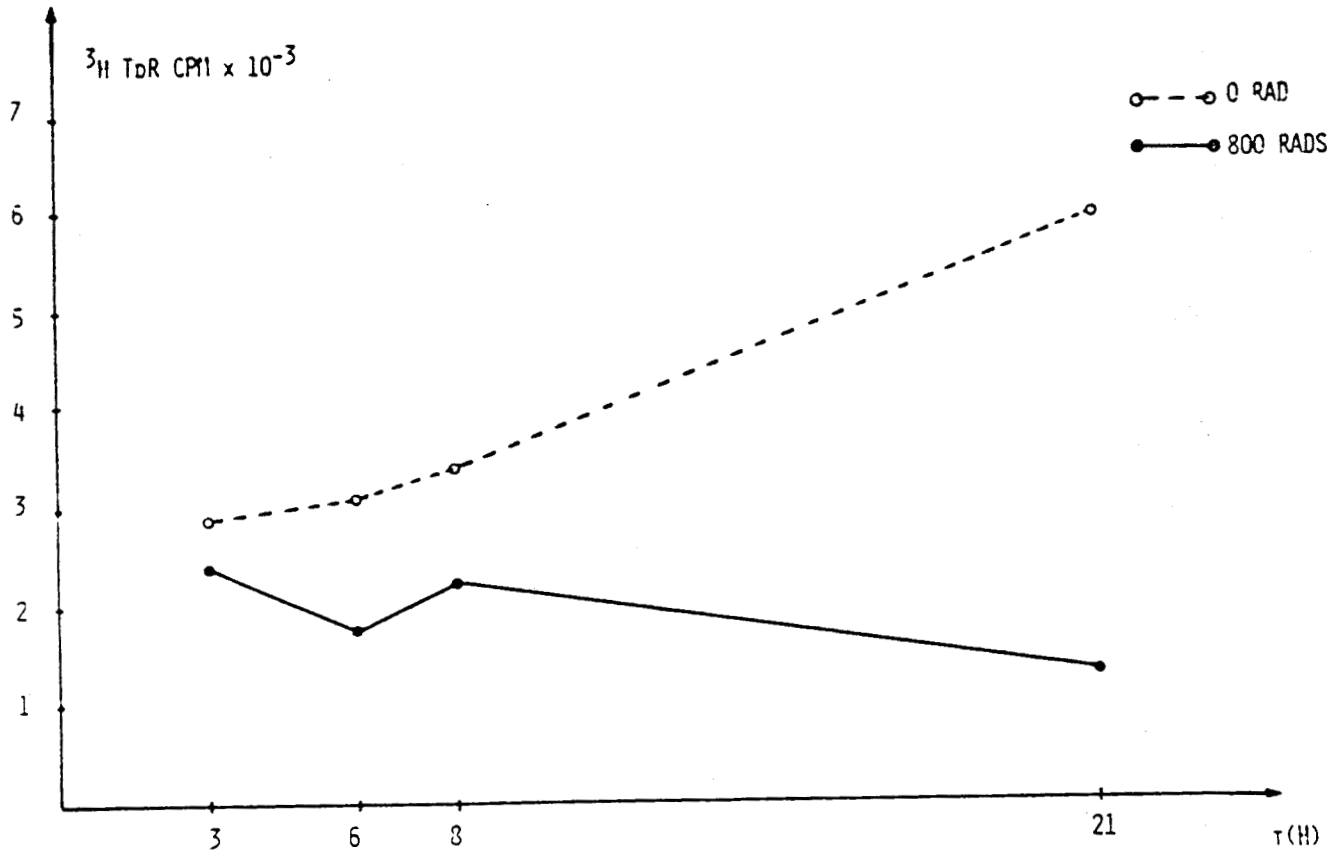


Fig. 5-18

Effets des irradiations sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ en fonction de la dose et du temps post irradiation.

2×10^4 cells HP4 au temps 0. Irradiation : 0 et 800 rads.

Pulse à 3, 6, 8 et 21 h.

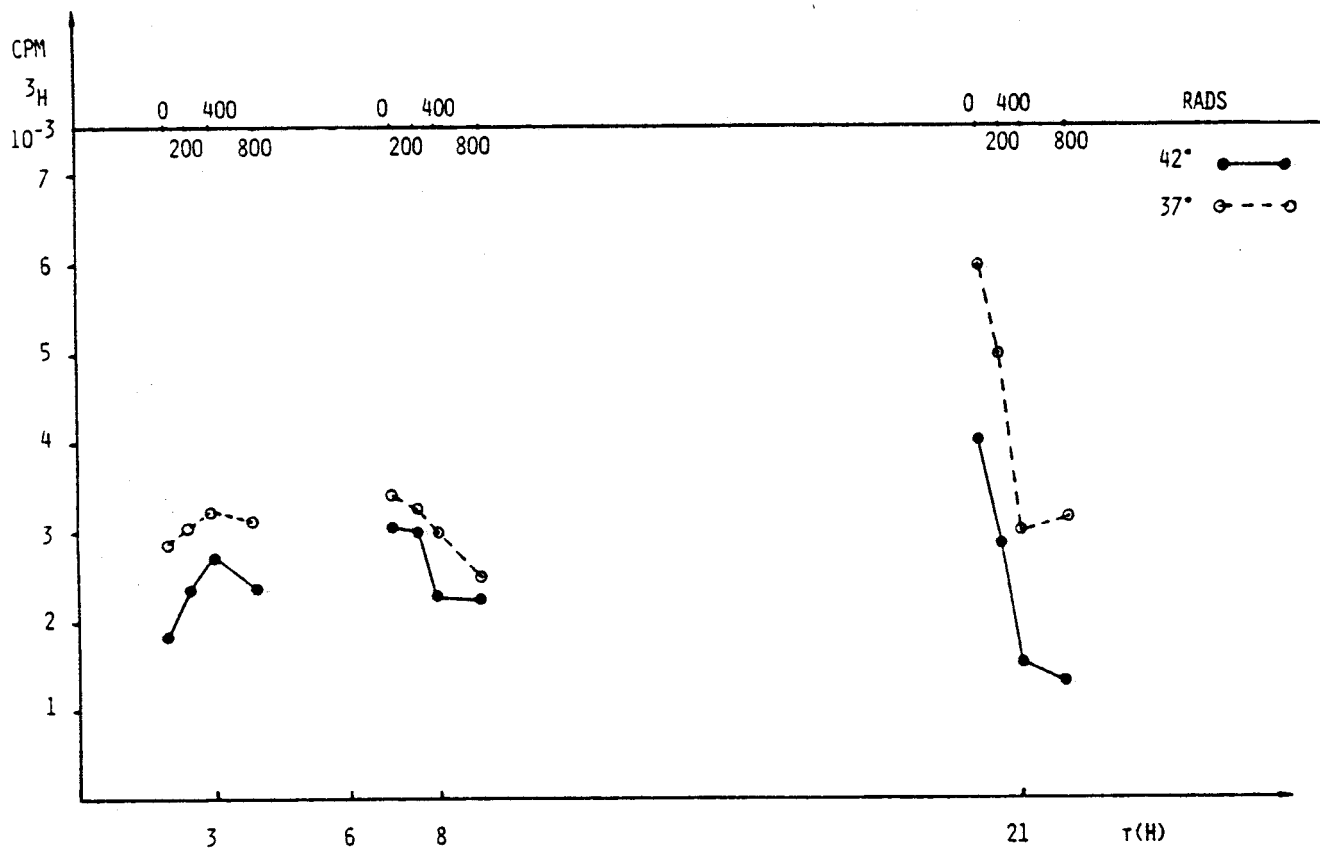


Fig. 5-19

Effets couplés des irradiations et de l'hyperthermie sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ par des cellules de mélanome murin Harding Passey HP4.

$2 \cdot 10^4$ cellules HP4 au temps 0.

Irradiation : 0, 200, 400, 800 rads.

Choc thermique à $43,5^\circ$ 4 h avant l'irradiation.

Pulse de 2 h de $^3\text{HTdR}$ à 3, 6, 8 et 21 h.



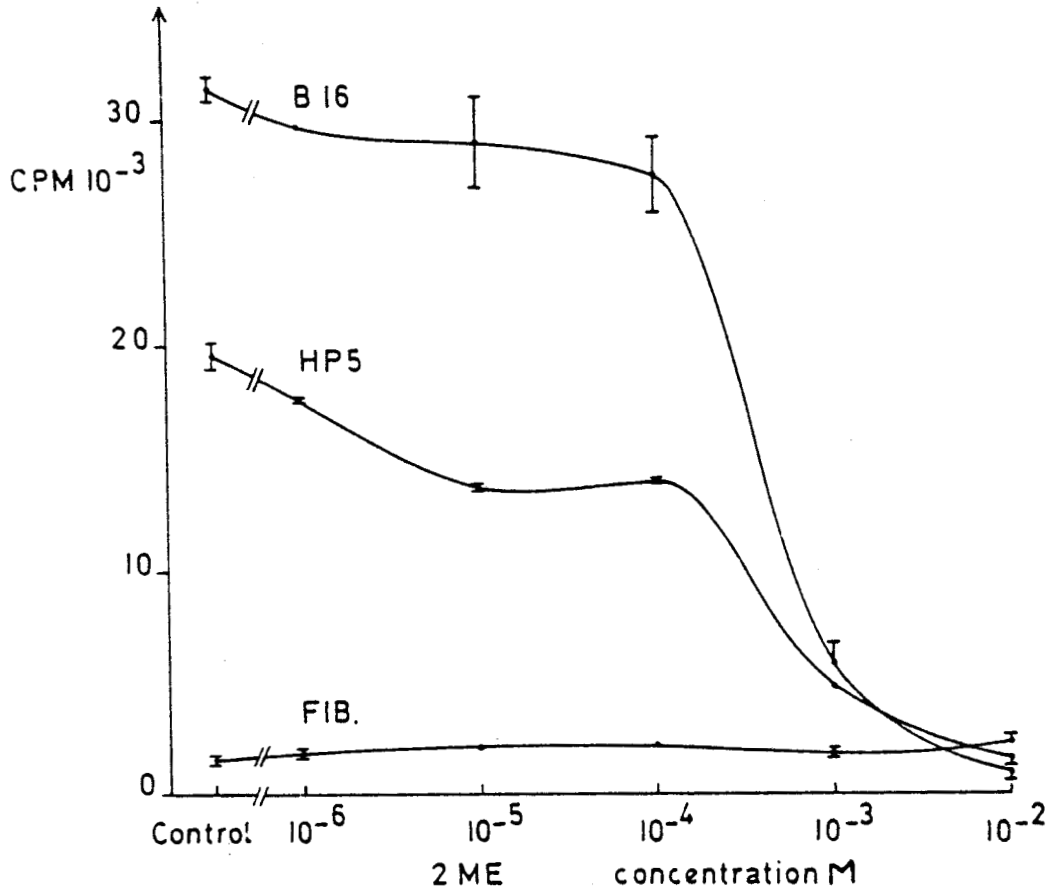


Fig. 5-20

Effet du mercaptoethanol sur deux lignées de mélanome murin B16 et HP5.

Concentration en ME de 10^{-2} à 10^{-6} M.

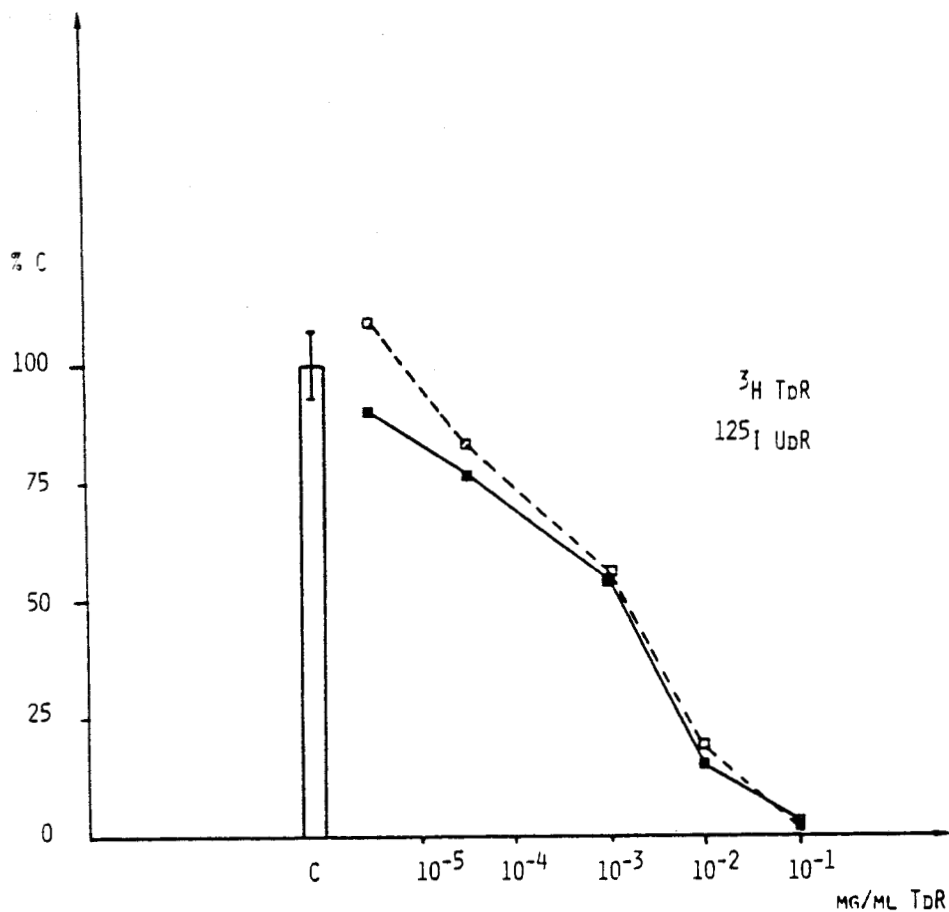


Fig. 5-21

Inhibition de l'incorporation de ³HTdR et ¹²⁵IUdR par la thymidine froide. % par rapport au contrôle.

Concentration de TdR = 10⁻¹ à 10⁻⁵ mg/ml, soit 4,13 10⁻⁴ M à 4,13 10⁻⁵ M.

Cellules HM6. P.M. TdR = 242.

Temps d'incubation et de pulse : 4 h.

un choc thermique à 43,5° C des cellules HP4. L'irradiation des cellules à dose croissante provoque aussi des perturbations dans la réponse à l'incorporation de la thymidine tritiée. La figure 5-18 nous montre l'effet des irradiations à 200, 400 et 800 rads sur des cellules HP4. La figure 5-19 montre le couplage de l'hyperthermie et de l'irradiation sur le métabolisme de synthèse du DNA. Une cohérence de résultats n'apparaît qu'après 8 heures post hyperthermie/irradiation. Les résultats à 21 h sont fidèles à la théorie. Les résultats avant 8 h sont instables. Ceci est dû à des phénomènes parasites telle la réparation du DNA provoquant des incorporations inattendues de $^3\text{HTdR}$. Comme on peut le voir dans les figures 5-17 et 5-19, l'effet de l'hyperthermie est additif dans ce système in vitro. En effet, les pics de réponse à 21 h sont sensiblement égaux.

La figure 5-20 nous montre la réponse similaire de deux cultures en phases métaboliques quelque peu différentes mais qui répondent aux mêmes doses d'un effecteur qui, dans ce cas, est le 2 mercaptoethanol. Le 2 ME est un réducteur de ponts S-S. Sa cytotoxicité est la résultante de la dénaturation des structures quaternaires et tertiaires des protéines de la cellule.

5.3.3 Etalonnage de la courbe d'inhibition par la thymidine.

La thymidine est un cytostatique reconnu (Giovannella). Ce nucléoside que l'on retrouve dans tout système biologique est transformé en dTTP avant d'être incorporé dans le DNA. Une accumulation de dTTP produit une rétro-inhibition de la ribonucléotide réductase qui entraîne une diminution du métabolisme de synthèse des pyrimidines. D'un autre côté, la thymidine est évidemment en radio compétition avec la thymidine tritiée. Lorsque l'on utilise la $^3\text{HTdR}$ comme précurseur pour mesurer l'effet de la TdR, la courbe d'inhibition est la résultante de ces deux propriétés. Une manière de contourner la difficulté est d'utiliser un analogue non radio compétitif tel l' ^{125}I UdR. Il apparaît en effet (figure 5-21) que l'effet de la TdR sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ et ^{125}I UdR soit quelque peu différent et ce en particulier dans les zones de concentration de

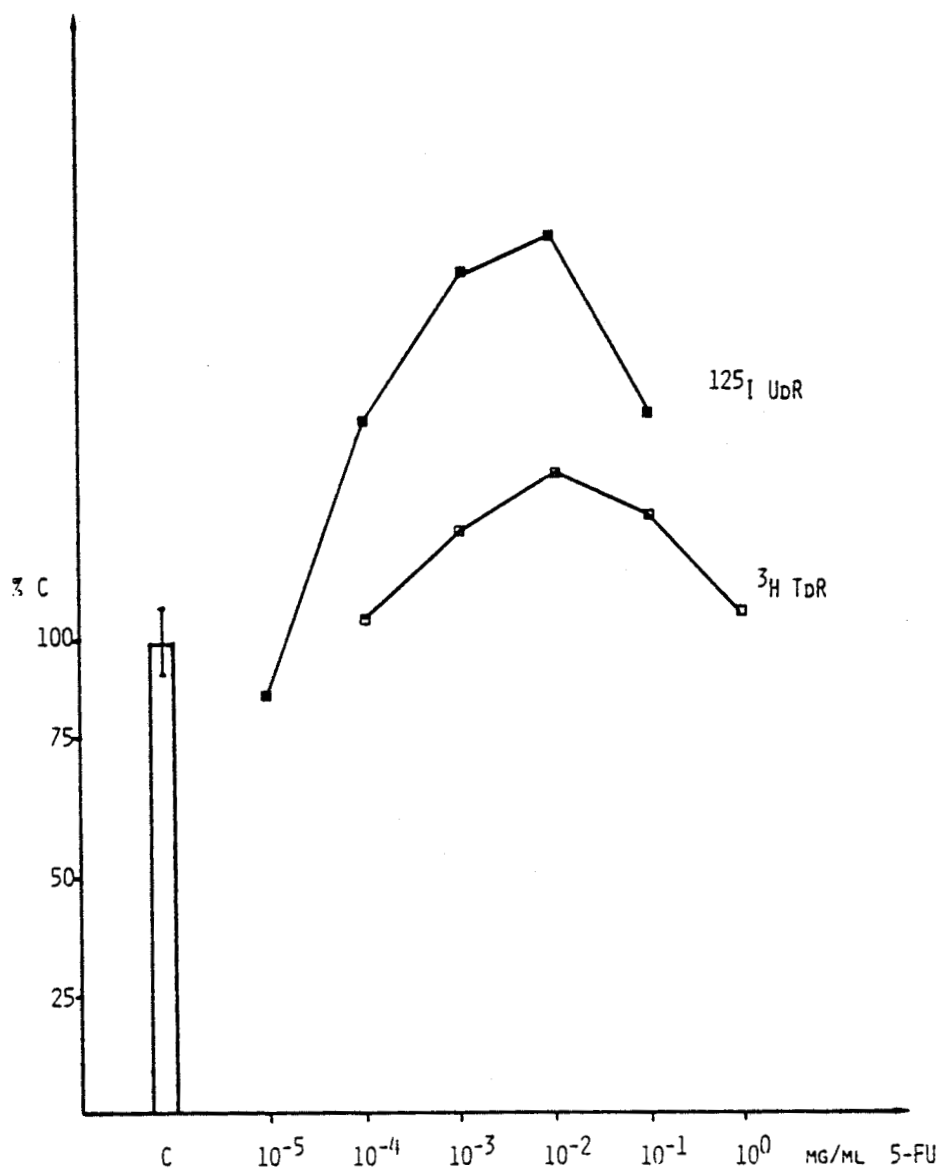


Fig. 5-22

Effet de 5FU sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ et $^{125}\text{IUdR}$.
 Concentration de 5FU de 10^0 à 10^{-5} mg/ml, soit $8,26 \cdot 10^{-3}$ à $8,26 \cdot 10^{-8}$ M
 Cellules HM6. P.M. 5FU = 121.
 Temps d'incubation et de pulse : 4 h.



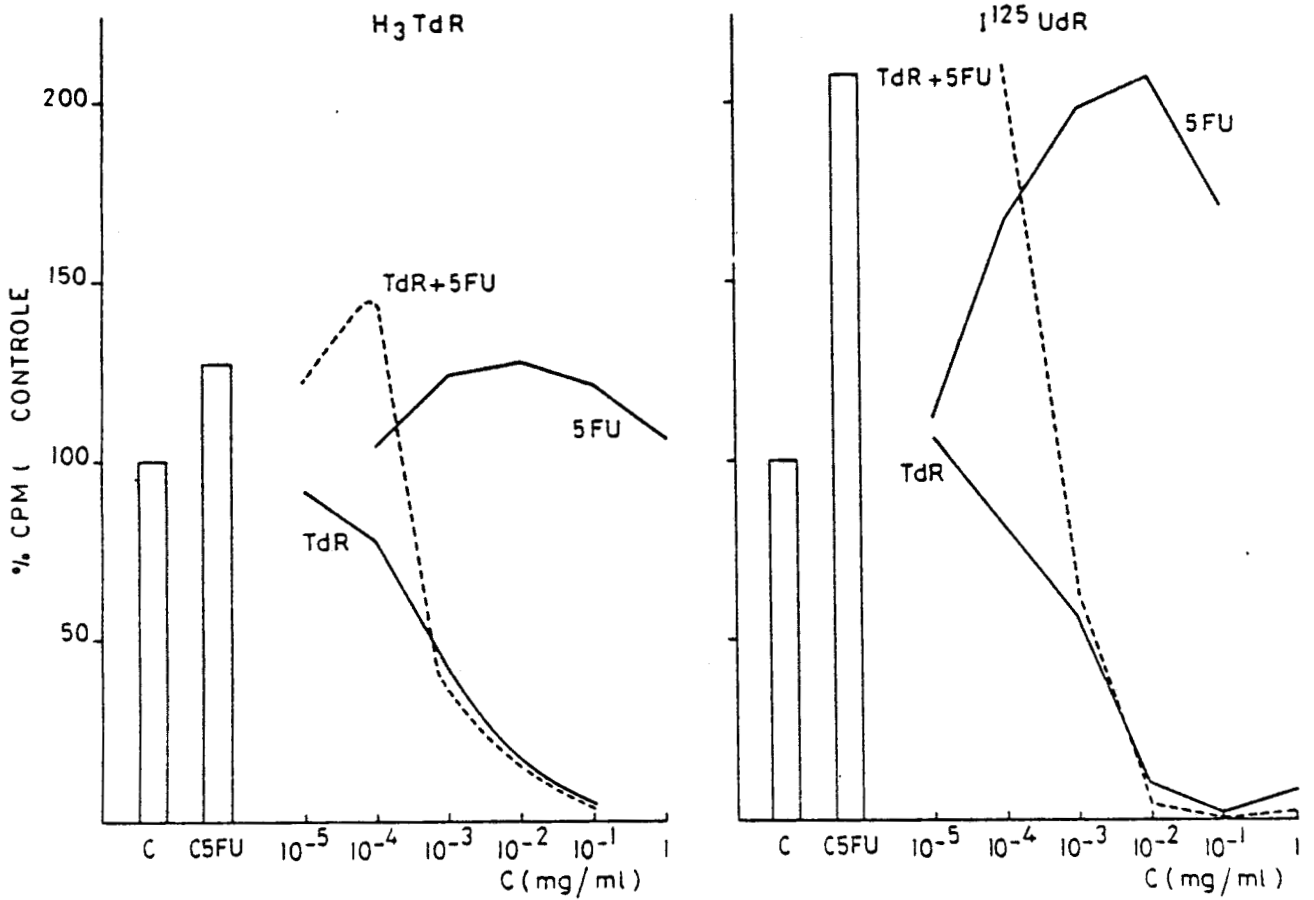


Fig. 5-23

Effet comparatif de l'inhibition de l'incorporation de ³HTdR, ¹²⁵IUdR avec ou sans 5FU 10⁻² mg/ml ou 8,26 10⁻⁵ M par TdR froide. Cellules HM6.
 Temps d'incubation et de pulse : 4 h.



TdR faible. Pour mettre encore mieux en évidence ce résultat, nous avons tiré parti d'un phénomène que nous avons découvert de manière fortuite, à savoir l'effet à court terme du 5FU sur l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ et $^{125}\text{I UdR}$. En effet, comme le montre la figure 5-22, lorsqu'on incube des cellules en présence de 5FU, on obtient une courbe en cloche de la réponse de l'incorporation du marqueur. Le phénomène est encore plus marqué pour $^{125}\text{I UdR}$ à 5FU 10^{-2} mg/ml où l'on peut obtenir jusqu'à 100 % d'amplification. Ceci pourrait être dû à une plus grande spécificité d'action du 5FU vis-à-vis du métabolisme de la désoxyuridine par rapport à la désoxythymidine.

Le 5 Fluoro Uracile (5FU) est un inhibiteur spécifique de la thymidilate synthétase, ce qui provoque une diminution du pool endogène de thymidine et la nécessité pour la cellule d'utiliser la voie métabolique de sauvetage. Au niveau de l'incorporation des précurseurs, un artefact est créé et l'incorporation de la $^3\text{HTdR}$ ainsi que de l' $^{125}\text{I UdR}$ est favorisée. La spécificité d'action apparaît plus importante pour l' $^{125}\text{I UdR}$.

Lorsqu'on incube les cellules avec 5FU 10^{-2} mg/ml en présence de TdR, les courbes de réponses sont semblables pour les concentrations au-delà de 10^{-3} mg/ml. En deçà de 10^{-3} mg/ml, cependant, le phénomène d'amplification intervient, rendant négligeable le phénomène de radio compétition. En résumé, au-delà de 10^{-3} mg/ml, l'action de la thymidine est biologique ("blocage thymidine") et le phénomène de radio compétition négligeable, et inversement pour les doses en deçà de 10^{-3} mg/ml où l'effet biologique disparaît mais où l'effet de radio compétition demeure. L'usage d'un amplificateur, tel le 5FU qui réduit le pool endogène du précurseur, permet de mettre en évidence le point où les deux phénomènes s'annulent dans le cadre de cette expérience, soit aux alentours de 10^{-3} mg/ml de TdR. La variation de l'activité spécifique du marqueur pourrait déplacer ce point à gauche ou à droite.

