



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude cytophysiologique du macrophage alvéolaire

Thirot, Véronique

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DU MACROPHAGE
ALVEOLAIRE.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

VERONIQUE THIROT
1985 - 1986

*FM
B04/1986/
01B

BUMP

Mes premiers remerciements s'adressent au Professeur R. Leloup, Doyen de la Faculté de Médecine, pour m'avoir accueillie dans son département.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur M. Saint-Guillain, promoteur de ce mémoire, pour le dynamisme, la patience et la très grande disponibilité avec lesquels il a guidé ce travail.

Je remercie également le Professeur M. Lamy, chef du service d'Anesthésiologie de l'Hopital de Bavière ainsi que le Docteur Ph. Hubert pour m'avoir fourni les macrophages alvéolaires humains.

J'ai pu bénéficier des connaissances du Professeur Y. Bertrand en ce qui concerne l'ARDS. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements vont au Docteur R. Greimers pour m'avoir initié à l'étude par cytofluorimétrie; sa patience et sa compétence m'ont beaucoup stimulée.

Je me dois également de remercier le Docteur MC. Liétaert et le Professeur A. Piront pour avoir mis à ma disposition leur traitement de texte; leur gentillesse et leurs encouragements m'ont fort touchée.

Le Professeur S. Wattiaux-De Coninck m'a permis d'utiliser le cryostat de son département. Je lui en suis très reconnaissante.

Je remercie le Professeur J. Remacle ainsi que tous les membres de son département pour avoir accepté que j'utilise leur microscope à fluorescence.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Martine Raes pour m'avoir initié avec tant de gentillesse à la microscopie à fluorescence.

Tout au long de ce mémoire, j'ai pu bénéficier de l'aide efficace de Madame F. Zune. Son dynamisme et sa gentillesse m'ont énormément encouragée.

Je remercie Madame F. De Bosch-Kemper pour ses conseils et sa gentillesse; ainsi que Messieurs M. Lombet, R. Déom et J.M. Pirson pour leur collaboration et leurs encouragements. J'adresse des remerciements plus particuliers à Monsieur R. Déom pour sa constante disponibilité.

Je remercie également Monsieur Y. Houbion, de l'Unité de Microscopie Electronique, pour son assistance technique.

Les documents photographiques ont été réalisés par Monsieur J. Collet. Je lui en suis profondément reconnaissante

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

PLAN

1. INTRODUCTION.

- 1.1. Les cellules phagocytaires
- 1.2. Origine des phagocytes mononucléés
- 1.3. Morphologie
- 1.4. Fonctions
 - 1.4.1. La phagocytose
 - 1.4.2. Sécrétion d'enzymes
 - 1.4.3. Sécrétion de médiateurs
 - 1.4.4. Régulation de la réponse immunitaire
- 1.5. Le poumon
 - 1.5.1. Description anatomique, histologique et fonctionnelle
 - 1.5.2. Bref aperçu sur deux groupes de maladies pulmonaires
- 1.6. Le système des macrophages alvéolaires
 - 1.6.1. Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles
 - 1.6.2. Origine et Cinétique
 - 1.6.3. Réponse adaptative
 - 1.6.4. Clearance pulmonaire
 - 1.6.5. Réponses excessives
 - 1.6.5.1. Interactions entre le macrophage alvéolaire et le fibroblaste
 - 1.6.5.2. Lésions pulmonaires
 - A. L'effet de la fumée de cigarette sur le macrophage alvéolaire
 - B. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë chez l'adulte (ARDS)
- 1.7. Perspectives d'avenir dans l'étude du macrophage alvéolaire

2. BUT DU TRAVAIL

3. MATERIEL ET METHODE

- 3.1. Matériel
- 3.2. Méthode
 - 3.2.1. Isolement des macrophages alvéolaires
 - A. Méthode pour isoler les macrophages alvéolaires de rat
 - B. Technique du lavage broncho-alvéolaire pour obtenir des macrophages alvéolaires