Cette propriété d'amplification de la réponse qu'a le 5FU ajoute un élément d'appréciation qui permettra de comparer la réponse d'autres effecteurs tels les surnageants de cellules macrophagiques.

La figure 5-23 nous montre les courbes d'étalonnage du système que nous utiliserons pour comparer différents effecteurs

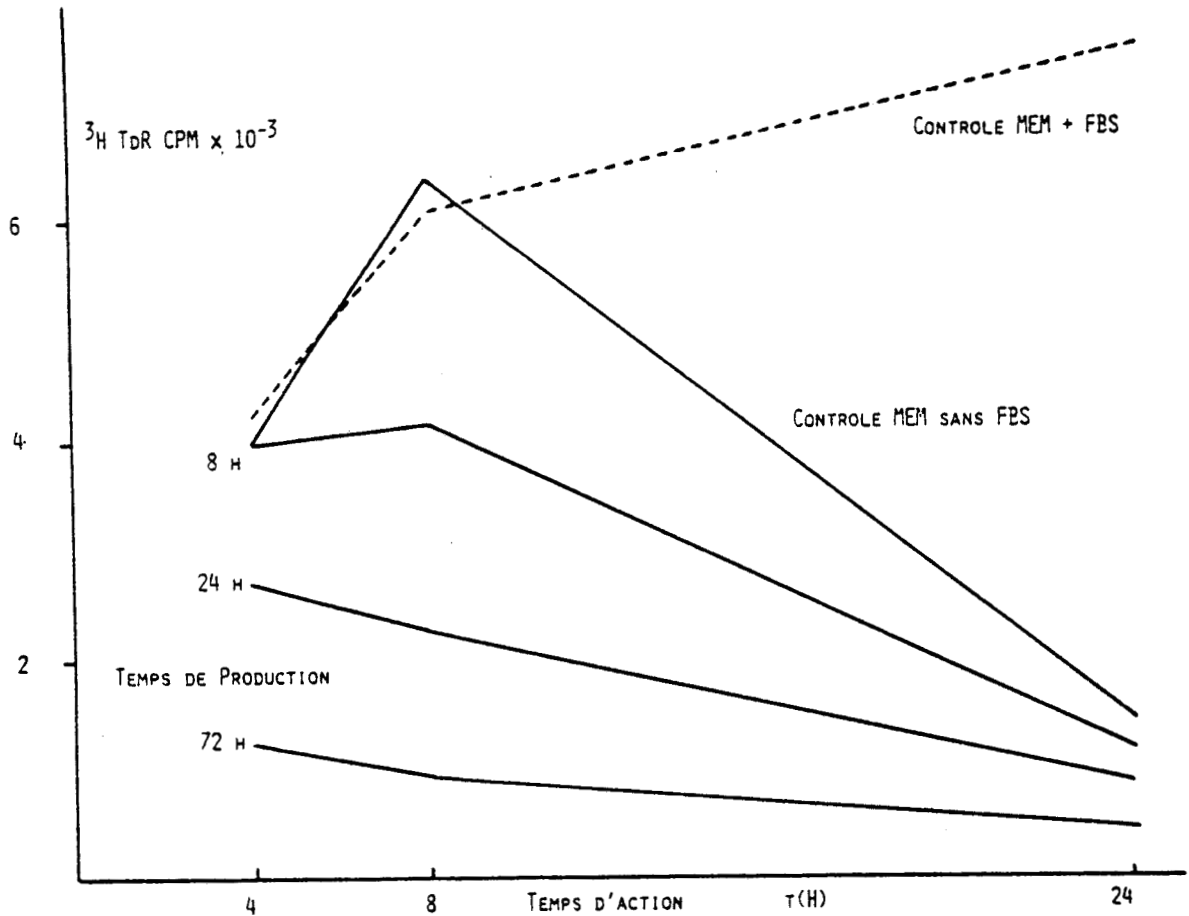


Fig. 5-24

Détermination des conditions optimales d'incorporation de $^3\text{HTdR}$ par les cellules cibles in vitro avec et sans sérum. Effet des surnageants de macrophages sur l'incorporation en fonction du temps de production des cyostatiques et du temps d'action sur les cellules cibles.

Cellules effectrices : macrophages de souris BDF1 - 10^6 cellules/ml.

Cellules cibles : mélanome de souris B16/cible - 10^4 cellules/puit.

Temps de production : 8, 24, 72 h.

Temps de réaction avec les cellules cibles : 4, 8, 24 h.



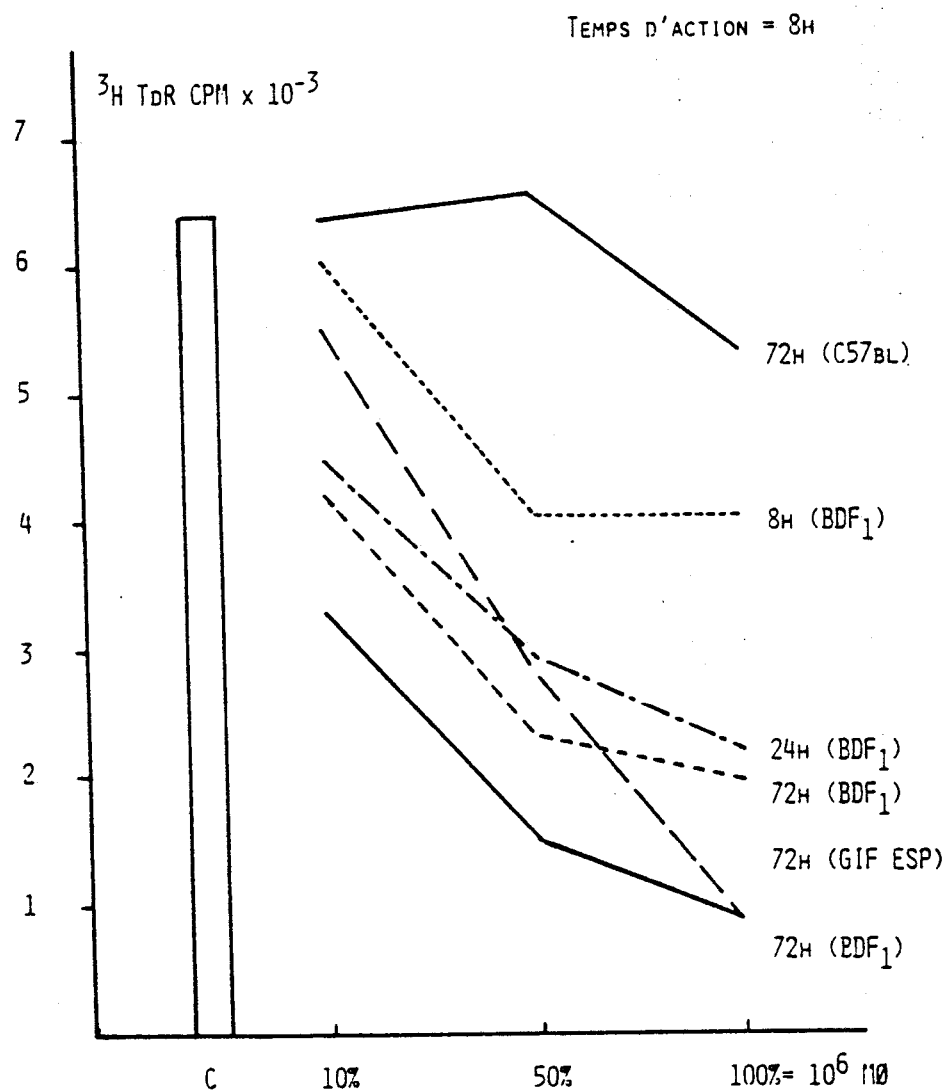


Fig. 5-25

Production des cytostatiques par les macrophages de différentes races de souris et leurs effets sur les cellules cibles en incorporation de $^3\text{HTdR}$.

Macrophages : C57bl, BDF₁, GIF ESP - 10^6 cellules/ml.

Temps de production : 8, 24 et 72 h.

Dilution de surnageants de macrophages : 100 %, 50 %, 10%.



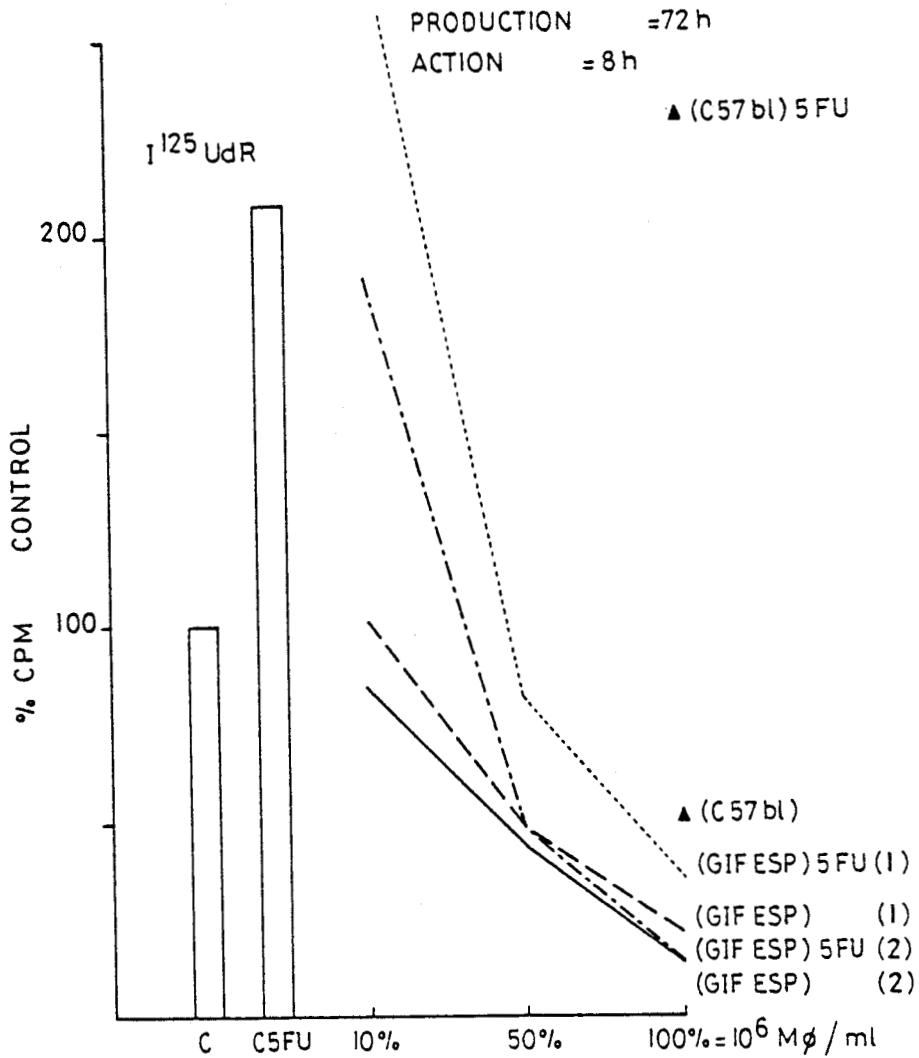


Fig. 5-26

Effet comparatif des surnageants de macrophages sur des cellules cibles HM6A avec ou sans 5FU 10^{-2} mg/ml.

Incorporation de 125 IUdR.

Macrophages : GIF ESP, C57bl - 10^6 MØ/ml.

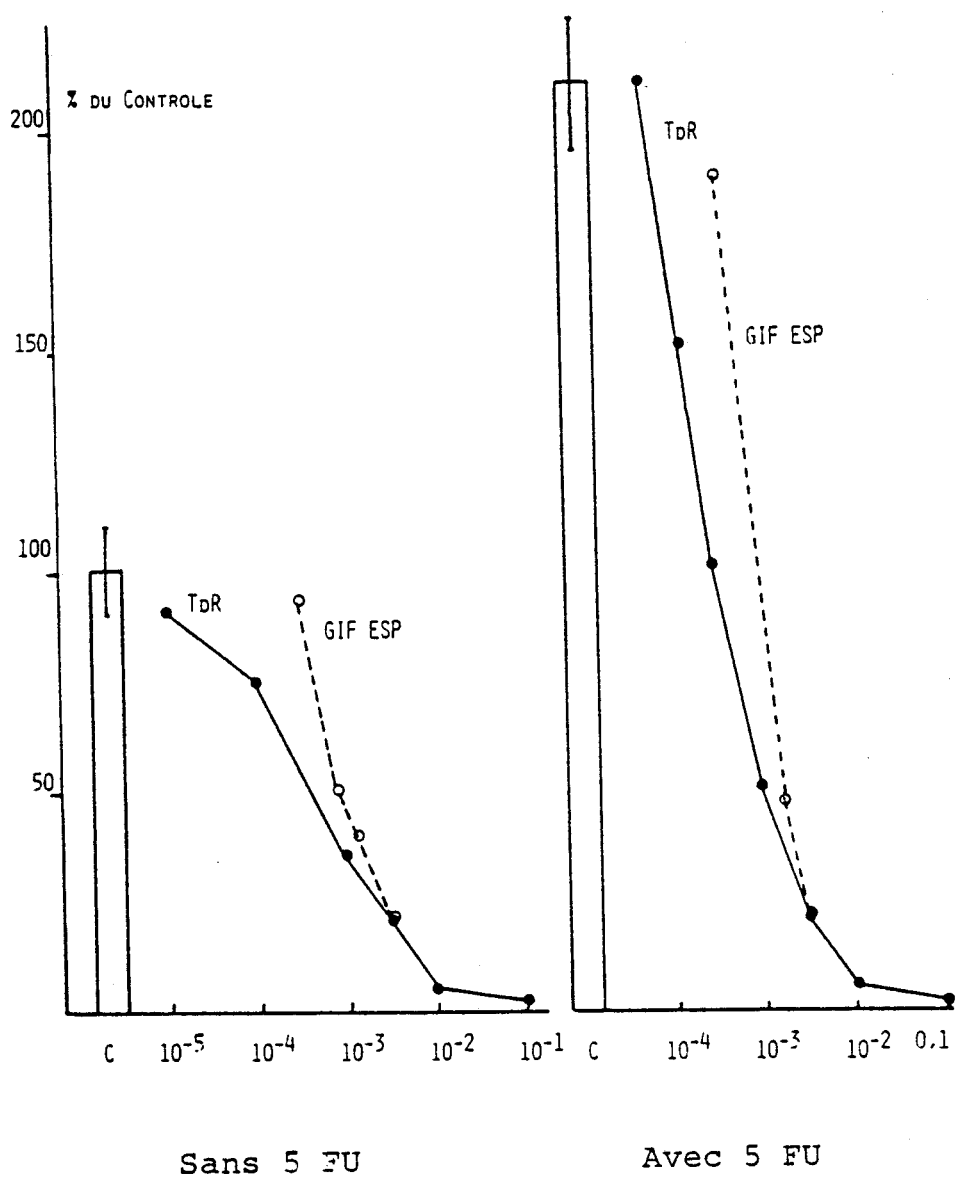


Fig. 5-27

Comparaison des pentes des courbes d'inhibition de l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ par la thymidine froide et les surnageants de macrophages GIF ESP de 72 h.

Courbes avec et sans 5FU 10⁻² mg/ml.



solubles.

5.3.4 Effet des sécrétions de macrophages sur l'incorporation des précurseurs des métabolismes du DNA des cellules tumorales in vitro.

Lejeune et al (140,141) ont mis en évidence que le macrophage péritonéal de souris normales était susceptible de produire in vitro des substances cytostatiques capables d'agir sur des cellules et en particulier les cellules tumorales. Les micro-méthodes de cultures nous ont permis de cerner le problème et de mesurer et comparer les phénomènes en dominant leurs paramètres. La figure 5-24 nous montre la réponse du système à des surnageants de macrophages contenant un produit cytostatique pendant 8 h, 24 h et 72 h et testé sur les cellules cibles pendant 4 h, 8 h et 24 h. Le milieu de culture MEM était exempt de FCS afin de ne pas introduire un élément paramétrique supplémentaire. Dans ces conditions, on voit qu'il est nécessaire de tester les facteurs solubles avant les 24 heures et de manière optimale à 8 h afin de mettre le mieux en évidence les cytostatiques.

La figure 5-25 montre la comparaison de production de cytostatique par les macrophages de 3 races de souris différentes. Le temps d'incubation est essentiel et comme on peut le voir, les macrophages dans les souris C57bl ont une activité cytostatique plus faible que les souris GIF ESP et BDF1.

La figure 5-26 met en évidence l'effet du 5FU sur les surnageants de macrophages. La réponse à la 5FU nous suggère que ces cytostatiques pourraient avoir une similitude avec des analogues de synthèse des pyrimidines.

Cependant, (figure 5-27) les pentes des courbes d'inhibition ne se superposaient jamais totalement, ce qui permet de douter de ce que le phénomène soit exclusivement dû à de la thymidine froide ou un analogue proche.

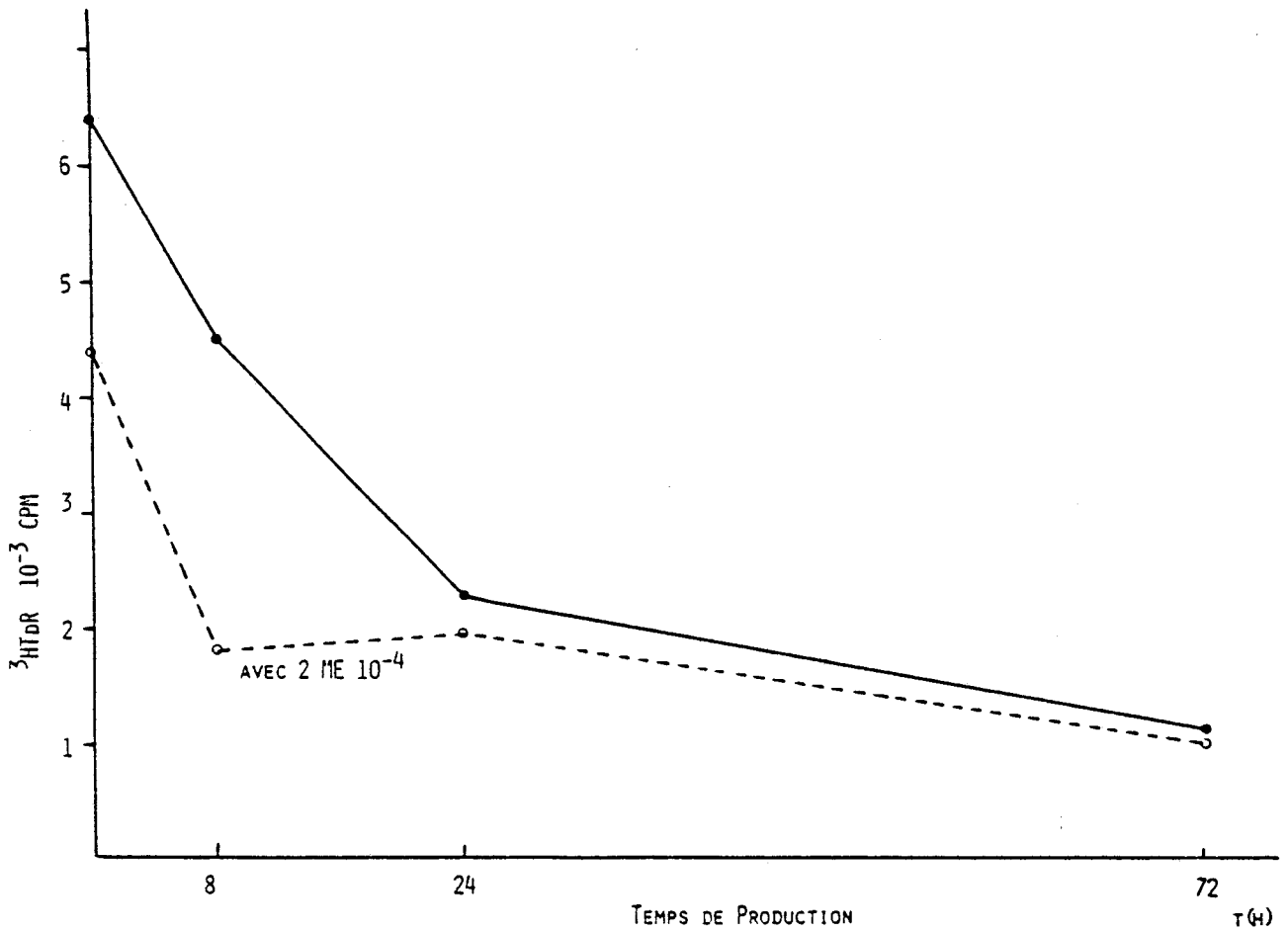


Fig. 5-28

Effet du 2 mercaptoethanol sur la production de l'inhibiteur de $^3\text{HTdR}$ par les macrophages de souris BDF1. Le temps d'action sur les cellules cibles HM6A est de 8 h.
 Concentration de 2 ME = 10^{-4} M.



L'expérience de la figure 5-28 nous montre l'influence du 2 mercaptoethanol sur la production et l'action des sécrétions de macrophages. A 72 h, l'adjonction de 2 ME n'ajoute rien à l'activité des cytostatiques, alors que dans les temps d'action plus précoces, le 2 ME semble avoir une action directe sur les cellules cibles. Les macrophages, par contre, n'y sont apparemment pas sensibles dans leurs mécanismes de production des cytostatiques, ce qui laisse éventuellement présager que les cytostatiques pourraient ne pas être des protéines ou tout au plus de petits peptides.

5.3.5 Réversibilité de l'effet de la thymidine froide et des surnageants de macrophages sur l'incorporation de précurseurs marqués.

Il était important de vérifier si les cytostatiques utilisés comme référence à ceux produits par la cellule effectrice - le macrophage- avaient un effet permanent ou éventuellement réversible sur le système de cellules cibles.

La première constatation fut que la thymidine avait un effet irréversible inattendu sur les cellules. Cet effet irréversible demeurait même après 18 heures de temps de récupération. La solution au problème de l'irréversibilité consistait à laver les cellules afin de rompre la "bulle" constituée par un micro-environnement cellulaire, celui-ci contenant un gradient d'effecteur suffisamment puissant que pour maintenir l'inhibition.

La figure 5-29 montre la réversibilité de l'action de TdR sur l'incorporation de l'iodo-déoxyuridine et la figure 5-30 , la comparaison faite avec deux surnageants de macrophages dont les effets sont eux aussi réversibles.

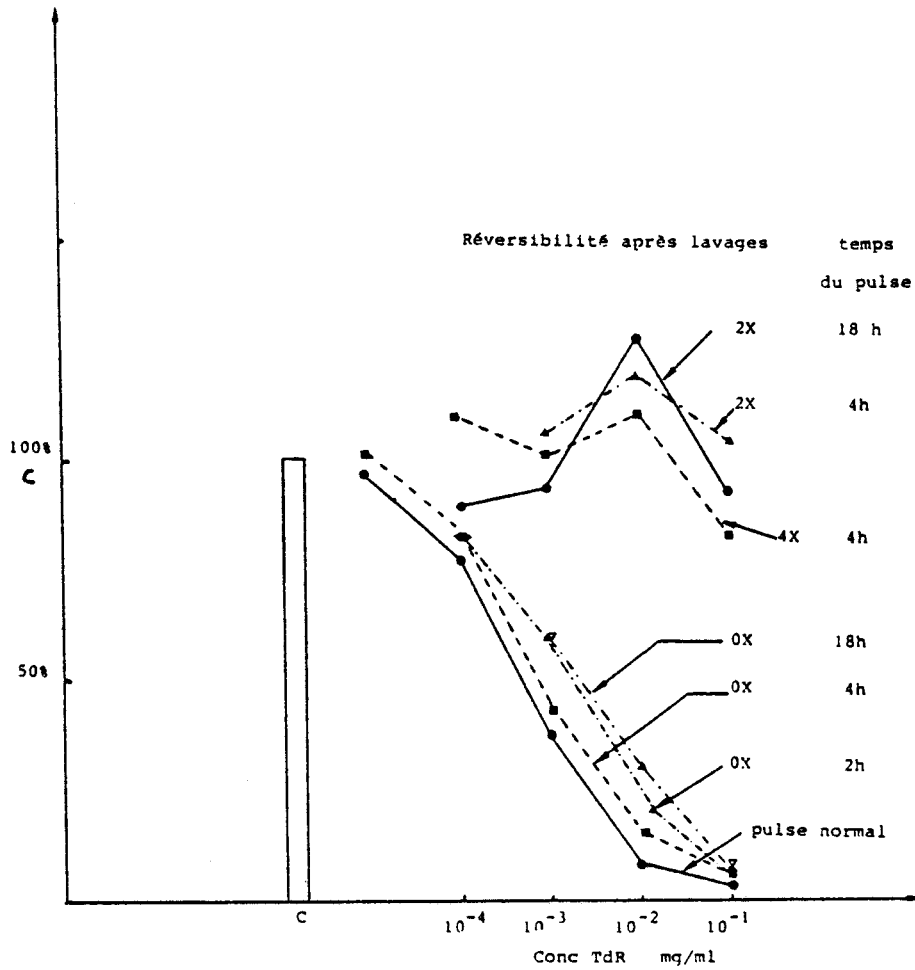


Fig. 5-29

Réversibilité de l'effet de la TdR froide sur l'incorporation de $^{125}\text{IUdR}$. Effet du lavage des cellules sur le mécanisme. 10^4 HM6A au temps 0. Pulse de 2 h à 2, 4 et 18 h. Lavages 2 ou 4 fois avec MEM.



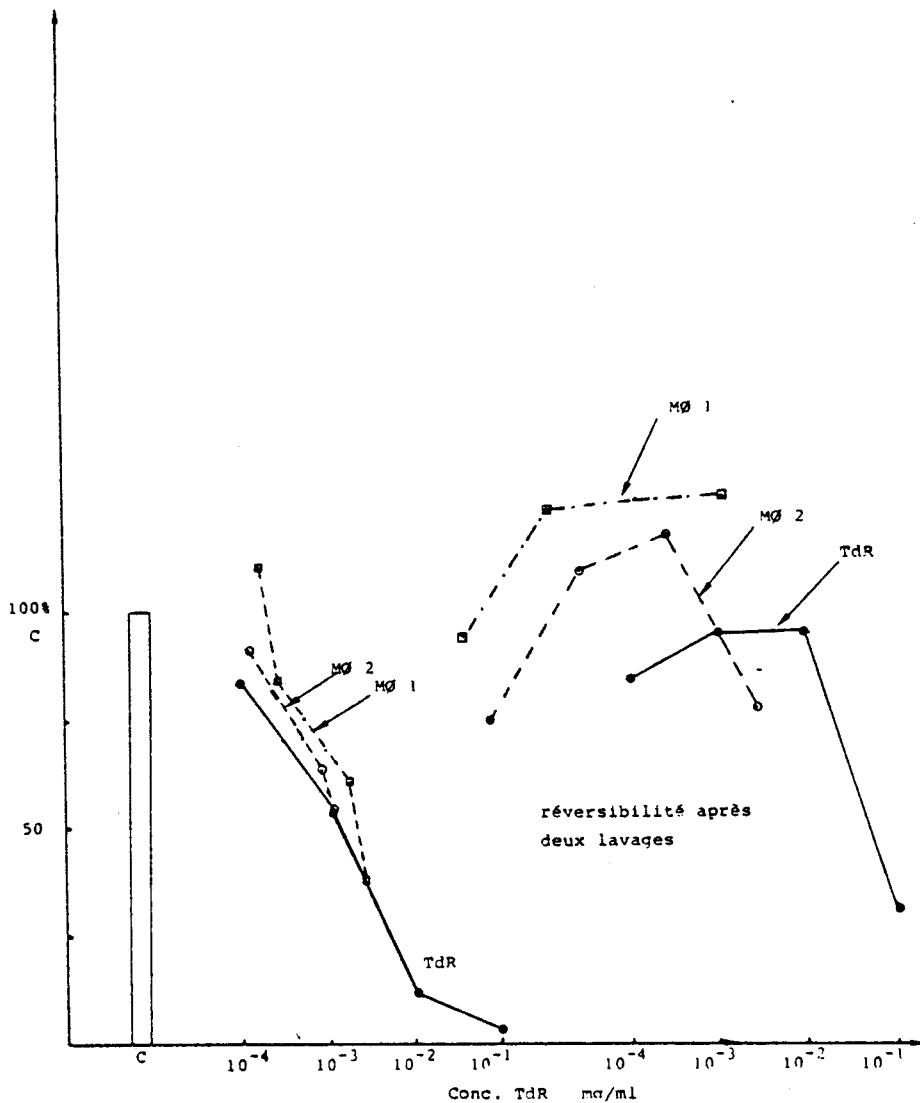


Fig. 5-30

Effet comparé de réversibilité de l'action cytotostatique des surnageants de macrophages et de la thymidine.

$2 \cdot 10^4$ HM6a au temps 0. Temps d'action des cytotostatiques : 2 h 30.

Temps de réversibilité après lavage : 2 h 30.

Concentration TdR : 10^{-1} - 10^{-4} mg/ml soit $4,13 \cdot 10^{-4}$ à $4,13 \cdot 10^{-7}$ M.

Surnageant de macrophage GIF ESP.



5.4 DISCUSSION

Comme on l'a vu dans le chapitre précédent, les macrophages ont non seulement une action cytolytique vis-à-vis de cellules cibles, mais aussi une activité cytotatique apparemment indépendante de leur niveau d'activation. Nous avons essayé de miniaturiser et de standardiser un test biologique permettant de mettre en évidence l'action cytotatique de divers effecteurs, dont le macrophage, afin de mettre^{en} évidence les phénomènes d'interaction plus fine entre cellules. Les perturbations métaboliques, tant au niveau des cellules cibles que des cellules effectrices, peuvent être démontrées par l'utilisation de précurseurs métaboliques marqués par des isotopes. (197,206)

En ce qui concerne l'immunothérapie spécifique ou non des tumeurs, le but ultime est de découvrir les mécanismes pouvant intervenir dans la régulation de la croissance tumorale. La présence de macrophages au sein d'une tumeur permet de penser qu'il n'a pas qu'un rôle passif et qu'une interaction modulée en intensité et dans le temps existe entre cette cellule immuno compétente et la cellule tumorale. (57,76,89,90,102,104,106,151,159,160)

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence l'existence de facteurs inhibant l'incorporation des précurseurs. Nos travaux, ainsi que ceux d'autres chercheurs suivant la même voie, suggèrent que des analogues de nucléotides ou nucléosides puissent être les molécules responsables de l'inhibition d'incorporation de thymidine tritiée et de ¹²⁵Iododéoxyuridine. (61,113,130,161,179)

Nos travaux montrent que les courbes d'inhibition des surnageants de macrophages et de la thymidine n'ont pas exactement la même pente. Elles sont suffisamment semblables pour que l'on s'intéresse de manière plus complète à l'éventuelle synthèse par le macrophage d'analogues de synthèse des nucléosides et en particulier les pyrimidines. (161,179,209,210)

VI

SYNTHÈSE ET RÉGULATION DES NUCLEOSIDES PYRIMIDIQUES
DANS LES MACROPHAGES NORMAUX ET TRANSFORMÉS

6.1 INTRODUCTION

Il a été montré que les macrophages de souris sécrètent dans leur milieu de culture des facteurs cytotostatiques (141,145) dont la thymidine paraît être un des composants (126,209). Les macrophages péritonéaux normaux sont des cellules terminales qui ne se divisent plus (145). Elles ne synthétisent pas de DNA. Elles synthétisent et relarguent cependant une très grande quantité de thymidine, ce qui nous a amené à penser que ces cellules devaient être déficientes en leurs systèmes de régulation de synthèse des nucléotides et du DNA, et en particulier de leurs enzymes. Les enzymes principaux sont la thymidilate synthetase et les thymidines kinases (154).

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'incidence de la modulation de l'activité de thymidine kinase sur la synthèse et la production dans le milieu de thymidine par les macrophages normaux.

La présence de thymidine dans les surnageants de macrophages a été quantifiée par un test biologique comparatif à l'aide de cellules de HM6 mélanome humain sensible à ce nucléoside. La présence de thymidine a pu être mise en évidence par la chromatographie en couche mince, et la chromatographie sur papier ascendante. Les macrophages transformés qui ont une activité de thymidine kinase équivalente à celle d'une autre cellule ont été utilisés comme témoins.

Les métabolismes de synthèse des nucléosides et nucléotides pyrimidiques ont été étudiés en utilisant divers précurseurs radioactifs et diverses techniques de tests biologiques en microméthodes

et de chromatographies.

Ce chapitre essaie de mettre en lumière la modulation subtile de la croissance des cellules humaines sensibles à la thymidine et le rôle que pourrait jouer une cellule thymidine kinase déficiente comme le macrophage dans le processus d'interaction cellulaire.

6.2 MATERIEL ET METHODES

6.2.1 Les cellules

Les macrophages péritonéaux sont obtenus des souris C57bl, Balb/c, BDF1 et GIF par un lavage péritonéal avec 3 ml de milieu Dulbecco contenant 25 mM de tampon Hepès et 100 mg de L-glutamine (cat. 232 - batch 902105 - Gibcobiocult) plus 10 % de FCS inactivé à la chaleur (cat. 629 - batch L882503 - Gibcobiocult). Après l'adhérence des cellules au plastique de la boîte de culture, les cellules non adhérentes sont éliminées en rinçant trois fois à l'aide de milieu PBS.

Les macrophages transformés sont des lignées continues obtenues auprès d'autres laboratoires de culture de cellules. La lignée IC21 (136) est un don du Dr Mael de Epalinges-lez-Lausanne, Suisse. Les J774A et P388D1 sont un don du Dr Van Loveren, Utrecht University, Hollande. Ces cellules sont maintenues en boîtes de culture Nunc (Gibcobiocult) dans du milieu Dulbecco modifié avec 25 mM Hepès 100 mg L-glutamine et 10 % de FCS inactivé. Les cellules sont passées en les rinçant d'abord deux fois dans du H4 EDTA 0,2 % dans PBS, puis en les incubant à 37° C avec la même solution. Après 10 à 15 minutes, les cellules sont détachées définitivement par agitation mécanique et léger pipettage. L'EDTA est éliminé par centrifugation (10 minutes à 500 g) et les cellules lavées une fois dans du milieu frais avant d'être resuspendues et redistribuées dans les boîtes de culture et incubées à 37° C.

Les cellules tumorales sont des cellules de lignée continue de mélanome humain obtenues en notre laboratoire d'une métastase sous-cutanée. Nous avons aussi utilisé le mélanome B16 de la souris C57bl.

Les monocouches de cellules sont cultivées dans du HAM F10 (Gibcobiocult) avec L-glutamine et 10 % FCS inactivé. Les passages

des cellules se font comme pour les macrophages transformés, mais avec de la trypsine (0,05 %) et l'EDTA (0,025 %) dans PBS.

Les cellules L cells L925/25 sont cultivées dans le milieu Dulbecco avec 10 % FCS. Les cellules sont passées avec de la trypsine 1/300 dans PBS sans EDTA.

6.2.2 Production de milieux conditionnés par les macrophages et les cellules tumorales.

Le milieu de culture Dulbecco sans FCS a été utilisé dans tous les cas afin de normaliser les expériences. Les macrophages normaux (C57b1, GIF et BDF1), les macrophages transformés (IC21, J774A, P388D1) et les cellules tumorales (B16 et L cells) sont incubés à $t=0$ à une densité de 10^6 cellules par ml. Après 72 heures d'incubation à 37° C, chaque surnageant est récolté et filtré sur millipore (Billen, GS-SLGS 0,25 OS-0, 22 μ m).

6.2.3 Le biotest en microculture des surnageants cellulaires.

Le test biologique de l'inhibition de l'incorporation des précurseurs du métabolisme de l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été décrit au chapitre 5.

La thymidine tritiée, 3 HTdR (Amersham), est ajoutée aux milieux conditionnés afin d'obtenir une activité spécifique égale à 2 μ Ci/ml. 125 IUdR (Amersham) est ajouté de la même manière. L'activité spécifique est dans ce cas de $5 \cdot 10^{-1}$ μ Ci/ml. Les cellules cibles HM6 sont ensemencées dans les micropuits des microplaques Nunc (Nunclon Delta Multidish 96 - n° 167008/SI - Nunc - Danemark) à une densité cellulaire de $8 \cdot 10^4$ cellules par puits de 200 μ l de suspension cellulaire. Les cellules sont incubées pendant 16 à 18 heures afin qu'elles adhèrent convenablement. Le premier milieu est remplacé par un milieu d'incubation contenant un précurseur métabolique marqué au tritium (3 H), au carbone (14 C) ou à l'iode (125 I). Du milieu normal est utilisé comme contrôle. Après 4 heures d'incubation, les surnageants

sont éliminés, les cellules lavées 3 fois avec PBS. Les cellules sont alors lysées avec du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 3 % et les lysats comptés aux compteurs β ou γ dans les tubes adéquats.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'incorporation des précurseurs par rapport au contrôle. Les expériences sont effectuées en triplicats. La déviation standard est habituellement en dessous de 10 %. Le 5FU est utilisé comme amplificateur de la réponse d'incorporation des précurseurs des nucléosides et nucléotides pyrimidiques à la concentration de 10^{-2} M. Le biotest en microculture permet également de faire des test colorimétriques ou de comptages cellulaires. A la fin de l'expérience, les surnageants sont éliminés, les cellules sont lavées trois fois dans PBS et ensuite trypsinisées avec 50 μ l de trypsine-EDTA comme décrit précédemment. Les cellules sont alors comptées à l'haemocytomètre.

6.2.4 Chromatographie en couche mince de surnageants de macrophages normaux et transformés.

Les milieux cellulaires conditionnés sont lyophilisés et redissouts afin d'être concentrés 100 fois. Des gouttes de 10 μ l sont déposées sur une plaque de chromatographie en couche mince (cellulose F - 20 x 20 - n° 5718 - Merck). La méthode utilisée est celle de Randerath (189). Les solvants sont le méthanol, HCl 1,18, H₂O (7,2,1, V/V). Les substances de références contiennent du TdR, UR, CR et GR. Les taches sont révélées à la lumière ultra-violette à 254 nm.

6.2.5 Incorporation de ³HTdR par des macrophages normaux et transformés.

Ce test permet de mesurer l'activité métabolique de synthèse d'ADN chez les macrophages transformés ayant une activité en thymidine kinase et des macrophages normaux déficients en cette enzyme.

Un même nombre de macrophages des deux types sont ensemencés en micropuits Nunc à la concentration de $8 \cdot 10^4$ cellules par puit. Les macrophages sont les IC21, J774 A et C57bl cultivés en Dulbecco avec FCS 10 %. $^3\text{HTdR} = 5 \mu\text{Ci/ml}$ et les pulses de 1, 2, 4 et 8 heures. Les cellules sont lavées, lysées et comptées comme décrit précédemment.

6.2.6 Chromatographie en couche mince des surnageants de cellules ayant incorporé le précurseur de la thymidine, l'acide 6- ^{14}C orotique.

Des macrophages normaux (Balb/c), des macrophages transformés (IC21) et des cellules tumorales (HM6) sont ensemencés dans des micropuits Nunc à la densité de $2,5 \cdot 10^4$ cellules par puit dans du milieu Dulbecco avec 10 % de FCS avec de l'acide 6- ^{14}C orotique (code CFA171 - batch 72 - Amersham - Angleterre) pendant 72 heures. 10 μl de surnageant sont testés en chromatographie en couche mince avec les solvants décrits ci-dessus. La plaque de cellulose est ensuite grattée cm^2 après cm^2 . Chaque surface est récupérée dans une fiole à scintillation et l'activité en carbone ^{14}C comptée au compteur β (Packard). Le liquide de scintillation est le Pico Fluor 15 (Packard).

6.2.7 Chromatographie sur papier ascendante de surnageants de macrophages normaux incubés avec $^3\text{HTMP}$. Séparation des nucléosides et nucléotides.

La chromatographie sur papier ascendante est effectuée sur papier DEAE cellulose (Whatman - n° DE81) dans le formate d'ammonium 10^{-3} M pH 8 en tampon tris. Ce procédé sépare le nucléoside TdR des nucléotides tels le TMP. Cette chromatographie est utilisée pour séparer la thymidine métabolisée par les macrophages normaux à partir de TMP (thymidine monophosphate), précurseur immédiat de la thymidine 10^6 macrophages par ml sont incubés pendant 72 heures dans du milieu Dulbecco sans FCS avec 1 μCi par ml de $^3\text{H-TMP}$ (TRK - 245 - batch 11 - Amersham - Angleterre). Des spots de 10 μl de surnageants sont placés

sur le papier. Après la migration, des bandes de 1 cm de largeur sont coupées et comptées dans des fioles à scintillation avec 0,5 ml HCl 0,1 M et 4,5 ml d'Instagel (n° 6013009 - Packard).

6.2.8 Test de la thymidine kinase dans les macrophages normaux et transformés et dans les cellules tumorales.

Le test de la thymidine kinase (TK) est celui de Stadecker (210) légèrement modifié. $8 \cdot 10^5$ cellules sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes et lavées 2 fois avec PBS. Elles sont lysées avec 200 μ l de Triton X100 0,5 % (161 - 0407 - Bio-Rad Laboratories) dans du tampon tris 0,1 M (pH 8) (Art. 8386 Merck). Le lysat cellulaire est repris dans 400 μ l d'une solution de substrat enzymatique (2,61 mM ATP 1,97 mM $MgCl_2$; 2,38 mM NaF ; 4 μ M 3HTdR). Aux temps 0,5, 15 et 60 minutes, 10 μ l d'échantillons sont déposés sur le papier de chromatographie ascendante (Whatman DEAE cellulose DE81). La chromatographie est effectuée dans le formate d'ammonium 1mM. Le papier est séché, et des bandes de 1 cm de large découpées et comptées en fioles de scintillation (Packard). L'activité en TK cellulaire est mesurée par l'intensité du pic 3H -TMP résultant de la transformation par la kinase du 3HTdR en 3H -TMP (5').

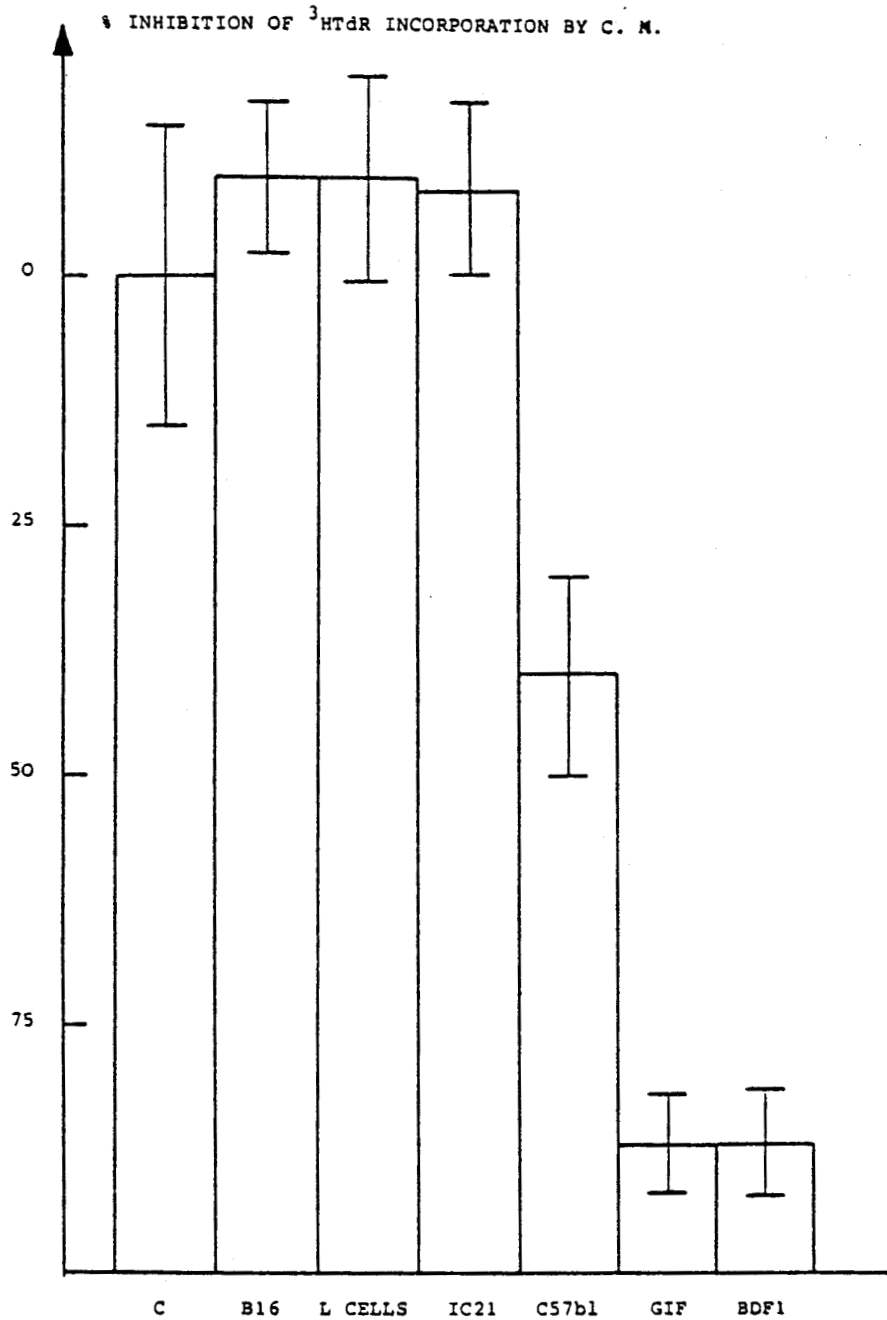


Fig. 6-1

Inhibition de l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ dans des cellules de mélanome humain HM6 par les milieux conditionnés par les macrophages péritonéaux de souris normaux C57bl, GIF et BDF1. Les contrôles sont des milieux conditionnés par les lignées de cellules B16, L et IC21.



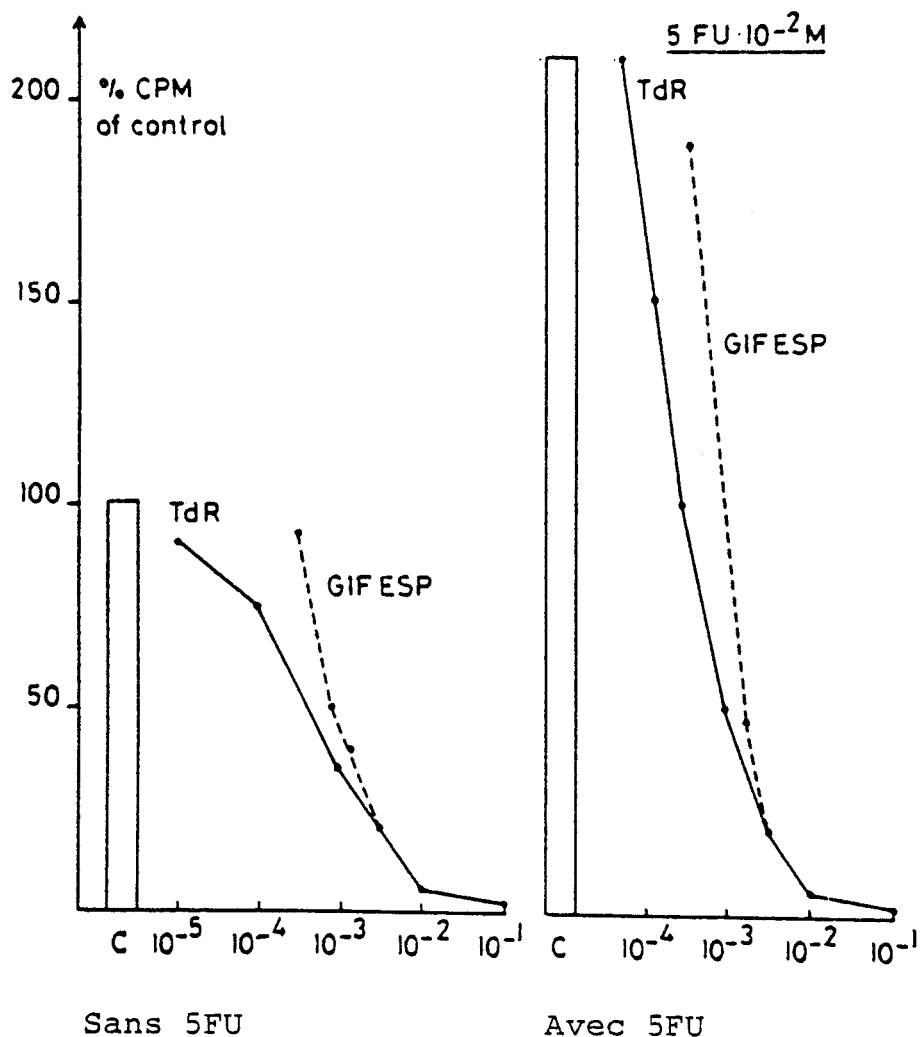


Fig. 6-2

Comparaison des milieux conditionnés par les macrophages de souris GIF par rapport à la courbe standard d'inhibition d'incorporation de ^{125}I UdR due à la TdR froide dans les cellules de mélanome HM6. Le milieu 5FU à 10⁻² mg/ml est utilisé pour amplifier la réponse. Temps d'action : 8 heures. (Voir texte)



6.3 RESULTATS

6.3.1 Modulation de l'incorporation de thymidine tritiée $^3\text{HTdR}$ dans les cellules de mélanome par les milieux conditionnés.

Les milieux conditionnés par les macrophages normaux de souris inhibent l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ dans les cellules cibles HM6 (Fig. 6-1). Les milieux conditionnés par les cellules L et B16 ainsi que par les macrophages IC21 n'ont pas d'effet sur l'incorporation des précurseurs marqués.

Cette inhibition d'incorporation produite par les surnageants de macrophages peut être comparée dans un système de référence standardisé à l'inhibition de l'incorporation de la $^3\text{HTdR}$ et de l' $^{125}\text{IUdR}$ par la TdR froide. Le 5FU est utilisé comme amplificateur de la réponse (224). L'inhibition de l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ est équivalente à 10^{-3} mg/ml ou $4 \cdot 10^{-6}$ M de TdR (Fig. 6-2).

6.3.2 Inhibition de la croissance cellulaire par le TdR.

Les milieux conditionnés et la TdR inhibent l'incorporation des précurseurs de DNA. L'effet a été étudié sur le nombre cellulaire. Les cellules HM6 sont cultivées avec de la TdR à des concentrations variant entre 10^0 et 10^{-4} mg/ml (Fig. 6-3). Les résultats montrent que la TdR inhibe la croissance cellulaire calculée en nombre de cellules à partir d'un seuil de concentration de 10^{-2} mg/ml, soit $4 \cdot 10^{-5}$ M.

De hautes concentrations de TdR ont un effet cytostatique par le phénomène dit de "blocage thymidine". Les milieux conditionnés par les macrophages n'affectent pas de manière significative les comptes cellulaires.

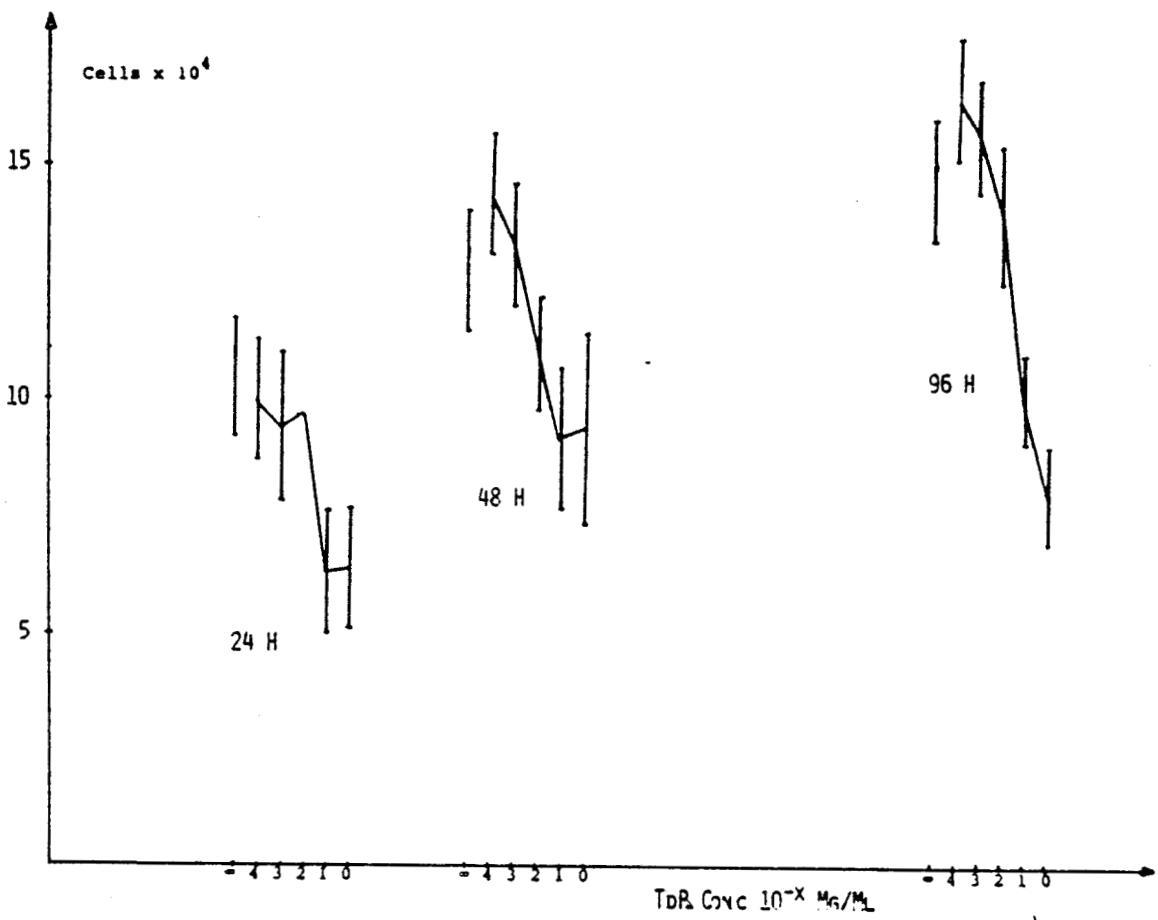


Fig. 6-3

Inhibition de la croissance des cellules de mélanomes HM6 in vitro par la thymidine. Les concentrations en thymidine varient de 10^0 à 10^{-4} mg/ml plus le contrôle soit $10^{-\infty}$.



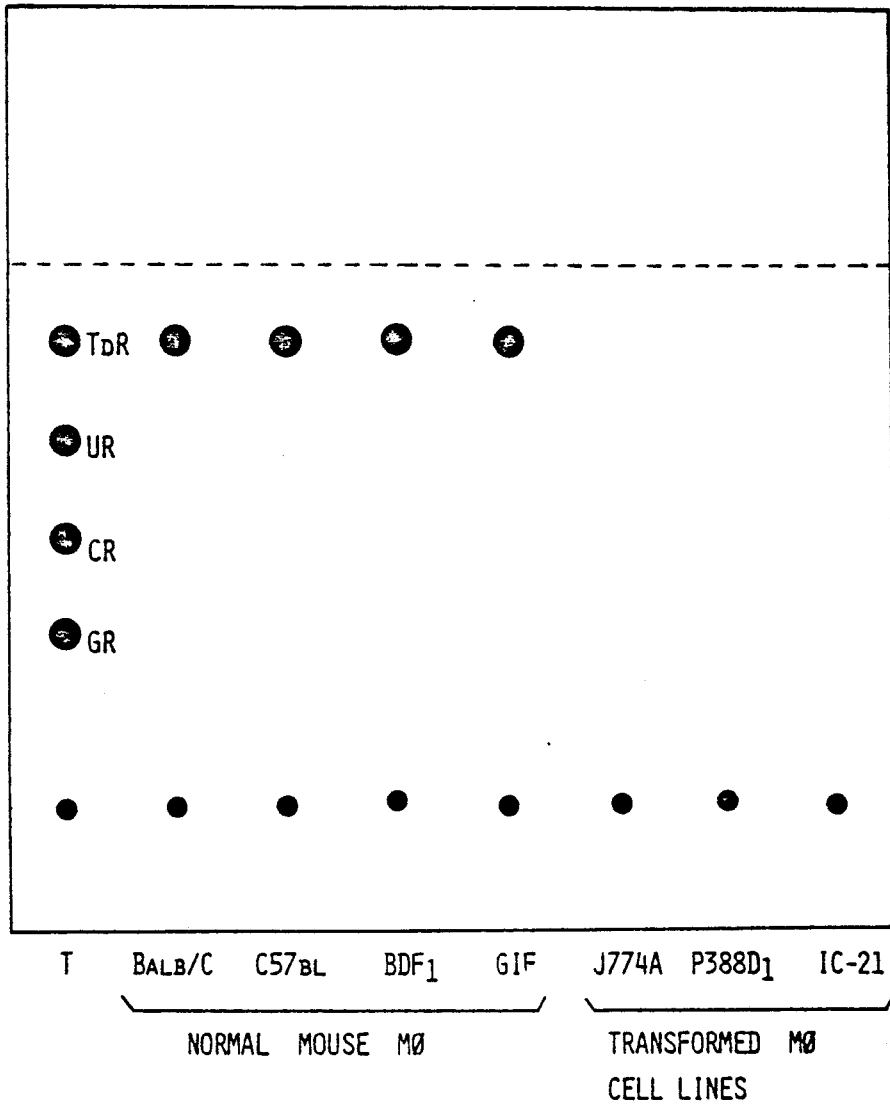


Fig. 6-4

Chromatographie en couche mince des nucléosides des milieux conditionnés par des macrophages normaux et transformés.



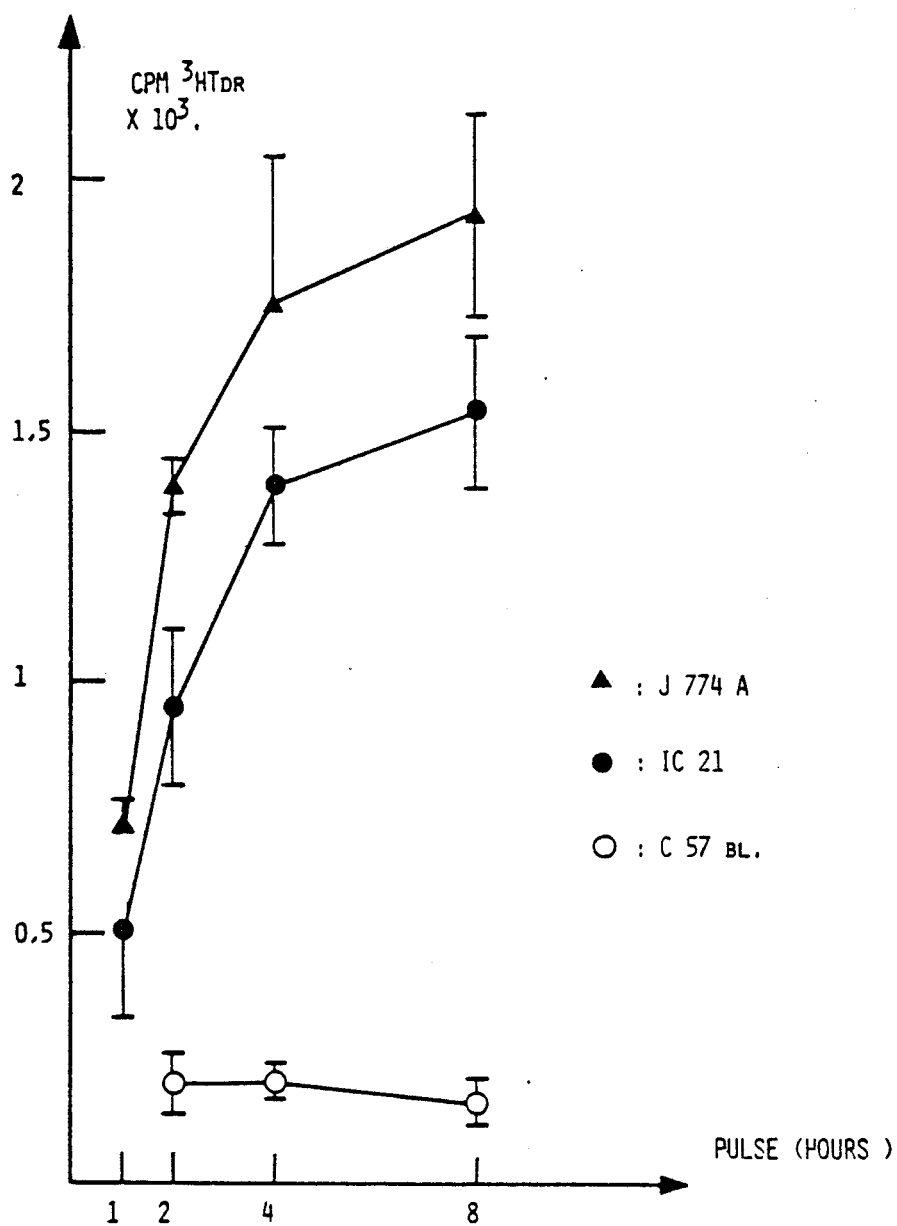


Fig. 6-5

Incorporation cumulative de la thymidine tritiée (3 HTdR) dans les macrophages normaux (C57bl) et les macrophages transformés (IC21 et J744A) en fonction du temps d'incubation.



6.3.3 Les macrophages péritonéaux de souris sécrètent de la thymidine in vitro alors que les macrophages transformés ne le font pas.

Les milieux conditionnés pendant 72 heures par divers types de macrophages transformés ou non ont été chromatographiés sur couche mince afin de mettre en évidence la présence de nucléosides. La Fig. 6-4 nous montre que les milieux conditionnés par les macrophages normaux sécrètent une quantité de TdR décelable par les U.V. Les macrophages transformés ne le font pas. Aucun spot de nucléosides n'a été détecté. La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} mg/ml de thymidine.

Les macrophages normaux sont capables de produire des quantités énormes de TdR. Nous avons donc investigué les métabolismes du DNA respectivement des macrophages normaux et transformés.

6.3.4 Incorporation de $^3\text{HTdR}$ par les macrophages normaux et transformés

L'incorporation de $^3\text{HTdR}$ par pulse de 1, 2, 4 et 8 heures (Fig. 6-5) nous montre la différence très importante qui existe entre les métabolismes de synthèse du DNA de ces deux types cellulaires. Les macrophages normaux complètement déprimés en thymidine kinase et possédant en outre un grand pool de TdR endogène incorporent des quantités négligeables de précurseurs alors que les macrophages transformés réagissent à ce point de vue comme des cellules ayant toutes leurs capacités de reproduction de lignées continues.

6.3.5 Synthèse de thymidine par les macrophages péritonéaux.

Afin de savoir si les macrophages possèdent la voie de synthèse métabolique et de catabolisme normale menant à la thymidine, nous avons étudié le devenir de deux précurseurs des nucléosides pyrimidiques et en particulier de la thymidine, soit le $6\text{-}^{14}\text{C}$ acide orotique (synthèse) et le $^3\text{H-TMP}$ (catabolisme).

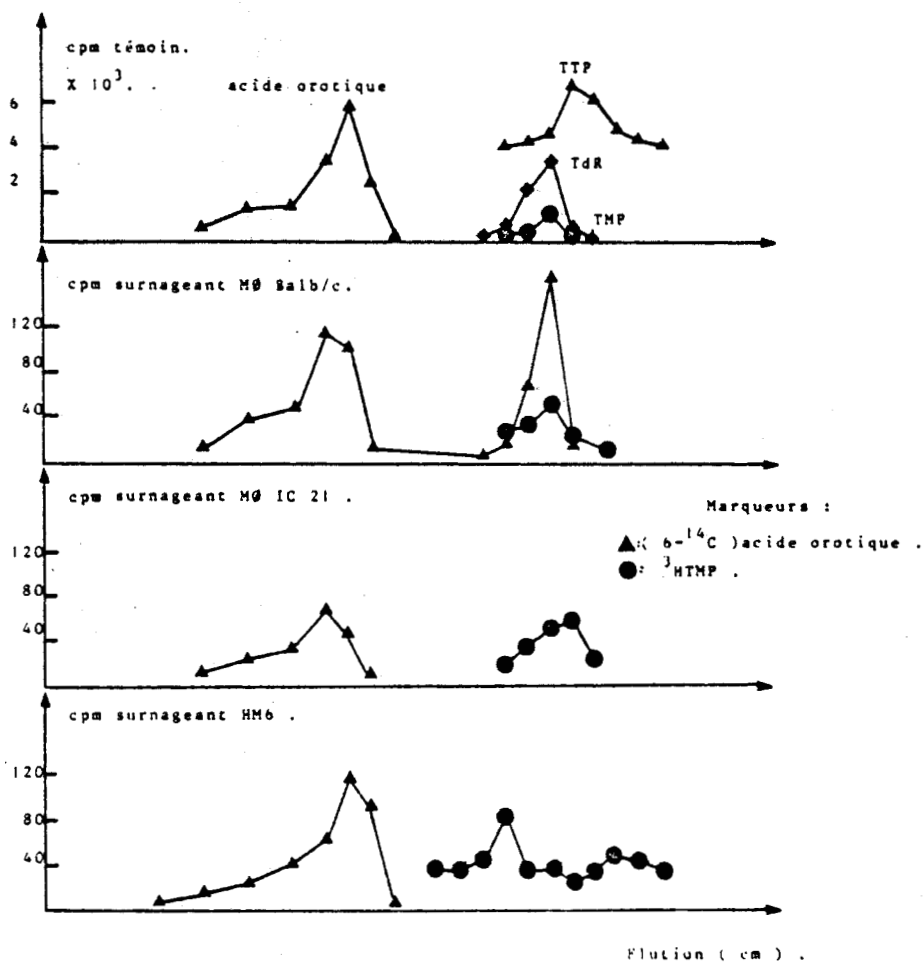


Fig. 6-6

Chromatographie en couche mince des milieux conditionnés par les macrophages normaux (Balb/c), les macrophages transformés (IC21) et les cellules tumorales HM6 après l'incorporation et la métabolisation pendant 72 heures du 6-¹⁴C acide orotique.
 ler graphique au-dessus = contrôle.



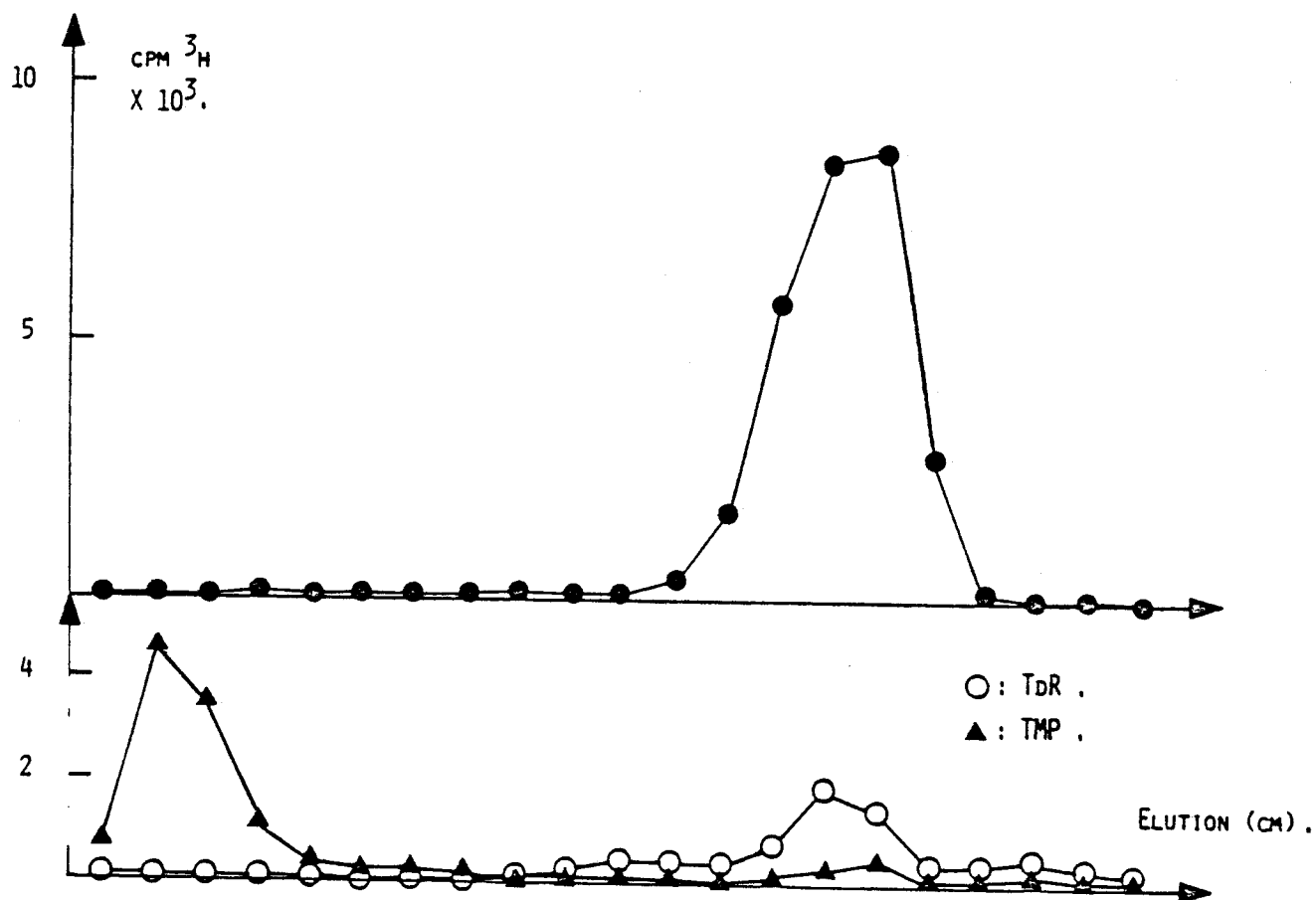


Fig. 6-7

Chromatographie sur papier ascendante au formate d'ammonium du milieu conditionnés par des macrophages normaux (BDF1) après l'incorporation et la métabolisation de ³H-TMP pendant 72 heures. Graphique du dessus = contrôle ³HTdR.

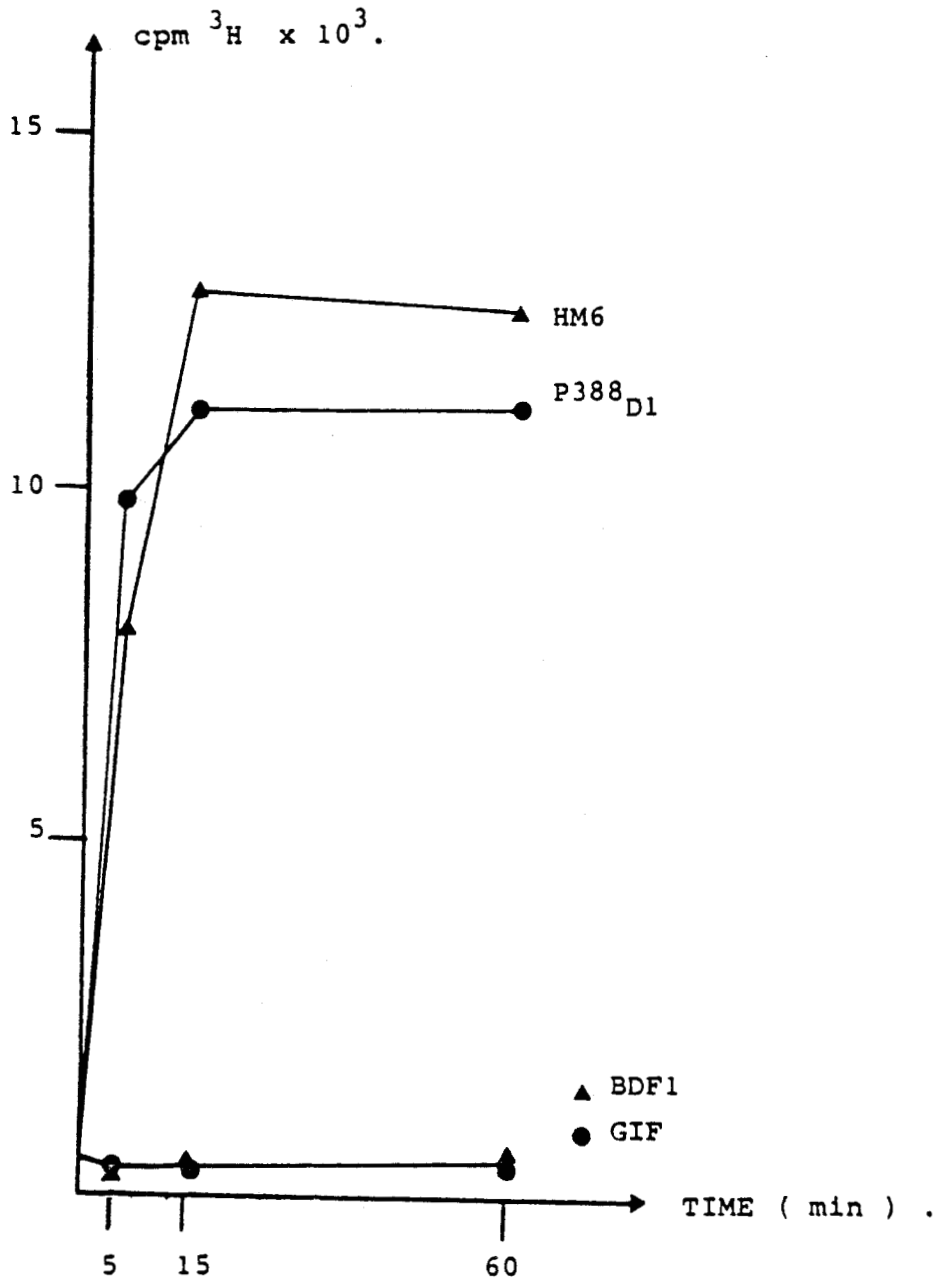


Fig. 6-8

Test de la thymidine kinase (TK) sur des lysats de $8 \cdot 10^5$ cellules. Les contrôles positifs sont les cellules tumorales HM6 et les macrophages transformés P388D1. Les macrophages normaux sont les BDF1 et les GIF.



Après incorporation de $6\text{-}^{14}\text{C}$ acide orotique, les macrophages péritonéaux synthétisent et relarguent de la $6\text{-}^{14}\text{C}$ thymidine dans le surnageant. Inversément, nous ne détectons pas de trace de $6\text{-}^{14}\text{C}$ TdR dans les milieux conditionnés par les macrophages transformés IC21 ni les cellules de mélanomes humains HM6 (Fig. 6-6).

De la même manière, du $^3\text{H-TMP}$, précurseur immédiat de la $^3\text{HTdR}$, fut ajouté aux cultures de macrophages normaux et transformés. La fig. 6-7 nous montre la transformation de $^3\text{H-TMP}$ en $^3\text{HTdR}$ détectée par la chromatographie ascendante sur papier, qui sépare ces deux molécules. Encore une fois, les macrophages normaux se montrent capables de cataboliser le nucléotide monophosphorylé et de le relarguer sous forme de $^3\text{HTdR}$, son nucléoside déphosphorylé.

Comme ces résultats suggéraient qu'il existât une anomalie au niveau des enzymes de synthèse nucléique des macrophages normaux, nous avons testé l'activité de la thymidine kinase dans les deux types de macrophages.

6.3.6 Test de la thymidine kinase dans les macrophages normaux et transformés.

La fig. 6-8 nous montre les résultats des tests de thymidine kinase sur plusieurs types cellulaires. Les macrophages P388D1 et les cellules de mélanomes humains HM6 expriment une intense activité en thymidine kinase. Inversément, les macrophages normaux, résidents de péritoines de souris n'ont pas d'activité TK décelable.

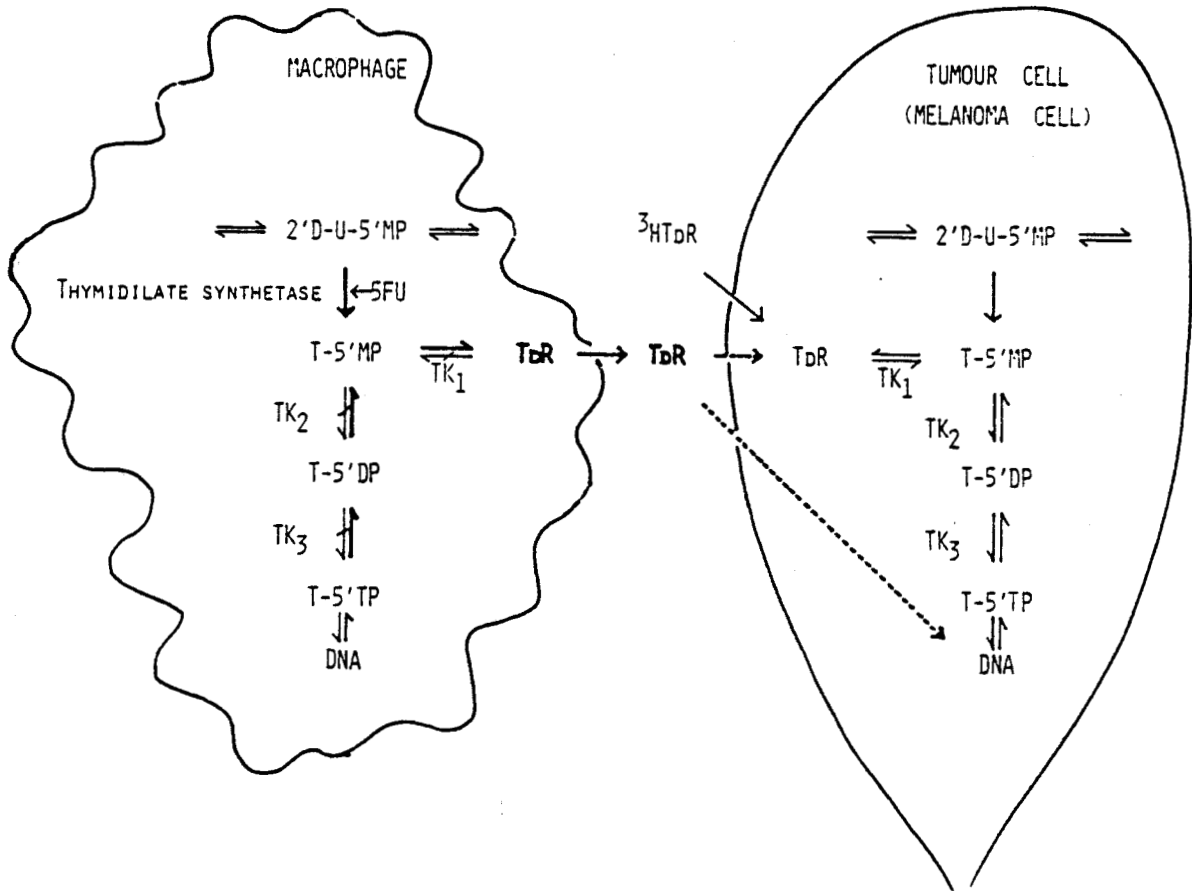


Fig. 6-9

Schema du mécanisme possible de la modulation du métabolisme de la cellule tumorale par la thymidine produite par les macrophages péritonéaux de souris in vitro.

6.4 DISCUSSION

Les études effectuées dans ce chapitre nous montrent que les macrophages normaux synthétisent et secrètent de grandes quantités de thymidine dans leur environnement et en tout cas dans leur milieu de culture in vitro.

Etant donné que certaines tumeurs solides sont envahies par les macrophages, ceci pourrait être un modèle de modulation de croissance des cellules tumorales sensibles à ce métabolite (Fig. 6-9).

Nous avons démontré (224) ainsi que d'autres auteurs (179,209) que les macrophages péritonéaux de souris secrétaient des facteurs solubles inhibant l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ (revue du sujet en 145). Certains auteurs (179,61) ont suggéré que la molécule effectrice était de la thymidine et nos résultats ne nous ont jamais permis d'écarter cette hypothèse. En effet, le nombre d'effecteurs pouvant moduler positivement ou négativement un métabolisme cellulaire sont très nombreux. Ce sont Stadecker et al (209) qui furent les premiers à montrer la présence de TdR dans les milieux conditionnés par une méthode biochimique (210).

L'utilisation d'un dosage radiobiologique en microméthode de culture cellulaire nous a permis de quantifier ces inhibitions d'incorporation en les comparant à des courbes standard de TdR. Nous avons en outre utilisé le 5FU comme amplificateur de la réponse de notre test. En effet, le 5FU, en inhibant l'enzyme thymidilate synthétase, déprime le pool endogène de TdR et de ce fait amplifie l'incorporation de $^3\text{HTdR}$ ou de $^{125}\text{IUdR}$. Il rend le test plus sensible de 50 à 100 % selon le marqueur utilisé (224).

Ce test biologique nous a permis de calculer que 10^6 macrophages normaux de souris secrètent l'équivalent de $4 \cdot 10^{-6}$ M de TdR par ml en 72 heures (voir chapitre 5). Une telle quantité de TdR peut

être relarguée par le macrophage car il ne peut l'utiliser. Il lui manque les enzymes de thymidine kinase qui phosphorylent les bases pyrimidiques avant leur entrée dans le DNA (210). En outre, du fait que la cellule ne synthétise plus le TTP qui est la molécule responsable de la rétroinhibition de la ribonucléotide réductase(154) et donc de la synthèse de thymidine, cette synthèse n'est donc plus régulée. Le pool endogène du macrophage devient énorme et le trop plein est relargué dans le milieu.

Ce travail démontre donc bien que ce relargage de TdR est dû à une synthèse De Novo, non régulée comme le montre la métabolisation de l' $6\text{-}^{14}\text{C}$ acide orotique. L'hypothèse(179) selon laquelle la TdR est produite par le macrophage suite à la phagocytose et à la dégradation de l'ADN de cellules lymphoïdes mortes ne tient pas.

Plusieurs lignées cellulaires de macrophages transformés présentent tout comme des lignées de cellules tumorales une forte activité en thymidine kinase, ne relarguent pas de TdR et n'inhibent pas la croissance d'autres cellules. La déficience en thymidine kinase du macrophage et la production subséquente de thymidine est une propriété unique de cette cellule. L'étude de la réversibilité du processus en jouant sur les propriétés du gène de la thymidine kinase serait très intéressante.(134).

Les cellules de mélanome humain et en particulier le HM6A sont sensibles à l'effet de la TdR. D'autres cellules le sont aussi (210). Le seuil de l'effet cytostatique sur le nombre cellulaire équivaut à une concentration de 4.10^{-5} M de TdR. Cependant, cette concentration est rarement atteinte dans nos conditions de culture de macrophages. Les mélanomes in vivo sont constamment infiltrés par les macrophages (39,137). Le microenvironnement cellulaire autour des macrophages dans la tumeur pourrait contenir des concentrations critiques en TdR, contribuant de la sorte à la modulation de la croissance tumorale. Cet aspect encore plus complexe de l'interaction entre deux cellules, le mélanocyte malin et le macrophage, est en cours d'investigation.

VII

ETUDE DE L'EFFET DU SERUM ANTIMACROPHAGE
SUR DIVERSES FONCTIONS DU MACROPHAGE

7.1 INTRODUCTION

L'activation non spécifique des macrophages péritonéaux de souris in vivo par divers immunostimulants résulte en un accroissement de leur cytotoxicité in vitro. (9,80,119,121,155,162,178) Cette propriété s'accompagne de changements morphologiques et biochimiques tels que l'augmentation de l'étalement de la cellule et l'activation de l'enzyme lysosomal, la phosphatase acide (171,188, 231). Le β 1-3 glucan, un polysaccharide extrait du Zymosan stimule les macrophages péritonéaux. (36,146)

La réponse à cet immunostimulant est transitoire (146), suggérant une activation réversible ou l'apparition d'une population à temps de vie plus court.

Dans le but de savoir si les macrophages activés par le glucan font partie de la même classe que les macrophages non cytotoxiques, nous avons étudié l'effet du serum antimacrophage allogénique sur le processus d'activation in vivo. Divers auteurs ont étudié l'effet du serum antimacrophage sur l'immunosuppression. Le serum antimacrophage diminue l'adhérence des phagocytes (109,216), la phagocytose (4, 75,150) et déprime les réponses immunes primaires et secondaires (44,46,180).

Ce chapitre met en évidence l'effet du serum antimacrophage sur les fonctions des macrophages péritonéaux de souris activés par le glucan in vivo.

7.2 MATERIEL ET METHODES

7.2.1 Les animaux.

Les souris C57bl, BDF₁ et Balb/c (Charles River Inc. obtenues par le NCI Liaison Office, Institut Jules Bordet), les rats BD IX (obtenus au Proefdierencentrum K.U.L.), les lapins de la race "Fauve de Bourgogne" (Proefdierencentrum K.U.L. Leuven) ont été utilisés pour produire le serum antimacrophage.

7.2.2 La culture de macrophages.

Le procédé d'obtention et de culture de macrophages a été décrit au chapitre 5.

En bref, les exudats péritonéaux sont incubés en milieu Eagle's sans serum. Après 2 heures, les cultures sont lavées trois fois afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les macrophages utilisés pour l'immunisation des lapins sont récoltés avec un grattoir en caoutchouc tel un piston de seringue de 2 ml (Gillette).

7.2.3 Préparation du serum antimacrophage.

Les macrophages de souris sont prélevés dans les péritoines, 3 jours après l'injection intrapéritonéale (i.p.) de 1 mg de glucan (146).

Les macrophages isolés par adhérence sont ensuite récupérés et injectés une première fois dans le coussinet de la patte du lapin avec de l'adjuvant de Freund et 3 semaines plus tard en intraveineuse selon la méthode de Liacopoulos-Briot et al (150). $5 \cdot 10^6$ à 10^7 macrophages par ml dans PBS sont injectés chaque fois. Les lapins sont saignés 7 à 15 jours après la dernière injection. Les sera sont

chauffés et décomplémentés à 56° C pendant 30 minutes et conservés à -20° C.

7.2.4 Epuisement du serum.

Avant l'usage, les sera sont successivement adsorbés sur des erythrocytes autologues, des cellules non adhérentes de la rate et des cellules thymiques, préalablement isolées et purifiées. Les erythrocytes sont obtenus du sang périphérique et amenés à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml. Les cellules de la rate sont obtenues en hachant la rate au scalpel et en dissociant les globules blancs de la pulpe rouge par agitation mécanique. Les lymphocytes sont ensuite séparés par centrifugation sur un coussin de Ficoll-Hypaque (Nyegaard, Norvège) à 400 g. Les cellules adhérentes sont éliminées sur le plastique des boîtes de culture. Les cellules thymiques sont isolées en hachant les thymus au scalpel. Les suspensions cellulaires sont amenées à des concentrations finales de 10^6 cellules par ml.

7.2.5 Titration du serum par le test au chrome.

Le titrage est effectué par un test de cytolysse au ^{51}Cr relargué par les cellules cibles en présence de l'anticorps et du complément (27). Des triplicats de 10^5 macrophages et de 10^6 autres cellules témoins sont ensemencés en micropuits Linbro (Nunc). Ces cellules sont marquées par une solution de 6 $\mu\text{Ci/ml}$ de monochromate de sodium (^{51}Cr) pendant 1 heure à 37° C dans du milieu RPMI 1640, avec 15 % de FBS inactivé à 56° C.

Dans le cas des exudats péritonéaux, les cellules non adhérentes sont éliminées après le marquage in situ. Les triplicats de micropuits sont additionnés de 0,1 ml de serum à tester dilué en série 5 fois et 0,1 ml de complément de cobaye dilué 2 fois dans du RPMI avec 10 % de FBS inactivé. Après 1 heure d'incubation à 37° C dans une atmosphère humide à 100 % avec 1 % de CO_2 , 100 μl des surnageants sont pipetés et comptés dans un compteur γ . La lyse maximale est obtenue par une lyse au NaOH 0,1 N. Les résultats seront exprimés en valeur absolue en CPM de ^{51}Cr relargués par les cellules cibles.

Le calcul de la lyse spécifique se fait par la formule :

$$\frac{\text{CPM serum immun} - \text{CPM serum normal}}{\text{CPM lyse maximale} - \text{CPM serum normal}}$$

Le titre du serum est exprimé par la valeur inversement proportionnelle à celle donnant 50 % de lyse (150).

7.2.6 Recherche de la spécificité.

Afin de mettre en évidence la spécificité antimacrophage de notre serum, nous avons comparé la cytotoxicité qu'il exerce sur différentes cellules cibles.

Nous avons choisi, outre la cible spécifique, le macrophage, les cellules du thymus et des cellules non adhérentes de la rate autologues, ainsi que des cellules hétérologues K15, un carcinome colique du rat afin de comparer les spécificités d'action du serum.

7.2.7 Action du serum sur l'étalement, la phosphatase acide, et la cytotoxicité du macrophage.

7.2.7.1 Mesure de l'étalement du macrophage.

Lorsqu'il est activé, le macrophage s'étale sur son support (en l'occurrence le fond de la boîte en plastique) (Nunc) en déployant une membrane ondulante. Nous comptons le nombre de cellules possédant cette caractéristique par rapport au nombre total de cellules de l'exudat péritonéal.

7.2.7.2 La phosphatase acide.

La méthode utilisée est celle de Barka et Anderson (8) modifiée par Lejeune et al (136). Après adhérence des cellules dans les boîtes de Petri, les cellules sont lavées 3 fois avec PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. Les phagocytes sont ensuite fixés avec une solution à 1 % de formaldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M avec 0,2 % de CaCl₂ pendant 30 minutes à 4° C. Le Naphtol AS-BI phosphate est utilisé comme substrat (8). Après l'incubation

des cellules en présence du substrat, on compte les cellules phosphatase acide positive. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules positives par rapport aux cellules totales.

7.2.7.3 La cytotoxicité du macrophage.

Des cellules de HM6A préincubées avec du ^{51}Cr sont distribuées dans les micropuits Linbro sur des monocouches de macrophages. Le rapport des cellules effectrices/cellules cibles est de 5:1. Après 6 heures de culture mixte, un échantillon de 200 μl de surnageant est prélevé et compté au compteur γ .

7.2.7.4 Protocole de traitement des péritoines de souris par le serum antimacrophage.

Des groupes de 9 souris BDF1 de 3 à 4 mois, reçoivent 3 injections i.p. de 0,3 ml de serum antimacrophage adsorbé, aux jours -3, -2, -1 avant une injection de 1 mg de β 1-3 glucan. Les groupes contrôles sont injectés avec du serum de lapin normal. Des groupes de 3 souris sont tuées aux jours 0, 3 et 6 post injection de glucan et les cellules de l'exudat péritonéal analysées à l'aide des paramètres d'étalement, d'activation enzymatique et de cytotoxicité anti tumorales.

7.3 RESULTATS

7.3.1 Titre du serum.

Les immuns sera adsorbés et les sera normaux ont été testés vis-à-vis des macrophages péritonéaux de souris et des cellules K15 à des dilutions de 1/5, 1/25 et 1/125 en présence et absence de complément de cobaye.

Les figures 7-1a et 7-1b montrent l'action du serum adsorbé avec complément qui possède un effet antimacrophage très spécifique. Le titre du serum, compte tenu de la cytotoxicité 50 %, est de l'ordre de 25. La même expérience faite avec des cellules K15 n'a pas montré de cytotoxicité significative. Le titre maximum que nous ayons obtenu pour le serum antimacrophage fut de 25.

7.3.2 Spécificité du serum.

La spécificité du serum a été vérifiée après adsorption, vis-à-vis d'autres cibles que les macrophages péritonéaux soit les lymphocytes spléniques non adhérents, les cellules thymiques non adhérentes et les cellules K15. Le serum était dilué au 1/5.

La figure 7-2 nous montre, outre la lyse maximale, l'effet sur les cellules cibles des sera antimacrophages adsorbés, non adsorbés et normaux. Seuls les macrophages subissent un effet hautement spécifique du serum.

La table 7-1 nous montre les valeurs de lyse spécifique.

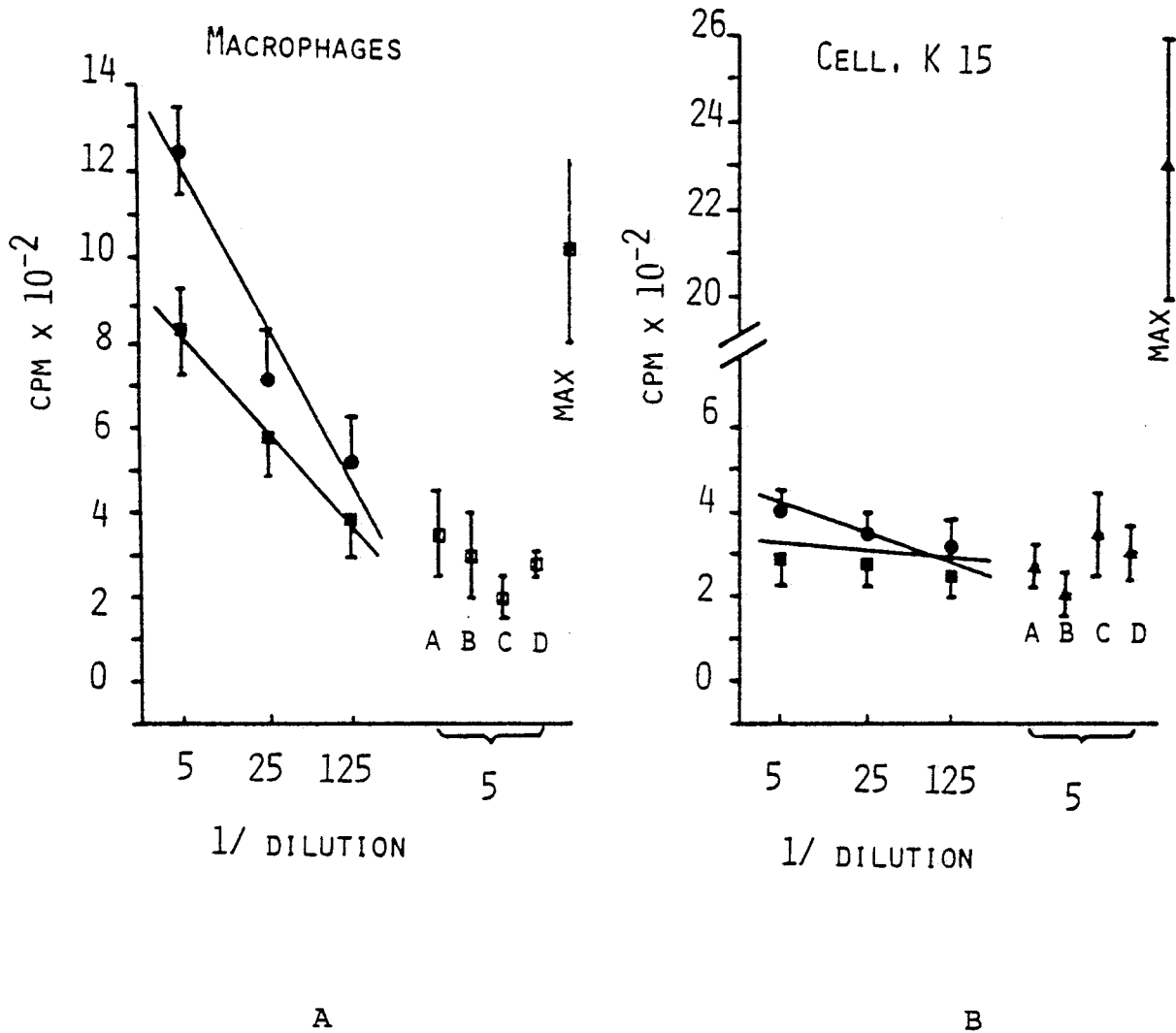


Fig. 7-1

Titre et spécificité du serum antimacrophage.

10^5 macrophages ou 10^5 cellules K15 sont marqués au ^{51}Cr et incubés ensuite en présence des divers sera pendant 3 heures. Le relargage du ^{51}Cr est exprimé ici en valeur absolue CPM.

● — Serum antimacrophage non adsorbé + complément.

■ — Serum antimacrophage adsorbé + complément.

Controles: a) Serum normal adsorbé + complément.

b) Serum antimacrophage non adsorbé sans complément.

c) Serum antimacrophage adsorbé sans complément.

d) Complément de cobaye.



Spécificité du serum antimacrophage de rats (serum de lapin) exprimé en % de lyse spécifique. Le titre est exprimé en fonction de la dilution du serum provoquant un relargage de 50 % chez la cellule cible.

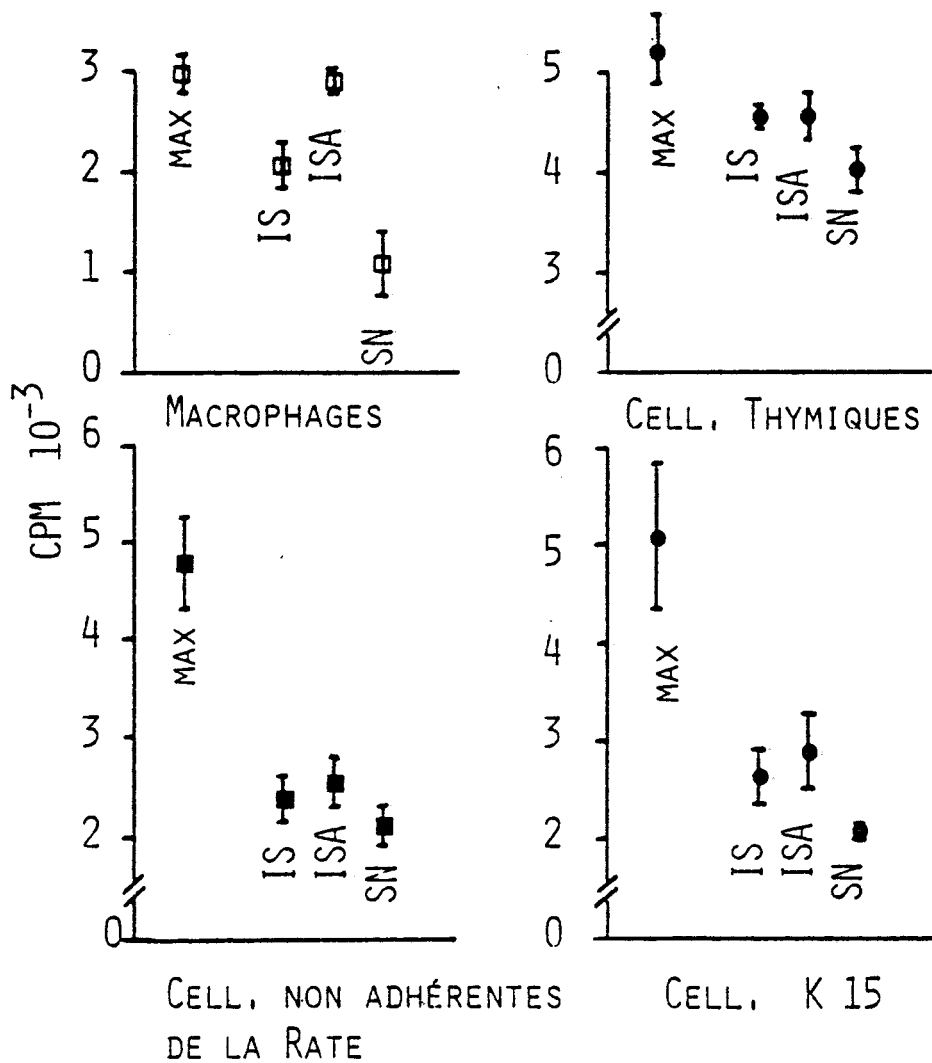


Fig. 7-2

Spécificité du serum antimacrophage de rats BD IX.

10^5 macrophages péritonéaux, 10^6 lymphocytes non adhérents de la rate, 10^6 cellules thymiques, 10^5 cellules K15 sont utilisés comme cibles pour ce test au ^{51}Cr et incubés avec 3 sera à la dilution 1/5 avec du complément de cobaye. Incubation 3 heures. Relargage du ^{51}Cr exprimé en CPM.

IS = Immun serum.

ISA = Immun serum adsorbé.

SN = Serum normal de lapin.



ANTISERUM	ADSORBE	NON ADSORBE
ANTIMACROPHAGE DE RAT		
BATCH 1	25	25
ANTIMACROPHAGE DE SOURIS		
BATCH 1	11	21
BATCH 2	6	
BATCH 3°	18	

° Don du Dr LIACOPOULOS - Paris

Table 7-1

Titres des sera antimacrophages de lapin



7.3.3 Effet sur l'étalement, la phosphatase acide et la cytotoxicité du macrophage.

7.3.3.1 La phosphatase acide.

3 jours après l'administration de glucan, les macrophages des animaux témoins montrent une augmentation de 4 fois celle des cellules non traitées. Ces effets sont déjà réversibles au jour 6. Lorsque l'on traite les souris par le serum antimacrophage avant l'activation par le β 1-3 glucan, on n'observe pas de pic d'activité de phosphatase acide (Fig. 7-3).

7.3.3.2 L'étalement des macrophages.

Dans le groupe traité par le β 1-3 glucan et le serum normal, l'étalement est amplifié pour atteindre un maximum au jour 6. Dans le groupe traité par le glucan et le serum antimacrophage, l'augmentation de l'étalement ne se fait que jusqu'au jour 3 pour revenir au niveau de base au jour 6 (Fig. 7-4).

7.3.3.3 La cytotoxicité du macrophage.

L'injection de 1 mg de β 1-3 glucan augmente la cytotoxicité antitumorale des macrophages (table 2). La cytotoxicité au jour 3 est diminuée de manière significative lorsque les souris ont été préalablement traitées par l'antiserum antimacrophage. Au jour 6, les niveaux de cytotoxicité ne sont pas significativement différents du témoin.

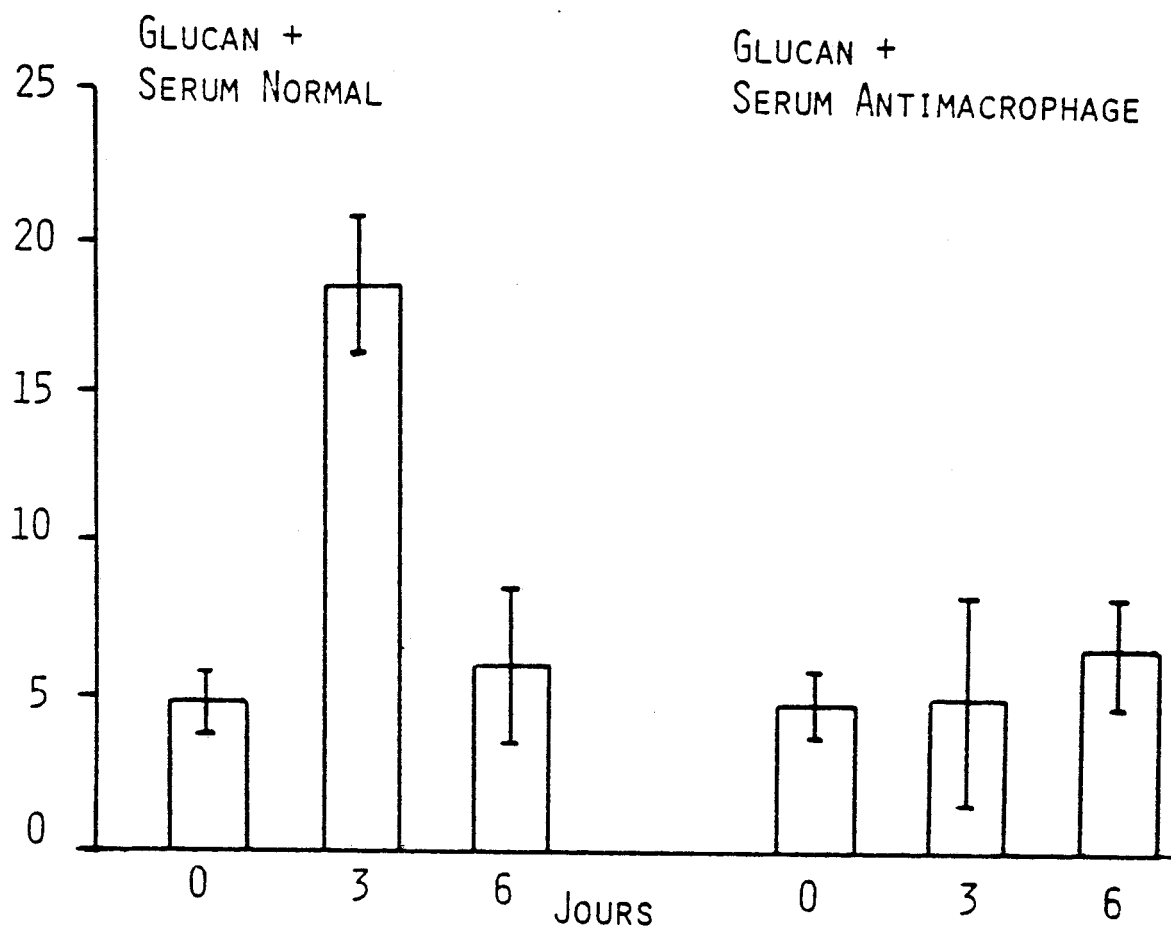


Fig. 7-3

Effet du serum antimacrophage in vivo sur la réponse de l'acide phosphatase dans les macrophages péritonéaux de souris activés par le β 1-3 glucan. Effet en jours 0, 3 et 6 post injection de β 1-3 glucan.

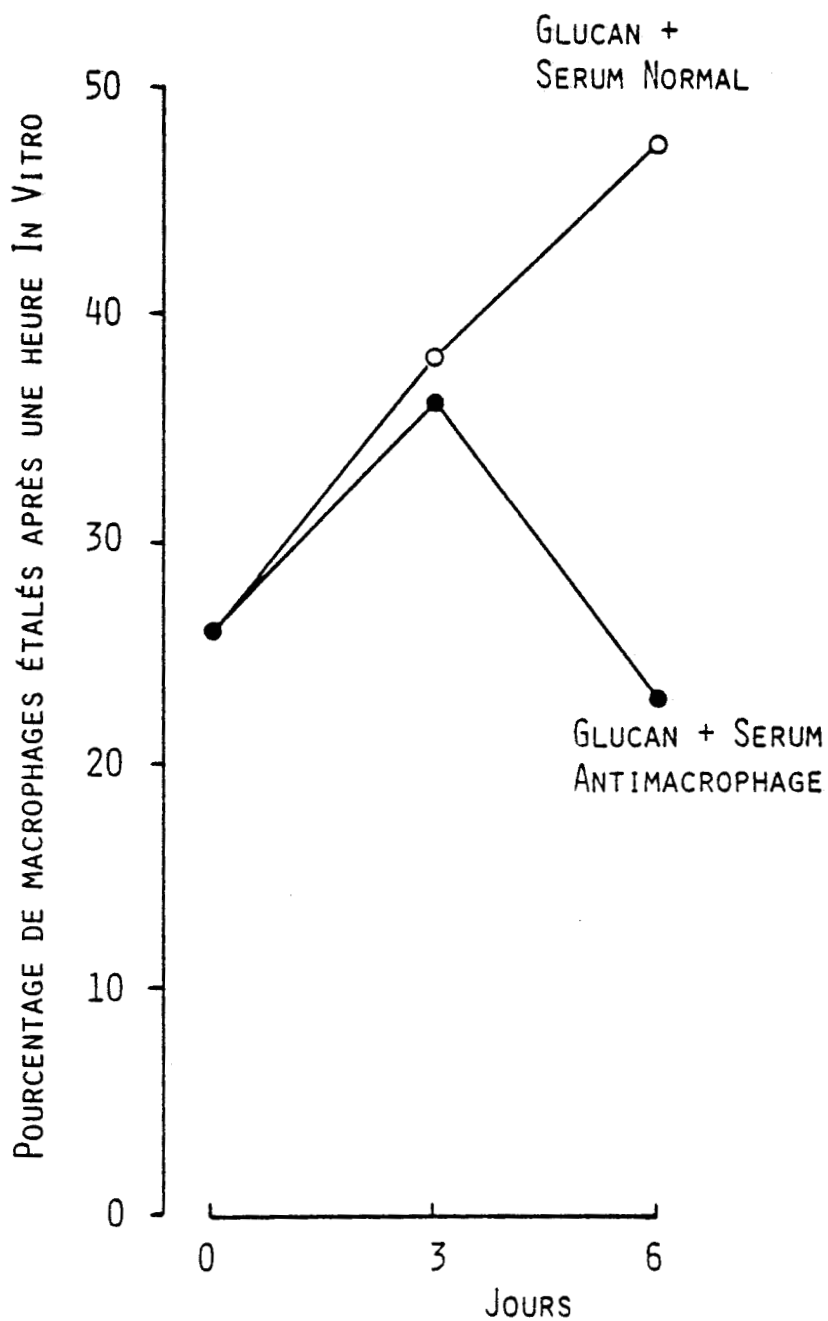


Fig. 7-4

Effet du serum antimacrophage in vivo sur l'étalement des macrophages de souris activés par le β 1-3 glucan. Adhérence des cellules pendant 1 heure.



MACROPHAGES	CPM \pm SE	% RELARGAGE	T TEST
CONTROLE	4988 \pm 117	61] P < 0,05
ACTIVE PAR GLUCAN			
Jour 3 Serum normal	6195 \pm 185	76	
Jour 3 Serum antimacrophage	5641 \pm 133	69	
Jour 6 Serum normal	5058 \pm 292	62	
Jour 6 Serum antimacrophage	4837 \pm 60	59] P < 0,4
RELARGAGE SPONTANE	2832 \pm 181	35	
RELARGAGE MAXIMAL	8176 \pm 100	100	

Table 7-2

Inhibition de la cytotoxicité des macrophages de souris activés par le serum antimacrophage. Test au relargage du chrome ^{51}Cr .



7.4 DISCUSSION

Les fonctions des macrophages normaux et non stimulés peuvent être modifiés ou inhibés par un serum antimacrophage in vitro (44, 46,75,109,150,180). Nous avons voulu, dans cette partie du travail, étudier un éventuel effet in vivo, en particulier sur le processus d'activation par un immunoadjuvant.

Le serum antimacrophage de souris doit être adsorbé successivement sur des cellules autologues telles les erythrocytes (150), les lymphocytes de la rate et du thymus afin d'éliminer la réactivité croisée résultant de la présence sur les macrophages d'antigènes communs et notamment le H₂, complexe antigénique majeur d'histocompatibilité. Le β 1-3 glucan stimule non spécifiquement les macrophages péritonéaux in vivo (36,146). Cette activation fut mesurée par l'augmentation de la phosphatase acide, un enzyme lysosomal riche dans le macrophage, par l'étalement des cellules sur un support solide tel le plastique, et la cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles tumorales. Le β 1-3 glucan a un effet rapide réversible sur le système réticulo-endothélial (146). Par rapport aux autres immunoadjuvants, il a été trouvé plus intéressant d'utiliser le β 1-3 glucan pour étudier l'effet du serum antimacrophage qui a lui même un effet limité dans le temps (150).

Le serum antimacrophage a un effet inhibiteur significatif sur les trois paramètres d'activation du macrophage étudié. Le serum antimacrophage ne provoque aucune dépression en-dessous de la ligne de base. Il est toujours délicat d'interpréter des résultats in vivo, le nombre de paramètres étant tellement élevé. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que le serum antimacrophage n'affecte pas toutes les populations de macrophages tels les résidents et les recrutés, de manière identique, mais inhibe cependant de manière globale le processus de stimulation par un immunoadjuvant tel le β 1-3 glucan. Il apparaît en outre que ces populations stimulées soient le plus

affectées. Dans le processus d'activation, l'augmentation du taux d'enzymes lysosomiaux et d'étalement précède l'augmentation de la cytotoxicité (35). Ce processus est dépendant des lymphokines. Il n'est pas étonnant de constater que le serum antimacrophage a un effet moins important sur le processus de cytotoxicité qui implique plusieurs populations cellulaires. Le serum antimacrophage peut être utile pour mettre en évidence des sous-populations cellulaires de macrophages péritonéaux et d'éclaircir les processus d'activation du système des phagocytes mononucléés.

VIII

CONCLUSIONS GENERALES

Le macrophage est une cellule du système immunitaire, dont l'importance est essentielle. Les rôles qu'elle remplit sont nombreux en temps et en lieu. Cette cellule ubiquitaire remplit des fonctions diverses selon les situations qu'elle rencontre. Ses deux fonctions les plus connues sont l'endocytose (phagocytose et pinocytose) et la présentation de l'antigène(7,220). Le macrophage s'est en outre vu attribuer au cours de ces dernières années des rôles ou fonctions qui ne lui sont pas entièrement propres dans la mesure où il les partage avec les lymphocytes.(195).

Certains auteurs ont décrit l'action de macrophages "helper"(103 (165) et "suppressor" (198) dans l'arc afférent de la réaction immunitaire. Mais c'est dans le domaine de la cytotoxicité à médiation cellulaire (qui comprend l'arc efférent de la réponse immunitaire) que beaucoup de données ont été enregistrées. Certains auteurs n'ont pas hésité à décrire le macrophage comme étant la super cellule tueuse de tout ce qui pouvait menacer l'hôte depuis l'infection microbienne jusqu'à la cellule cancéreuse en passant par les parasites. D'autres auteurs ont peut-être par réaction à cette attitude outrancière pris le parti de n'accorder à cette cellule que le titre de phagocyte éboueur réservant les tâches plus nobles aux seuls lymphocytes et leurs sous populations douées parfois de phagocytose. Les recherches ont cependant continué en stipulant les procédés de purification et de sélection des cellules étudiées. Le modèle le moins controversé quant à la nature et à l'homogénéité fonctionnelle des cellules ainsi que le plus stable est celui des macrophages péritonéaux de souris. (11,12,15,25,27,39,105,107,108)

Divers auteurs ont utilisé ce modèle pour étudier les paramètres fonctionnels et cytotoxiques des macrophages. De nombreux résultats ont été obtenus montrant que le macrophage peut être une cellule effectrice aux capacités multiples selon son état d'activation et le système de cellules cibles utilisé. (16,19,48,52,69,70,153,177,181)

Comme nous l'avons dit précédemment, il faut bien entendu distinguer les deux concepts entrant dans le phénomène de cytotoxicité, soit la cytolyse et la cytostase ainsi que la nature de l'effecteur qui peut être actif par contact cellulaire ou à distance (224) lorsqu'il est sécrété par la cellule. De plus, son activité peut être immédiate ou différée suivant sa concentration et son mode d'action. Il peut en outre être immunologiquement spécifique ou non (45,56,58).

Dans le but d'analyser les divers pouvoirs effecteurs rattachés aux macrophages, il était nécessaire de posséder un système de mesure rapide, efficace et reproductible. La première partie de ce travail a été consacrée à ce but. Nous avons tout d'abord réussi à miniaturiser et à standardiser un système de culture de cellules cibles dont nous pouvions mesurer divers paramètres de réponses à des effecteurs cytolytiques ou cytostatiques. Pour la cytolyse, nous avons utilisé le test au relargage de chrome, et pour la cytostase le test de l'inhibition de l'incorporation de précurseurs métaboliques tels 1^3HTdR , 1^{125}UdR , le 1^4C glucose, etc... (94,124,147,224)

Après avoir maîtrisé ce système de référence, nous avons réussi à le moduler pour qu'il nous donne avec le minimum d'artefacts les réponses aux questions concernant les effecteurs macrophagiques. L'utilisation du "phénomène 5FU" nous fut très utile pour mettre en évidence le seuil existant entre la diminution d'activité spécifique et l'effet biologique de la thymidine sur la cellule cible (134,154,224).

Les systèmes de mesure des paramètres des métabolismes cellulaires soumis à divers effecteurs peuvent déjà être utilisés dans le but d'élucider leurs modes d'action et éventuellement de découvrir par "screening" préliminaire de nouveaux cytotoxiques utiles dans la lutte contre le cancer. Les microméthodes sont complémentaires dans cette sélection en "screening" animal ainsi qu'en "stem cell assay" ou test de formation de colonies en agar semi-solide à partir de tumeurs primitives ou de métastases humaines (93,196).

Les expériences des chapitres 4 et 5 démontrent que les macrophages sont des cellules capables de cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales in vitro. Leurs pouvoirs cytolytiques proprement dits sont cependant limités sauf à des concentrations en cellules effectrices très importantes ; cela ne représente plus dans ce cas une

situatic

physiologique normale. Par contre, le macrophage exerce une action cytostatique plus discrète mais peut-être plus digne d'intérêt à terme. Nous avons pu mettre en évidence un des effecteurs les plus représentatifs sécrétés par le macrophage, la thymidine. Nous avons étudié de manière concomittante le phénomène de perte de régulation de synthèse de la thymidine par le macrophage dû à la répression de son activité de thymidine kinase et de la disparition de la rétro-inhibition de la déoxy-ribonucléotide réductase par la thymidine triphosphate non produite, aboutissant à la production et sécrétion de thymidine en quantité très importante par le macrophage (202,209,210)

Il existe certainement d'autres facteurs sécrétés par les macrophages susceptibles de moduler les croissances de cellules (145). Leur mise en évidence est toujours difficile et délicate. L'utilisation couplée des diverses méthodes tels les tests biologiques, les procédés de séparation et d'identification classiques de la biochimie, l'utilisation de procédés plus performants telles la "high pressure liquid chromatography", l'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse permettront une approche de plus en plus précise de ces "facteurs" cellulaires complexes et rares (172).

L'avènement de la production d'immunoglobulines mono spécifiques produites par les hybridomes permettra une sélection encore plus fine de ces facteurs.

Le chapitre 7 nous ramène au problème de la détermination des populations cellulaires que nous traitons. Nous avons cru bon de l'inclure afin d'illustrer la nécessité de posséder un outil susceptible d'identifier à tout moment les cellules avec lesquelles on travaille. Le serum antimacrophage produit selon une méthode classique (150) est très spécifique. Dans ce domaine aussi, le concept et la méthode de production d'anticorps monoclonaux développés par Köhler(1 et Milstein permettront d'obtenir des anticorps monospécifiques encore plus purs pour toute une série d'antigènes cellulaires et autres. Dans la même ligne de pensée, ces derniers mois des anticorps monoclonaux spécifiques du mélanome ont été produits par une équipe du Ludwig Institute de Lausanne (26).

Le macrophage est une cellule qui envahit les tumeurs solides, et en particulier le mélanome (143) qui est une tumeur reconnue pour son caractère immunogénique plus important que d'autres tumeurs. Malgré les faibles résultats obtenus ces dernières années en matière d'immunothérapie, dus principalement à une précipitation et à un manque de maîtrise des données du problème, on peut espérer un progrès dans la compréhension des mécanismes d'interaction intime des cellules et dans l'utilisation de certaines de ces propriétés dans un but thérapeutique et préventif.

IX

ABREVIATIONS

A.A.	Acide aminé.
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity.
ADN ou DNA	Acide désoxyribonucléique.
ARN ou RNA	Acide ribonucléique.
ATP	Adenosine triphosphate.
BCG	Bacille Calmette-Guérin.
BCNU	Bis chloroethylnitrosourée.
B16	C57b1 mouse melanoma.
C'	Complément.
Cell(s)	Cellule(s).
Con-A	Concanavaline A.
Conc.	Concentration.
C.P.	Corynebacterium Parvum.
CPM	Coup par minute.
DR	Antigène d'histocompatibilité de classe II chez l'homme. Equivalent au Ia de la souris.
EA	Erythrocytes avec anticorps.
EAC	Erythrocytes avec anticorps et complément.
EDTA	Acide éthylène dinitro tétra acétique.
eff.	Effecteur.
FBS	Foetal bovine serum.
Fc	Récepteur du complément.
FCS	Foetal calf serum.
5-FU	5-Fluoro uracile.
g	Unité de gravitation terrestre.
H-2	Antigène majeur d'histocompatibilité de la souris.
HLA	Antigène ou déterminant majeur d'histocompatibilité de l'homme.
HM	Human melanoma.
HSR	Hypersensibilité retardée.
³ HTdR	Désoxythymidine tritiée.

HUR	Hydroxyurée.
Ia	Antigène d'histocompatibilité de classe II chez la souris. Equivalent au DR de l'homme.
Ig	Immunoglobuline.
IL	Interleukine.
IS	Immun serum.
ISA	Immun serum adsorbé.
¹²⁵ IUdR	Iodo-désoxyuridine.
K	Killer cells.
λ	μl.
MAF	Macrophage activation factor (Voir tableau 3-4).
M.C.	Milieu conditioné.
MDP	Muramyl dipeptides.
2-ME	2 Mercaptoethanol.
MEL	Mélanome.
MEM	Minimum essential medium.
MIF	Migration inhibitory factor.
MØ	Macrophage.
mOsm	Milli osmole (unité de pression osmotique).
N	Normal ou normaux.
NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide.
NK	Natural killer cells.
PBS	Phosphate buffered saline.
PHA	Phytohemaglutinine.
R	Résident.
SMAF	Specific macrophage arming factor.
SN	Serum normal.
SV40	Simian virus 40.
TCA	Acide trichloroacétique.
TdR	Désoxythymidine.
TK	Thymidine kinase.
TMP	Thymidine monophosphate.
TTP	Thymidine triphosphate.
UdR	Désoxyuridine.

X

BIBLIOGRAPHIE

1. ADOLPHE M., FONTAGNE J., PELLETIER M., GIROUD J.P. : Induction of DNA synthesis in rat macrophage in vitro by inflammatory exudate. *Nature* 1975, 253, 637.
2. ALEXANDER P. and EVANS R. : Endotoxin and double stranded RNA render macrophages cytotoxic. *Nature New Biol.* 1971, 232, 76.
3. ALEXANDER P. : The role of macrophages in tumour immunity. *J. Clin. Path.* 1974, 27, suppl. (Roy Coll. Path.), 7, 77.
4. ARGYRIS B.F. and PLOTKIN D.H. : Effect of antimacrophage serum on antibody production and phagocytosis in mice. *J. Immunol.* 1969, 103, 372.
5. ARGYRIS B.F. : Effect of passive antiserum on antigen phagocytosis and degradation by mouse peritoneal macrophages.
- 5! ARNOULD R. : Optimisation de l'emploi in vitro de précurseurs métaboliques radioactifs, dans les macrophages. et Aspects de la synthèse de l'ADN dans les macrophages normaux et transformés, in vitro. Mémoires de fin d'études présentés en vue de l'obtention des diplômes d'Ingénieur Technicien et Industriel, 1979 et 1980. Directeurs : C. Peeters, F.J. Lejeune et A.F. Verammen-Grandjean.
6. AXLINE S.C. and COHN Z.A. : "In vitro" induction of lysosomal enzymes by phagocytosis. *J. Exp. Med.* 1970, 131, 1239.
7. BACH J.F. : *Immunologie*, Flammarion Médecine-Sciences, 1979.
8. BARKA T. and ANDERSON P.J. : Histochemical methods for acid phosphatase using Hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 1962, 10, 741.
9. BASIC I., MILAS L., GRDINA D.J. and WITHERS H.R. : Destruction of hamster ovarian cell cultures by peritoneal macrophages from mice treated with corynebacterium granulosum. *J. Nat. Cancer Inst.* 1974, 52, 1839.
10. BENNETT B., OLD L.J. and BOYSE E.A. : Opsonization of cells by isoantibody in vitro. *Nature* 1963, 198, 10.
11. BENNETT B. : Isolation and cultivation in vitro of macrophage from various sources in the mouse. *J. Nat. Cancer Inst.* 1965, 48 (1), 165.

12. BENNETT B.-OLD L.J. & BOYSE E.A.: Peritoneal macrophages as immunologically active cells in tissue rejection. *Transplantation* ,1964, 2 , 183
13. BERKEN A. & BENACERRAF B. : Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* 1966,123 , 119
14. BIRKS J.B. : The theory and practice of scintillation counting Pergamon Press, 1964
15. BLANDEN R.V. : Modification of macrophage function . *J. Reticuloendoth. Soc.*, 1968,5, 179
16. BOMFORD R. & MORENO C. : A comparison of the antitumour activities of glucans and *c. parvum*. *Develop. Biol. Standard*, by S. Karger , Basel. 1978,38 , 291-295
17. BORDET J. : *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*. Masson et Cie Ed. (Paris) , 1939
18. BORDET P. : *Traité d'Immunologie (Collection médico-chirurgicale à révision périodique)* Flammarion - Paris , 1972
19. BOYLE M.D. & ORMEROD M.G. : The destruction of tumour cells by alloimmune peritoneal cells: mechanism of action of activated macrophages in vitro. *J. Reticulo-endoth. Soc.* 1975,17,73
20. BRAUNSTEINER M. & SCHMALZL F. : Cytochemistry of monocytes and macrophages. In *Mononuclear phagocytes* (Van Furth, ed)1970,6
21. BRAY G.A. : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1960, 1, 279
22. BRUNNER K.T., MAUEL J., CEROTTINI J.C. and CHAPUIS B. : Quantitative assay of the lytic action of lymphoid cells on ⁵¹Cr labelled allogenic target , cells in vitro. *Immunology*, 1967a, 14, 181.
23. BURNET M. : *Cellular Immunology*. Melbourne and Cambridge, Univ. Press,1971, 286.
24. CALDERON J., WILLIAMS R.T. & UNANUE E.R. : An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71 , 4273

25. CAPRON A., DESSAINT J.P., JOSEPH M., ROUSSEAU R., CAPRON M., and BAZIN H.: Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat: a new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* , 1977,7, 315-322
26. CARRELL S., ACCOLLA R.S., CARMAGNOLA A.L., MACH J.P.: Common human melanoma associated antigens detected by monoclonal antibodies. *Cancer Research* 1980, 40, 2523
27. CEROTTINI J.C., & BRUNNER K.T.: Cel- mediated cytotoxycity, allograft rejection and tumour immunity. *dv. Immunol.*1974,18,67
28. CHERVENIK P. & LOBUGLIO A.F. : Human blood monocytes : Stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro. *Science* 1972, 278, 164
- 29; CHEUNG H.T. , CANTAROW W.D., SUNDHARADAS G. : Colchicine and cytochalasin B effects of random movement, spreading and adhesion of mouse MØ. *Exp. Cell res.*, 1978; 111, 95
30. COHN Z.A. & WIENER E. : The particulate hydrolases of macrophage II. Biochemical and morphological response to particle ingestion. *J. Exp. Med.*, 1963, 118, 1009.
31. COHN Z.A., & BENSON B.: The differentiation of mononuclear phagocytes. I. Morphology, Cytochemistry, and Biochemistry. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 153.
32. COHN Z.A., FEDORKO M. & HIRSCH J.M.: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. The formation of macrophage lysosomes. *J. Exp. Med.* ,1966, 123, 757
33. COHN Z.A. : Lysosomes in mononuclear phagocytes. In *Mononuclear phagocytes* (Van Furth,ed). London, Blackwell, 1970,50.
34. COHN Z.A. : Recent studies on the physiology of cultivated macrophages. p.15 in : *The phagocytic cell in host resistance.* Bellanti and Dayton Ed. Raven Press- N.Y. 1975
35. COHN Z.A.: The activation of mononuclear phagocytes: Fact, Fancy and future. *J. Immunol.* 1978, 121, 813

47. DE VRIES J.E., RUMKE Ph., BERHEIM J.L. : Cytotoxicity of lymphocytes in melanoma patients. *Int. J. Cancer* , 1972, 9, 567
48. DI LUZIO N.R., PISANO J.C. & SABA T.M.: Evaluation of the mechanism of glucan-induced stimulation of the reticulo-endothelial system. *J. Reticulo-Endoth. Soc.* 1970, 7, 731
49. DIMITRIU M.D.A., GOUGEROT M.A., HAMBURGER J.: Nature of MØ modifications induced by the MAF: effect of Enzymes and temperature. *J. of the Reticulo-endoth. Soc.* 1976, 20; 93
50. DRIZLIKH G.I., ANDREYEV A.V., KOTOMINA I.P., BRONDZ B.D.: Quantitative estimation of cytotoxic activity of Immune lymphocytes using ⁵¹Cr labelled MØ as target cells. *J. of Immunol. Methods* . 1975, 8, 383.
51. DROCHMANS P. : Melanine granules : Their fine structure, formation and degradation in normal and pathological tissues. *Intern. Rev. exp. Path.* 1963, 2, 357
52. DROLLER M.J. & REMINGTON J.S.: A role for the macrophage in in vivo and in vitro resistance to murine bladder tumor cell growth. *Cancer Res.* 1975, 35, 49
53. DYER A. : An introduction to liquid scintillation counting. Heyden Ed. 1974
54. ECCLES S.A. & ALEXANDER P. : Sequestration of macrophages in growing tumours and its effect on the immunological capacity on the host. *Brit. J. Cancer* , 1974, 30, 42
55. EDELSON P.J., ZWIEBEL R. COHN Z.A. : The pinocytotic rate of activated MØ . *J. of Exp. Med.* 1975, 142, 1150
56. EVANS R. & ALEXANDER P.: Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature (London)* 1970, 228, 620
57. EVANS R. & ALEXANDER P. : Role of macrophages in tumour immunity. I. Cooperation between macrophages and lymphoid cells in syngeneic tumour immunity. *Immunology* 1972, 23, 615.

58. EVANS R. & ALEXANDER P.: Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages. *Nature* , 1972, 236, 168
59. EVANS R. : Specific and non specific activation of MØ.
Activation of MØ Works conf. Hoechst, 1973, 2, 305.
60. EVANS R. : Preparation of pure cultures of tumour macrophages.
J. Nat. Cancer Inst. 1973, 50, 271
61. EVANS R. & BOOTH C.G.: Inhibition of ¹²⁵IUdR incorporation by supernatants from macrophage and lymphocyte cultures: a cautionary note *Cell Immunol* 26: 120-126, 1976
62. EVANS E.A.: Self-Decomposition of radiochemicals . Amersham Publications . Review n°16 , 1976.
63. FAKHIRI O, Mc LAUGHLIN H., HOBBS J.R.: 7S antitumour antibodies and activated Fc in macrophage tumour cell interaction.
Europ J. Cancer , 1973, 9, 19.
64. FAUVE R.M. & HEVIN M.B. : Toxic effects of tumour cells on macrophages. In *The macrophage and cancer* (Jones K. ed).
Edinburgh 1977, 50-59.
65. FEDORKO M.E., HIRSCH J.G. & COHN Z.A. : Autophagic vacuoles produced in vitro I + II . *J. Cell Biol.* 1968, 38, 377-392
66. FELDMAN J.D., TUNBERGEN D.G., POLLOCK C.M., UNANUE E.R.:
Distribution of a macrophage specific antigen. *Cell. Immunol.* 1972, 5, 325.
67. FISHMAN M. : Antibody formation in vitro. *J. Exp. Med.* 1961, 114, 837.
68. FISHMAN M. and ADLER F.L. and HOLUB M.: Antibody formation initiated in vitro with RNA + RNA antigens complexes in Nucleic acids in Immunology. Plescia O.J. + Braunw . Springer Verlag N.Y 1968, 439
69. FORBES I.J., MACKANESS G.B., : Mitosis in MØ. *The Lancet* 1963, 2, 1203.
70. FORBES I.J. : Induction of mitosis in MØ by endotoxin.
The Journal of Immunology , 1965, 94, 37

71. FOSSATI G., COLNAGHI M.I., DELLA PORTA G., CASCINELLI M. and VERONESI V. : Cellular and humoral immunity against human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 1971, 8, 344.
72. FREI P.C., BENACERRAF B. and THORBECKE C.J. : Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the primary response. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1965, 53, 20.
73. FRIEDMAN H.P., STAVITSKY A.B., SOLOMON J.M. : Induction in vitro of antibodies to phage T2 antigens in the RNA extract. *Science* 1965, 149, 1106.
74. GALLILY R. and FELDMAN M. : The role of macrophages in the induction of antibody in X irradiated animals. *Immunology* 1967, 12, 197.
75. GALLILY R. : In vitro and in vivo studies of the properties and effects of antimacrophage sera (AMS). *Clin. Exp. Immunol.* 1971, 9, 381.
76. GALLILY R. : Allogenic recognition and killing capacity of immune macrophages in mixed macrophage cultures (MMC). *Cell. Immunol.* 1975, 15, 419.
77. GEMSA D., KRAMER W., BRENNER M., TILL G. and RESCH K. : Induction of prostaglandin E release from macrophages by colchicine. *Journ. Immunol.* 1980, 124,1, 376.
78. GERY I. and WAKSMAN B.N. : Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens II the cellular source of potentiating mediators. *J. Exp. Med.* 1972, 136, 1943.
79. GESNER B.M. and HOWARD J.G. : The isolation of lymphocytes and macrophages. *Handbook of Exp. Immunol.* 1967, 31, 32, 1009.
80. GHAFFAR A., CULLEN R.T., DUNBAR N. and WOODRUFF M.F.A. : Antitumour effect in vitro of lymphocytes and macrophages from mice treated with *Corynebacterium Parvum*. *Br. J. Cancer* 1974, 29, 199.
81. GIROUD J.P., PELLETIER M. and GIRE C. : Pouvoir mitogène de serum de rats porteurs d'une inflammation aigüe vis-à-vis de macrophages de culture. *C.R. Acad. Sc. Paris* 1977, 285, 1143.
82. GIROUD J.P., FONTAGNE J., BLONDELON D., ADOLPHE M., DUNN C.J., WILLOUGHBY D.A. and LECHAT P. : Stimulation of macrophage DNA synthesis in culture by different type of acute non immunological inflammatory exudates. *Biomedicine* 1979, 27, 19.

83. GORDON S., TODD J. and COHN Z.A. : In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 1974, 139, 1228.
84. GOTTLIEB A.A. : Studies on the binding of soluble antigens to a unique ribonucleoprotein fraction of macrophage cells. Biochem 1969, 8, 2111.
85. GOTTLIEB A.A. and S.R. WALDMAN : Macrophages and cellular immunity. In CRC - Monosciences series (Laskin and Lechevalier, eds) London, 1972.
86. GOTTLIEB A.A. and WALDMAN S.R. : The multiple functions of macrophages in immunity. In Macrophages and cellular immunity (Laskin and Lechevalier, eds). Butterworth, 1972, 13.
87. GOVAERTS A. : Cellular antibodies in kidney homo transplantation J. Immunol. 1960, 85, 516.
88. GOVAERTS A. : Les anticorps de transplantation. Thèse, Ed. Arsche 1964.
89. GRANGER R. and WEISER R. : Homograft target cells : specific destruction in vitro by contact interaction with immune macrophages. Science 1964, 145, 1427.
90. GRANGER G.A. and WEISER R.S. : Homograft target cells : contact destruction in vitro by immune macrophages. Science 1966, 151, 97.
91. GRESSER I., FONTAINE-BROUTY-BOYE D., THOMAS M. and MACIEIRA-COELHO A. : Interferon and cell division. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia L 1210 cells in vitro by interferon preparations. Proc. Nat. Acad. Sci. 1970, 66, 1052.
92. HALPERN B. : Immunotherapy of cancer with Corynebacterium parvum. Annals of Allergy 1978, 40,3, 155.
93. HAMBURGER A.W. and SALMON S.E. : Primary bioassay of human tumour stem cells. Science 1977, 197, 461.
94. HARDER F., DEMARCHI M., TRINCHIERI G. and THIEL G. : Assessment of cellular immunity by ⁵¹Cr release from macrophages as target cells. Transplantation 1974, 17, 551.
95. HARDING N.E. and PASSEY R.D. : Transplantable melanoma of the mouse. J. Pathol. Bacteriol. 1930, 33, 417.

96. HAUGEN J., BASSØE H.H. and FLOOD P.R. : Phagocytosis in rabbits treated with oxyphenbutazone and cortisone studied by gold clearance test and electronic microscopy. *J. Reticulo-endoth. Soc.* 1969, 6, 184.
97. HELLSTROM I., HELLSTROM K.E. and SJOGREN H.O. : Serum factors in tumor free patients cancelling the blocking of cell mediated tumor immunity. *Int. J. Cancer* 1971, 8, 185.
98. HELLSTROM I., SJOGREN H.O., WARNER G. and HELLSTROM K.E. : Blocking of cell mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms. *Int. J. Cancer* 1971, 7, 226.
99. HELLSTROM I., HELLSTROM K.E., SJOGREN H.A., WARNER G.A. : Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer* 1971, 7, 1.
100. HELLSTROM I., HELLSTROM K.E. and WARNER G.A. : Increase of lymphocyte-mediated tumour-cell destruction by certain patients sera. *Int. J. Cancer* 1973, 12, 348.
101. HEPPNER G.H., STOLBACH L., BYRNE M., CUMMINGS F.J., McDONOUGH E. and CALABRESI P. : Cell mediated and serum blocking reactivity to tumor antigens in patients with malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 1973, 11, 245.
102. HERSEY P. and MAC LENNAN I.C.M. : Macrophage dependent protection of tumour cells. *Immunology* 1973, 24, 385.
103. HERSEY P. : Macrophage effector function. *Transplantation* 1973, 15, 3, 282.
104. HIBBS J.B., LAMBERT L.H. and REMINGTON J.S. : Possible role of macrophage-mediated non specific cytotoxicity in tumour resistance. *Nature New Biol.* 1972, 235, 48.
105. HIBBS J.B. : Macrophage non immunologic recognition : target cell factor related to contact inhibition. *Science* 1973, 180, 86
106. HIBBS J.B. : Heterocytolysis by macrophages activated by bacillus Calmette-Guérin : lysosome exocytosis into tumour cells. *Science* 1974, 184, 468.
107. HIBBS J.B. Jr. : Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells in vitro by activated macrophages. *J. Nat. Cancer Inst.* 1974, 53, 1487.

108. HIRT W.E. and BONVENTRE P.F. : Cultural, phagocytic and bactericidal characteristics of peritoneal macrophages. Journ. Reticulo-endoth. Soc. 1973, 13, 27.
109. HIRSCH M.S., GARY G.W. and MURPHY F.A. : In vitro and in vivo properties of antimacrophage sera. J. Immunol. 1969, 102, 656.
110. HIRSCH J.C. and FEDORKO M.E. : Morphology of mouse mononuclear phagocytes. In Mononuclear Phagocytes (Van Furth, ed). Blackwell, 1970, 7.
111. HOESSLI D.C., JONES A.P. and WAKSMAN B.H. : Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens : serum free production and testing of macrophage soluble products. Cell. Immunol. 1977, 30, 310.
112. HOLM G. and PERLMANN P. : Quantitative studies on PHA induced cytotoxicity by human lymphocytes against homologous cells in tissue culture. Immunology 1967, 12, 527.
113. HORVAT M., KALLENBRUNNEN H. and HAVEMANN K. : Optimal labelling conditions for thymidine incorporation in PHA and PP stimulated human lymphocytes. Effect of adherent cells. Int. Arch. Allergy 1974, 46, 647.
114. JACQUEMONT C. and PRUNIERAS M. : Culture de longue durée de cellules issues de l'épiderme de cobaye adulte. II. Essai de caractérisation cytoenzymologique. Path. Biol. 1969, 17, 243.
115. JANSÁ P. and KRATKY J. : Enzyme pattern of macrophages in the course of inflammation. Blut 1969, 18, 218.
116. JONAS W.E., GURNER B.W., NELSON D.S. and COOMBS R.R.A. : Passive sensitization of tissue cells. I. Passive sensitization of macrophages by guinea pig cytophilic antibody. Int. Arch. Allerg. 1965, 28, 86.
117. JOSEPH M., DESSAINT J.P. and CAPRON A. : Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. Cell. Immunol. 1977, 34, 247.
118. JOURNEY L.J. and AMOS D.B. : An electron microscopy study of histiocyte response to ascites tumor homografts. Cancer Res. 1962, 22, 998.
119. JUY D., BONA C. and CHEDID L. : Effet antitumoral de macrophages péritonéaux activés par un adjuvant hydro soluble d'origine mycobactérienne. C.R. Acad. Sci. Paris, série D 1974, 278, 2859.

120. JUY D. and CHEDID L. : Comparison between macrophage activation and enhancement of non specific resistance to tumors by mycobacterial immunoadjuvants. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1975, 72,10, 4105.
121. KAPLAN A.M., MORAHAN P.S. and REGELSON W. : Induction of macrophage mediated tumor-cell cytotoxicity by Pyram copolymer. J. Nat. Cancer Inst. 1974, 52, 1919.
122. KARNOWSKY M.L. and LAZDINS J.K. : Biochemical criteria for activated macrophages. J. Immunol. 1978, 12, 809.
123. KELLER R. and JONES V.E. : Role of activated macrophages and antibody in inhibition and enhancement of tumour growth in rats. Lancet 1971, ii, 847.
124. KELLER R. : Cytostatic elimination of syngeneic rat tumour cells in vitro by non specifically activated macrophages. J. Exp. Med. 1973, 138, 625.
125. KELLER R. : In vitro expression of spontaneous macrophage cytotoxicity is independent of substratum adhesiveness. Exp. Cell Research 1979, 124, 121.
126. KENTARO TOH, NORIYUKI SATO, KOKICHI KIKUCHI : Inhibition of cellular DNA synthesis by rat peritoneal macrophages. Exp. Med. 1977, 123, 371.
127. KLEBANOFF S.J. and HAMON C.B. : Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobiol systems in intact leukocytes. J. Reticulo-endoth. Soc. 1972, 12, 170.
128. KOSUNEN T.V., WAKSMAN B.H., FLAX M.H. and TIHEN W.S. : Radioautographic study of cellular mechanisms in delayed type hypersensitivity. Immunology 1963, 6, 276.
129. KOHLER G. and MILSTEIN C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 256, 495.
130. KRAHENBUL J.L. and REMINGTON J.S. : The role of activated macrophages in specific and non specific cytostasis of tumor cells. J. Immunol. 1974, 113, 507.

131. LANGEVOORT H.L., COHN Z.A., HIRSCH J.G., HUMPHREY J.H., SPECTOR W.G. and VAN FURTH R. : The nomenclature of mononuclear phagocytic cells. Proposal for an new classification. In Mononuclear phagocytes (Van Furth, ed). London, Blackwell, 1970, 1.
132. LEAKE E.S. and MYRVIK Q.N. : Changes in morphology and in lysosome content of free alveolar cells after the intravenous injection of killed BCG in oil. J. Reticulo-endoth. Soc. 1968, 5, 33.
133. LEAKE E.S., GONZALES-OJEDA D. and MYRVIK Q.N. : Enzymatic differences between normal alveolar macrophages and oil-induced peritoneal macrophages obtained from rabbits. Exp. Cell. Res. 1964, 33, 553.
- 133! LEAKE E.S. and WRIGHT. J. Reticulo-endoth. Soc. 1979, 25, 417.
134. LEE S.S., GIOVANELLA B.C., STEHLIN J.S. Jr. and BRUNN J.C. : Regression of human tumors established in nude mice after continuous infusion of thymidine. Canc. Res. 1979, 39, 2928.
135. LEJEUNE F.J. : Etude des macrophages dans le mélanome Harding-Passey. Proc. II^d Int. Colloquium Biology of Malignant Melanoma. Rev. Inst. Pasteur(Lyon) 1971, 4, 349.
136. LEJEUNE F.J. and EVANS R. : Ultrastructural, cytochemical and biochemical changes occurring during syngeneic macrophage-lymphocyte interaction in vitro. Europ. J. Cancer 1972, 8, 549.
137. LEJEUNE F.J. : Harding-Passey melanoma in the Balb/c mouse as a model for studying the interactions between host macrophages and tumour cells. Proc. Conf. Pigment Cell. Biol. Jan. 1973 Yale Univ. Yale J. Biol. Med. 1973, 46, 368.
138. LEJEUNE F.J., BEAUMONT E. and GARCIA J. : Growth inhibitory effect of peritoneal macrophages on Harding-Passey melanoma. Its impairment by macrophage lysosome overloading (Abstract). Brit. J. Cancer 1973, 28, 80.
139. LEJEUNE F.J. and BERNHEIM J.L. : Les macrophages dans le mélanome. Acta Chir. Belg. 1974, 73, 178.
140. LEJEUNE F.J. and REGNIER R. : Studies on a non specific and non cytostatic factor produced by macrophages (Abstract). Brit. J. Cancer 1974, 30, 181.

141. LEJEUNE F.J. and REGNIER R. : Foetal Bovine Serum (FBS) induced cytostatic effect of peritoneal macrophages against mouse melanoma. Behring Inst. Mitt. 1975, 56, 28.
142. LEJEUNE F.J. : Role of macrophages in immunity, with special reference to tumour immunology. A review. Biomedicine 1975, 22, 25.
143. LEJEUNE F.J. : Etude, in vivo et in vitro, du rôle des macrophages dans le mélanome. Thèse d'agrégation de la Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, 1976.
144. LEJEUNE F.J. : Macrophages secretions affecting the growth of other cells. In Clinical Tumor Immunology. New-York, Pergamon Press, 1976, 9.
145. LEJEUNE F.J. and VERCAMMEN-GRANDJEAN A.F. : Secretory activity of macrophages in relation to cytotoxicity and modulation of cell function. In Lysosomes in applied biology and therapeutics 6 (Dingle J.T., Jacques P.J. and Shaw I.H., eds). Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1979, 425.
146. LEJEUNE F.J., VERCAMMEN-GRANDJEAN A.F., MENDES DA COSTA P., BRON D. and DEFLEUR V. : Suppressive effects induction and reticulo endothelial cells activation produced in the mouse by β 1-3 glucan. In Advances in experimental Medicine and Biology (Escobar M. and Friedman H., eds). New-York, Plenum Press, 1979.
147. LEMEVEL B.P., OLDHAM R.K., WELLS S.A., HERBERMAN R.B. : An evaluation of 125 I-iododeoxyuridine as a cellular label for in vitro assays kinetics of incorporation and toxicity. J. Nat. Cancer Inst. 1973, 51, 1551.
148. LEWIS M.G., IKONOPISOV R.L., NAIRN R.C., PHILIPS T.M.H., HAMILTON-FAIRLEY G., BODENHAM D.C. and ALEXANDER P. : Tumour specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease. Brit. Med. J. 1969, 3, 54
149. LEWIS M.G., AVIS P.J.G., PHILLIPS T.M. and SHEIKH K.M.A. : Tumor associated antigens in human malignant melanoma. Yale J. Biol. Med. 1973, 46, 661.
150. LIACOPOULOS-BRIOT M., LAMBERT F. and HALPERN B. : Etude du serum antimacrophage et de son action sur la production des anticorps. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 1975, 126C,3, 249.

151. LONAI P. and FELDMAN M. : Studies on the effect of macrophages in an in vitro graft reaction system. *Immunology* 1971, 21, 861.
152. MACHER E., MULLER C., SORG G., GASSEN A. and SORG C. : Evidence for cross reacting membrane associated specific melanoma antigens as detected by immunofluorescence and immune adherence. *Behring Inst. Mitt.* 1975, 56, 86.
153. MACKANESS : The activation of macrophage. *J. Exp. Med.* 1969, 116, 381.
154. MARTIN D.S., STOLFI R.L., SAWYER R.C., NAYAK R., SPIEGELMAN S., YOUNG C.W. and WOODCOCK T. : An overview of thymidine. *Cancer* 1980, 45, 1117.
155. MARTIN F., MARTIN M.S. and LAGNEAU A. : Role of the macrophage in control of colon cancer growth. An in vitro study. In *Gastrointestinal tumours : a clinical and experimental approach* (Gérard A., ed). *Europ. J. Cancer Suppl.* 1978, 1, 139.
156. MATHE G. : Immunothérapie active de la leucémie L 1210 appliquée après la greffe tumorale. *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.* 1968, 13, 881
157. MAUEL J., DEFENDI V. : Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by Simian Virus 40. *J. Exp. Med.* 1971, 134,2, 335.
158. MAUEL J. and DEFENDI V. : Regulation of DNA synthesis in mouse macrophages. I. Sources, action and purification of the Macrophage Growing Factor (MGF). *Exp. Cell. Res.* 1971, 65, 33.
159. McIVOR K.L. and WEISER R.S. : Mechanisms of target cell destruction by allo-immune peritoneal macrophages. *Immunology* 1971, 20, 315.
160. MELSOM H., OFTERFO R. and SELJELID R. : The cytotoxic effect of macrophages studied by time lapse microcinematography. *Exp. Cell Res.* 1973, 80, 388.
161. MELSOM H., KEARNY G., GRUCA S. and SELJELID R. : Evidence for a cytolytic factor released by macrophages. *J. Exp. Med.* 1974, 140, 1085.
162. MELTZER M.S., TUCKER R.W., SANFORD K. and LEONARD E.J. : Interaction of BCG-activated macrophages with neoplastic and non neoplastic cell lines in vitro : quantitation of the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine from prelabeled target cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 1975, 54, 1177.

163. MERCHANT D.H., KAHN R.H. and MURPHY W.H. : Handbook of cell and organ culture. Burgen Publishing Company Minneapolis, 1965.
164. METSCHNIKOFF E. : Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes (Théorie des phagocytes). Ann. Inst. Pasteur 1887, 1, 321.
165. MILLS G., MONTICONE U. and PAETKAU U. : The role of macrophages in thymocyte mitogenesis. J. Immunol. 1976, 117, 1325.
- 165! MITCHISON J.M. : The biology of the cell cycle. Cambridge University Press, 1971.
166. MIZUNOE K. and DANNENBERG A.M. : Hydrolases in rabbit macrophage III. Effects of BCG vaccination, tissue culture and ingested tubercle bacilli. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965, 120, 284.
167. MORTON D.L., MALMGREM R.A., HOLMES E.C. and KETCHAM A.S. : Demonstration of antibodies against malignant melanoma by immunofluorescence. Surgery 1969, 64, 233.
168. MUCHMORE A.V. and BLAESE R.M. : Evidence that monocyte mediated cellular recognition phenomena are mediated by receptors with specificity for oligosaccharides. In Macrophage regulation of immunity (Unanue E.R. and Rosenthal A.S., eds). Academic Press, 1980, 505.
169. MUNA N.M., MARCUS S. and SMART C. : Detection by immunofluorescence of antibodies specific for human malignant cells. Cancer 1969, 23, 88.
170. MUSCHELL L.H. and TACKSON J.E. : Activity of the antibody complement system and ysozyme against rough gram-negative organisms. Proc. Soc. Exp. Med. 1963, 113, 881.
171. NATHAN C.F., KARNOVSKY M.L. and DAVID J.R. : Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. J. Exp. Med. 1971, 133, 1356.
172. NATHAN C.F., REMOLD H.G. and DAVID J.R. : Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. J. Exp. Med 1973, 167, 265.
173. NELSON D.S. : Macrophages and immunity. Amsterdam-London, North-Holland Publ. Co., 1969, 126.

174. NELSON D.S. : Macrophages as effectors of cell mediated immunity
In Macrophages and cellular immunity (Laskin and Lechevalier, eds
London, Butterworths, 1972, 45.
175. NELSON D.S. : Production by stimulated macrophages of factors
depressing lymphocyte transformation. Nature 1973, 246, 306.
176. NOGUEIRA N., GORDON S. and COHN Z.A. : Trypanosoma cruzi : the
immunological induction of macrophage plasminogen activator
requires thymus-derived lymphocytes. J. Exp. Med. 1977, 146,
172.
177. NORTH R.J. : The concept of the activated macrophage. J. Immunol
1978, 121, 806.
178. OLIVOTTO M. and BOMFORD R. : In vitro inhibition of tumour cell
growth and DNA synthesis by peritoneal and lung macrophages from
mice injected with corynebacterium parvum. Int. J. Cancer 1974,
13, 478.
179. OPITZ H., NIETHAMMER D., JACKSON R., LEMKE H., HUGET R. and
FLAD H. : Biochemical characterization of a factor released by
macrophages. Cell. Immunol. 1975, 18, 70.
180. PANIJEL J. and de CAYEUX P. : Immunosuppressive effects of
macrophage antiserum. Immunology 1968, 14, 769.
181. PANTALONE R. and PAGE R.C. : Enzyme production and secretion by
lymphokine activated macrophages. J. Reticulo-endoth. Soc. 1977,
21,5, 343.
182. PAUL J. : Cell and tissue culture. E. & S. Livingstone ed., 1970
183. PENG C.T. : Sample preparation in liquid scintillation counting.
Amersham publications 1977, 17.
184. PERLMANN P., PERELMANN H. and BIBERFIELD P. : Lymphocyte mediate
cytotoxicity induced by humoral antibodies. Mechanism of induc-
tion and surface marker of the effector cells. Int. Arch. Allerg
1973, 45, 278.
185. PETER H.N., DIEHL V., KALDEN J.R., SEELAND P. and ECKERT G. :
Humoral and cellular cytotoxicity in vitro against allogeneic an
autologous human melanoma cells. Behring Inst. Mitt. 1975, 56,
167.

186. PIERCE C.W., KAPP J.A., WOOD D.D. and BENACERRAF G. : Immune response in vitro. X. Functions of macrophages. J. Immunol. 1974 112, 1181.
187. PRETLOW T.G., PECHICHERO M.E. and HYAMS L. : Separation of lymphocytes and macrophages from suspension of guinea-pig peritonitis exudate cells using programmed gradient sedimentation. Am. J. Path. 1971, 63, 255.
188. RABINOVITCH M. and DE STEFANO M.J. : Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. Exp. Cell Res. 1973, 77, 323.
189. RANDEKATH K. and E. : Thin layer chromatography. Meth. Enzymol. 1967, 12, 323.
190. RAZ A., FOGLER W.E. and FIDLER I.J. : The effects of experimental conditions on the expression of in vitro-mediated tumor cytotoxicity mediated by murine macrophage. Canc. Immunol. Immunoth. 1979, 7, 157.
191. REMOLD H.G., DAVID R.A. and DAVID J.R. : Characterization of migration inhibitory factor (MIF) from guinea-pig lymphocytes stimulated with concanavalin A. J. Immunol. 1972, 190, 578.
192. RODE H.N. and GORDON J. : Macrophages in the mixed leukocyte culture reaction (MLC). Cell. Immunol. 1974, 13, 87.
193. ROSER B. : The migration of macrophages in vivo. In Mononuclear phagocytes (Van Furth, ed). London, Blackwell, 1970, 166.
194. RUSSEL P. and ROSER B. : The distribution and behaviour of intravenously injected pulmonary alveolar macrophages in the mouse. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1968, 44, 629.
195. RODER J.C. and KLEIN M. : Target effector interaction in the natural killer cell system. Modulation by cyclic nucleotides. J. Immunol. 1979, 123,6, 2785.
196. SALMON S.E. et al : Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. N. Engl. J. Med. 1978 298, 1321.
197. SAMPLE W.F. and CHRETIEN P.B. : Thymidine kinetics in human lymphocyte transformation : determination of optimal labelling conditions. Clin. Exp. Immunol. 1971, 9, 3.

198. SANDERSON R. , VESOLE D., JAKWAY J. and TALMALE D. : A lymphocyte growth factor made by a human lymphoid cell line. Immunol. Review 1980, 51, 177.
199. SCHECHTER G.P., WAHL L.M. and OPPENHEIM J.J. : Suppressor monocytes in human disease. A review. In Macrophages and lymphocytes part B : Advances in experimental medicine and biology (Escobar M. and Friedman H., eds). Plenum Press, 1978, Vol. 121 B, 283.
200. SCHLAGER S.I., BOYLE M.D.P., OHANIAN S.H. and BORSOS T. : Effect of inhibiting DNA, RNA and protein synthesis of tumor cells on their susceptibility to killing by antibody and complement. Canc. Res. 1977, 37, 1432.
201. SETHI K.K., TESCHNER M. and BRANDIS H. : In vitro antilisterial activity of soluble product(s) released from listeria-immune murine peritoneal macrophages. Infect. and Immun. 1974, 10, 960.
202. SETHI K.K. and BRANDIS H. : Cytotoxicity mediated by soluble macrophage product(s). J. Nat. Canc. Inst. 1975, 55,2, 393.
203. SHANDS J.W. Jr and AXEDROD B.J. : Mouse peritoneal macrophages : tritiated thymidine labelling and cell kinetics. J. Reticuloendoth. Soc. 1977, 21,1.
204. SJOGREN H., HELLSTROM I., BANSAL S.C. and HELLSTROM K.E. : Suggestive evidence that "blocking antibodies" of tumor bearing individuals may be antigen-antibody complexes. Proc. Nat. Acad. Sci. 1971, 68, 1372.
205. SMITH T.J. and WAGNER R.R. : Rabbit macrophage interferons II Some physicochemical properties and estimations of molecular weights. J. Exp. Med. 1967, 125, 579.
206. SORG C. : Radioactive labelling and characterization of the products of activated mouse lymphocytes. Eur. J. Biochem. 1975, 55, 423.
207. SPECTOR W.G. and RYAN G.B. : New evidence for the existence of long-lived macrophages. Nature 1969, 221, 860.
208. SPITZNAGEL J.K. and ALLISON A.C. : Mode of action of adjuvants : effect on antibody responses to macrophage-associated bovine serum albumin. J. Immunol. 1970, 104, 128.

209. STADECKER M.J., CALDERON J., KARNOVSKY M.L. and UNANUE E.R. : Synthesis and release of thymidine by macrophages. *J. Immunol.* 1977, 119, 1738.
210. STADECKER M.J. and UNANUE E. : The regulation of thymidine secretion by macrophages. *J. Immunol.* 1979, 123,2, 568.
211. STANLEY E.R., CIFONE M., HEARD P.M. and DEFENDI V. : Factors regulating macrophage production and growth. *J. Exp. Med.* 1976, 143, 631.
212. STEIMAN R.M. and COHN Z.A. : The interaction of particulate horse-radish peroxidase (HRP)-anti HRP immune complexes with mouse peritoneal macrophages in vitro. *J. Cell. Biol.* 1972, 55, 616.
213. STIFFEL C., MOUTON D. and BIOZZI G. : Kinetics of the phagocytic function of the reticuloendothelial macrophages in vivo. In *Mononuclear phagocytes* (Van Furth, ed). London, Blackwell, 1970, 335.
214. TAGLIABUE A., MANTOVANI A., KILGALLEN M., HERBERMAN R.B. and McCOY J.L. : Natural cytotoxicity of mouse monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 1979, 122,6, 2363.
215. VOLKMAN A. : The origin and turn over of mononuclear cells in peritoneal exudates in rats. *J. Exp. Med.* 1966, 124, 241.
216. UNANUE E.R. : Properties and some uses of antimacrophage antibodies. *Nature* 1968, 218, 36.
217. UNANUE E.R. and CEROTTINI J. : Persistence of antigen on the surface of macrophages. *Nature* 1969, 222, 1193.
218. UNKELESS J.C., GORDON S. and REICH F. : Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 1974, 139, 834.
219. VAN DER MEER J. : Predestination of monocytes. *Immunology Today* 1980, 1, 4, 1.
220. VAN LOVEREN H. and DEN OTTER W. : In vitro activation of armed macrophages and the therapeutic application in mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 1974, 52, 1917.
221. VAN FURTH R. and COHN Z.A. : The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 1968, 128, 415.

222. VAN FURTH R. : The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice. In Mononuclear phagocytes (Van Furth, ed). London, Blackwell, 1970, 151.
223. VAN FURTH R. : The role of phagocytic cells in the defence of the host. Acta Paediatr. Bel. 1977, 30, 133.
224. VERCAMMEN-GRANDJEAN A.F., LEJEUNE F.J. : Production and mode of action of macrophage secretions that interfere with the in vitro incorporation of radioactive DNA precursors by tumour cells. In The macrophage and cancer (James K., ed). Edinburgh, 1977, 50.
225. WAHL L.M., WAHL S.M., MERGENHAGEN S.E. and MARTIN G.R. : Collagenase production by endotoxin activated macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1974, 71, 3598.
226. VIZA D., PHILLIPS J. and TREJDOSIEWICZ L.K. : Potentiation and arming lymphocyte mediated immunity by sera from melanoma patient. Behring Inst. Mitt. 1975, 56, 83.
227. WALDMANN S.R. and GOTTLIEB A.A. : Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells : effect of a soluble factor from macrophages. Cell. Immunol. 1973, 9, 142.
228. WHISTLER R.L., BUSHWAY A.A., SINGH P.P., NAKAHARA W. and TOKUZEN Non cytotoxic antitumor polysaccharides. Adv. in Carbohydrate Chem. and Biochem. 1976, 32, 235.
229. WATSON J. and MOCHILIKI D. : Interleukin 2, a class of T cell growth factors. Immunol. Rev. 1980, 51, 257.
230. WYNNE K.M., SPECTOR W.G. and WILLOUGHBY D.A. : Macrophage proliferation in vitro induced by exudates. Nature 1975, 253, 636.
231. YAGEL S., GALLILY R. and WEISS D.W. : Effect of treatment with the MER fraction of tubercle bacilli on hydrolytic lysosomal enzyme activity of mouse peritoneal macrophages. Cell. Immunol. 1975, 19, 381.
232. ZEMBALA M. and ASHERSON G.L. : The rapid purification of peritoneal exudate macrophages by Ficoll (Polysucrose) density gradient centrifugation. Immunol. 1970, 19, 677.

233. ZIGHELBOIM J., BONAVIDA B. and FAHEY J.L. : Heterogenous populations of cytotoxic cells in the peritoneal cavity of Balb/c mice immunized with allogenic EL4 leukemia cells. Cell. Immunol. 1974, 12, 280.

ADDENDA A L'INTRODUCTION

LE MACROPHAGE ET LES TUMEURS

Mise au point de mars 1977 à juin 1981.

De la période du 27 mars 1977 au 11 juin 1981, soit pendant 51 mois, la littérature scientifique mondiale s'est enrichie de 6268 articles dans lesquels sont étudiés les macrophages (sources : Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information). D'après l'éditorial d'Eugène Garfield, directeur du Institute for Scientific Information, la progression de l'apparition du mot "macrophage" repris dans un titre d'article de revue citée par Current Content's est de 2204 en 1973, 3591 en 1976, 5444 en 1979 et 6429 en 1980. C'est dire que le sujet est vaste. Mais cette progression est probablement le résultat d'un intérêt nouveau pour une cellule du système leucocytaire, jusque là ignorée à cause de l'engouement des immunologistes pour le système lymphocytaire.

Du fait de l'ubiquité et de la variabilité des fonctions du macrophage, il faut en distinguer les divers types d'actions possibles vis-à-vis des cellules tumorales.

Le premier type d'action possible est celui que peuvent avoir les macrophages normaux ou activés sur d'autres cellules normales ou transformées. C'est l'action dite immunologiquement non spécifique.

L'autre type d'action qui a paradoxalement été étudiée avant la première est l'action immunologiquement spécifique que le macrophage peut avoir vis-à-vis d'une cellule souvent appelée cible. La capacité de fonctionner de ce système spécifique requiert que des éléments de reconnaissance immunologique entrent en jeu, ce qui n'est pas toujours évident dans le cas des tumeurs. Le mode d'action des macrophages dans la modulation des métabolismes des cellules tumorales peut se faire par contact direct ou à distance à l'aide de médiateurs moléculaires sécrétés par les macrophages. La recherche de l'identité de ces médiateurs est en cours dans de nombreux laboratoires, avec tout ce que cela implique comme difficultés d'isoler et d'identifier ces facteurs biologiquement actifs.

Le macrophage renforce de plus en plus sa réputation de cellule effectrice (44,45). Son activité tumoricide est décrite dans de nombreux systèmes expérimentaux (2,33) et son efficacité est souvent mesurée par l'expression de sa cytotoxicité (8,29,43,50). Le type de cytotoxicité associée à divers types de macrophages (34) présents en divers sites anatomiques ou au sein des tumeurs a été bien étudié (35). Des phagocytes du sang, des exudats péritonéaux et du lait humains ainsi que les macrophages associés à des tumeurs ascitiques humaines ont été testés pour leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales en culture in vitro (TU5).

Le mode d'action cytotoxique du macrophage a été corrélé avec son activité à divers niveaux : membranaire (7,22,56) et enzymatique (18,24). Le niveau d'activation par différents agents plus ou moins purifiés et définis détermine aussi le degré de cytotoxicité (55). La stimulation du système réticuloendothélial par trois souches de propionibacteriae et la résistance de la souche à la dégradation par les phagocytes sont corrélées avec leurs pouvoirs stimulants et antitumoraux. Ces propriétés sont liées au potentiel contenu dans la paroi cellulaire des agents infectieux. La séquence de phénomène de contact et d'interaction cellulaire peut aussi jouer un grand rôle dans la cytotoxicité (17). Des cellules macrophagiques aussi étonnantes que les macrophages du lait ont aussi été étudiées pour leur caractéristique antitumorale (1).

Le macrophage peut bien sûr être déficient face à une cellule tumorale (6,31,51). Dans un même patient, les macrophages alvéolaires ne sont pas cytotoxiques alors que les macrophages d'autres sites le sont vis-à-vis de cellules tumorales (6). Chez les cancéreux, le nombre de cellules macrophagiques cytotoxiques est déprimé (31).

Dans certaines situations particulières, le macrophage peut moduler la croissance tumorale en inhibant ou en stimulant celle-ci tour à tour (4,19,58). De son côté, la cellule tumorale peut avoir un effet sur les fonctions des macrophages (59) directement ou indirectement en déclenchant des mécanismes suppresseurs de la cellule qui modulent la réponse immune (65).

L'activation des macrophages semble être un pas très important dans sa capacité d'augmenter son action effectrice cytotoxique (28,38,56,57). Cette activation peut s'obtenir par divers moyens et notamment par l'administration de substances irritantes (66,68,69) à fort caractère antigénique ou immunoadjuvantes tels le thioglycollate (42), des endotoxines (16,26,60), des parois bactériennes (62), l'influenza (48), des leishmania (41), des lectines telles la concanavalin A ou des lipopolysaccharides (66), des levures tel le candida albicans (67), le nocardia rubra (49) et le BCG (36,37,71). Les mécanismes d'activation des macrophages sont encore mal connus mais l'intervention de lymphokines (40) et en particulier de MAF (macrophage activating factor) (39) semble établie. On essaie bien entendu d'isoler et de déterminer les principes actifs des activateurs primaires (extraits bactériens) (13) et secondaires (médiateurs cellulaires) (26,69) et leurs modes d'actions sur la cellule effectrice (46,47) ainsi que les co-facteurs nécessaires à ces processus tels que la présence de fucose et d'acide sialique à la surface membranaire (12). Comme dit précédemment, l'activité cytotoxique des macrophages activés ou non peut être contrecarrée par des effecteurs provenant de la cellule tumorale (5,10). La N-acetyl-D-galactosamine bloque l'activation du macrophage et sa capacité d'inhiber la croissance tumorale (63). La cytotoxicité induite du macrophage (21,30) est parfois confondue avec celle des cellules NK soit natural killer, traduit par cellule tueuse (11,54). Le macrophage

est typiquement la cellule faisant la liaison entre la cytotoxicité cellulaire non spécifique et spécifique au sens immunologique (25). On peut, dans certains cas, obtenir des macrophages dits immuns, capables de détruire des cellules tumorales allogéniques (15). L'interaction macrophages-cellules T cytotoxiques est aussi très importante dans ces phénomènes (20,64). En effet, les cellules effectrices sont distribuées de manière particulière dans les tumeurs (61). Ceci joue un rôle sur leur mode d'action et le rapport cellule effectrice/cellule cible (3,27,53,59,70). Le macrophage active lui aussi les autres cellules et en particulier les lymphocytes à l'aide de facteurs appelés interleukines telle l'IL1. Cette molécule, aussi appelée LAF ou "lymphocyte activating factor", a une activité sur la prolifération des thymocytes en présence de serum de veau foetal (FCS) et de lipopolysaccharide (LPS). Ces produits sont caractéristiques du macrophage et on les retrouve même dans les lignées de macrophages transformés telles la P388D et la J774I de souris (32). D'autres facteurs relargués par les macrophages tels le lysozyme (14) ou l'activateur du plasminogène peuvent jouer un rôle dans ces processus (9).

Un type de molécules qui seront amenées à jouer un rôle apparemment non négligeable dans la modulation des croissances tumorales et secrétées par les macrophages sont les prostaglandines (23,52). Celles-ci ont des effets tour à tour promoteurs et inhibiteurs des croissances cellulaires. Ceci nous montre une fois de plus que, selon le modèle étudié et la méthodologie utilisée, des résultats apparemment contradictoires peuvent apparaître. A nous de les cerner et de leur trouver une explication rationnelle.

ADDENDA A LA BIBLIOGRAPHIE

1. BALKWILL F.R. and HOGG N. : Characterization of human breast milk macrophages cytostatic for human cell lines. *J. Immunol.* 1980, 123, 1451-1456.
2. BANDLOW G. and GROENER R. : Cytostatic effect of macrophages from non-immunised mice on mastocytoma P-815 cells in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1980, 94, 225-232.
3. BECKER S. and HASKILL S. : Non-T-cell-mediated cytotoxicity in MSV tumor-bearing mice. III. Macrophage-mediated cytotoxicity against autochthonous MSV tumor-isolated target cells. *Int. J. Cancer* 1980, 25, 535-541.
4. BINDERUP L., BRAMM E. and ARRIGONI-MARTELLI E. : Peritoneal macrophages from adjuvant arthritic rats enhance tumour cell growth in vitro. *Experientia* 1980, 35, 1230-1232.
5. BORASCHI D. and MELTZER M.S. : Defective tumoricidal capacity of macrophages from P/J mice : characterization of the macrophage cytotoxic defect after in vivo and in vitro activation stimuli. *J. Immunol.* 1980, 125, 771-776.
6. BORDIGNON C., AVALLONE R., PERI G., POLENTARUTTI N., MANGIONI C. and MANTOVANI A. : Cytotoxicity on tumour cells of human mononuclear phagocytes : defective tumoricidal capacity of alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1981, 41, 336-342.
7. CABILLY S. and GALLILY R. : Artificial binding of macrophages to syngeneic cells elicits cytostasis but not cytolysis. *Immunology* 1981, 42, 149-155.
8. CHANG Y.C. and YAO C.S. : Investigation of the human macrophage. II. The in vitro cytotoxicity of macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1980, 9, 521-525.
9. CHAPMAN H.A. Jr, VAVRIN Z. and HIBBS J.B. Jr : Modulation of plasminogen activator secretion by activated macrophages : influence of serum factors and correlation with tumoricidal potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 76, 3899-3903.

10. CHEUNG H.T., CANTAROW W.D. and SUNDHARADAS G. : Tumoricidal activity of macrophages induced by lipopolysaccharide and its inhibition by a low molecular weight factor extracted from tumors. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1980, 26, 21-30.
11. CHOW D.A., GREENE M.I. and GREENBERG A.H. : Macrophage-dependent, NK-cell-independent "natural" surveillance of tumors in syngeneic mice. *Int. J. Cancer* 1979, 23, 788-797.
12. CHURCHILL W.H. and WONG C. : Mediator-induced macrophage activation, as shown by enhanced cytotoxicity for tumor, requires macrophage surface fucose and sialic acid. *Cell. Immunol.* 1981, 55, 490-498.
13. CUMMINGS N.P., PABST M.J. and JOHNSTON R.B. Jr : Activation of macrophages for enhanced release of superoxide anion and greater killing of *Candida albicans* by injection of muramyl dipeptide. *J. Exp. Med.* 1981, 152, 1659-1669.
14. DI LUZIO N.R. : Lysozyme, glucan-activated macrophages and neoplasia. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1980, 26, 67-81.
15. DINGEMANS K.P., PELS E. and DEN OTTER W. : Destruction of murine lymphoma cells by allogeneic immune peritoneal macrophages in vitro : an ultrastructure study. *JNCI* 1981, 66, 67-79.
16. DYE E.S. and NORTH R.J. : Macrophage accumulation in murine ascites tumors. I. Cytoxan-induced dominance of macrophages over tumor cells and the anti-tumor effect of endotoxin. *J. Immunol.* 1981, 125, 1650-1657.
17. ERICKSON K.L. and HU F. : Cell interactions in the initial contact between cultured melanoma cells and syngeneic macrophages. *Am. J. Pathol.* 1979, 95, 17-28.
18. FARRAM E. and NELSON D.S. : Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells : role of arginase. *Cell. Immunol.* 1981, 55, 283-293.
19. GABIZON A. and TRAININ N. : Enhancement of tumor growth by peritoneal macrophages of normal and tumor-bearing mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1980, 121, 485-491.
20. GRAY J.D. and BROOKS C.G. : The induction of cytotoxic macrophages and natural killer cells in congenitally athymic rnu/rnu rats. *Cell. Immunol.* 1981, 53, 405-412.

21. GRIMM W., BAERLIN E., LESER H.G., KRAMER W. and GEMSA D. : Induction of tumor cytostatic macrophages by 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA). Clin. Immunol. Immunopathol. 1981, 17, 617-628.
22. HAKIM A.A. : Correlation between macrophages and their membrane fraction. Cytocidal activities on neoplastic cells. Exp. Cell. Biol. 1981, 48, 445-460.
23. HAMILTON J.A. : Stimulation of macrophage prostaglandin and neutral protease production by phorbol esters as a model for the induction of vascular changes associated with tumor promotion. Cancer Res. 1980, 40, 2273-2280.
24. HAMMERSTROM J. : Structure and function of human effusion macrophages from patients with malignant and benign disease. 2. In vitro cytostatic and cytolytic effect on human tumour cell lines. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (C) 1981, 88, 201-209.
25. HERBERMAN R.B., HOLDEN H.T., DJEU J.Y., JERRELLS T.R., VAREGIO L., TAGLIABUE A., WHITE S.L., OEHLER J.R. and DEAN J.H. : Macrophages as regulators of immune responses against tumors. Adv. Exp. Med. Biol. 1980, 121, 361-379.
26. HIBBS J.B., WEINBERG J.B. and CHAPMAN H.A. : Modulation of the tumoricidal function of activated macrophages by bacterial endotoxin and mammalian macrophage activation factor(s). Adv. Exp. Med. Biol. 1980, 121, 433-453.
27. HOLDEN H.T., VAREGIO L, TANIYAMA T. and PUCCETTI P. : Functional heterogeneity and T cell-dependent activation of macrophages from murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors. Adv. Exp. Med. Biol. 1980, 121, 509-520.
28. HOPPER K.E., HARRISON J. and NELSON D.S. : Partial characterization of anti-tumor effector macrophages in the peritoneal cavities of concomitantly immune mice and mice injected with macrophage-stimulating agents. J. Reticuloendothel. Soc. 1980, 26, 259-271.
29. KELLER R. and KEIST R. : Comparison of three isotope-release assays for spontaneous cytotoxicity of macrophages. Br. J. Cancer 1978, 37, 1078-1082.

30. KRAHENBUHL J.L. : Effects of activated macrophages on tumor target cells in discrete phases of the cell cycle. *Cancer Res.* 1981, 40, 4622-4627.
31. KRISHNAN E.C., MENON C.D., KRISHNAN L. and KEWELL W.R. : Deficiency in maturation process of macrophages in human cancer. *JNCI* 1980, 65, 273-276.
32. LACHMAN L.B. and METZGAR R.S. : Characterization of high and low molecular weight lymphocyte-activating factor (interleukin I) from P388D and J774.1 mouse macrophage cell lines. *J. Reticuloendoth. Soc.* 1980, 27, 621-629.
33. MAENNEL D.N., MOORE R.N. and MERGENHAGEN S.E. : Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect. Immun.* 1981, 30, 523-530.
34. MANTOVANI A., BAR SHAVIT Z., PERI G., POLENTARUTTI N., BORDIGNON C., SESSA C. and MANGIONI C. : Natural cytotoxicity on tumour cells of human macrophages obtained from diverse anatomical sites. *Clin. Exp. Immunol.* 1980, 39, 776-784.
35. MANTOVANI A., POLENTARUTTI N., PERI G., SHAVIT Z.B., VECCHI A., BOLIS G. and MANTIONI C. : Cytotoxicity on tumor cells of peripheral blood monocytes and tumor-associated macrophages in patients with ascites ovarian tumors. *JNCI* 1980, 64, 1307-1315.
36. MARINO P.A. and ADAMS D.O. : Interaction of Bacillus Calmette-Guerin-activated macrophages and neoplastic cells in vitro. I. Conditions of binding and its selectivity. *Cell. Immunol.* 1981, 54, 11-25.
37. MARINO P.A. and ADAMS D.O. : Interaction of Bacillus Calmette-Guerin-activated macrophages and neoplastic cells in vitro. II. The relationship of selective binding to cytolysis. *Cell. Immunol.* 1981, 54, 26-35.
38. MATSUNAGA K, MASHIBA H. and GOJOBORI M. : Cytostatic activity of in vitro activated human adherent cells against human tumor cell lines. *GAN* 1980, 71, 73-79.
39. McDANIEL M.C. : Human macrophage activation factors. I. Multiple molecular species of MAF produced by a human lymphoid cell line. *Inflammation* 1980, 4, 125-135.

40. MELTZER M.S., RUCO L.P. and LEONARD E.J. : Macrophage activation for tumor cytotoxicity : mechanisms of macrophage activation by lymphokines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1980, 121, 381-398.
41. MERINO F. and LUIS J. : The effect of peritoneal macrophages from mice injected with leishmania braziliensis on the in vitro growth of tumor cells. *Immunol. Commun.* 1980, 8, 457-468.
42. MIYASAKA M., TAKIGUCHI T. and KONDA S. : The paradoxical effects of thioglycollate-induced macrophages on the growth of B16 melanoma cells in vivo and in vitro. *GAN* 1981, 71, 293-299.
43. MUKHERJI B. : In vitro assay of spontaneous cytotoxicity by human monocytes and macrophages against tumor cells. *J. Immunol. Methods* 1981, 37, 233-247.
44. NAGAI S. : Nonspecific in vitro cytotoxicity of activated human macrophages on human tumor cells. *Acta Obstet. Gynaecol. Jpn* 1981, 32, 2027-2036.
45. NATHAN C.F., MURRAY H.W. and COHN Z.A. : The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 1980, 303, 622-626.
46. NIEMTZOW R.C., EATON D.C., KUNZE D.L., BECKER S.N., WONG J.Y., OLSON M.H., McBEE J., MOULTON R.G., GAUCI L., VIALLET P., SERROU B. and DANIELS J.C. : Correlation between macrophage intracellular electrical potentials and malignant melanoma growth in a murine model. *Biomedicine (Express)* 1980, 31, 257-260.
47. NIEMTZOW R.C., ROSSIO J.L., OLSON M.H., GAUCI L., DANIELS J.C. and SERROU B. : Lymphokine-induced changes in macrophage transmembrane electrical potentials. *Biomedicine (Express)* 1980, 31, 264-267.
48. NUGENT K.M. and PESANTI E.L. : Effect of influenza infection on the phagocytic and bactericidal activities of pulmonary macrophages. *Infect. Immun.* 1980, 26, 651-657.
49. OGURA T., NAMBA N., HIRAO F., YAMAMURA Y and AZUMA I. : Association of macrophage activation with antitumor effect on rat syngeneic fibrosarcoma by nocardia rubra cell wall skeleton. *Cancer Res.* 1980, 39, 4706-4712.

50. PALLADINO M.A., CHI D.S., BLYZNAK N., PAOLINO A.M. and THORBECKE G.J. : Cytotoxicity to allogeneic cells in the chicken. I. Role of macrophages in the cytotoxic effect on 51Cr-labelled red blood cells by immune spleen cells. *Dev. Comp. Immunol.* 1980, 4, 309-322.
51. PAVLIDIS N. and CHIRIGOS M. : Stress-induced impairment of macrophage tumoricidal function. *Psychosom. Med.* 1980, 42, 47-54.
52. PELUS L.M. and BOCKMAN R.S. : Increased prostaglandin synthesis by macrophages from tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 1980, 123, 2118-2125.
53. PIESSENS W.F. and SHARMA S.D. : Tumor cell killing by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators. 5. Role of proteases, inhibitors, and substrates. *Cell. Immunol.* 1981, 56, 286-291.
54. PUCCETTI P., SANTONI A., RICCARDI C., HOLDEN H.T. and HERBERMAN R.B. : Activation of mouse macrophages by pyran copolymer and role in augmentation of natural killer activity. *Int. J. Cancer* 1980, 24, 819-825.
55. ROSZKOWSKI W., KO H.L., ROSZLOWSKI K., SZMIGIELSKI S., JELJASZEWICZ J. and PULVERER G. : The correlation of susceptibility of different propionibacterium strains to macrophage killing and antitumor activity. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 1981, 169, 1-8.
56. RUSSELL S.W. and ESSER A.F. : Activated macrophages kill tumor cells independent of membrane fluidity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 89, 520-525.
57. SCHULTZ R.M. and CHIRIGOS M.A. : Macrophage activation for nonspecific tumor cytotoxicity. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 1981, 17, 157-193.
58. SCHULTZ R.M., CHIRIGOS M.A. and OLKOWSKI Z.L. : Stimulation and inhibition of neoplastic cell growth by tumor promoter-treated macrophages. *Cell. Immunol.* 1981, 54, 98-106.
59. SHARMA J.M. : In vitro suppression of T-cell mitogenic response and tumor cell proliferation by spleen macrophages from normal chickens. *Infect. Immun.* 1980, 28, 914-922.

60. SONE S. and FIDLER I.J. : Tumor cytotoxicity of rat alveolar macrophages activated in vitro by endotoxin. *J. Reticuloendoth. Soc.* 1980, 27, 269-279.
61. SVENNEVIG J.L. and SVAAR H. : Content and distribution of macrophages and lymphocytes in solid malignant human tumours. *Int. J. Cancer* 1980, 24, 754-758.
62. TAKADA H., TSUJIMOTO M., KATO K., KOTANI S., KUSUMOTO S., INAGE M., SHIBA T., YANO I., KAWATA S. and YOKOGAWA K. : Macrophage activation by bacterial cell walls and related synthetic compounds. *Infect. Immun.* 1980, 25, 48-53.
63. THOMASSON D.L. and STEWART C.C. : N-acetyl-D-galactosamine blocks activation of murine macrophages to inhibit tumor cell growth. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1981, 28, 449-456.
64. TING C.C. and RODRIGUES D. : Evaluation of the immunocompetence of macrophages and the generation of T-cell-mediated cytotoxic response against allogeneic tumor cells in tumor bearers. *Int. J. Cancer* 1980, 25, 243-249.
65. TING C.C. and RODRIGUES D. : Switching on the macrophage-mediated suppressor mechanism by tumor cells to evade host immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1981, 77, 4265-4269.
66. TOH K., YAMAMOTO N., SUZUKI T. and KIKUCHI K. : Effect of concanavalin A and lipopolysaccharide on the cytotoxicity of macrophages and neutrophils. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1980, 26, 273-282.
67. WEINBERG J.B. : In vivo modulation of macrophage tumoricidal activity : enhanced tumor cell killing by peritoneal macrophages from mice given injections of sodium periodate. *JNCI* 1981, 66, 529-533.
68. WEINBERG J.B. and HIBBS J.B. Jr : Enhanced macrophage tumoricidal activity and tumor suppression or regression caused by heat-killed candida albicans. *JNCI* 1980, 63, 1273-1278.
69. WEINBERG J.B. and HIBBS J.B. Jr : In vitro modulation of macrophage tumoricidal activity : partial characterization of a macrophage-activating factor(s) in supernatants of NAI04-treated peritoneal cells. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1980, 26, 283-293.

70. WING E.J. and REMINGTON J.S. : Activated macrophages pre-incubated in vitro enhance rather than suppress mitogen-stimulated lymphocyte transformation. Immunology 1981, 40, 239-246.
71. ZWILLING B.S. and CAMPOLITO L.B. : Destruction of tumor cells by BCG-activated alveolar macrophages. J. Immunol. 1977, 119, 838-841.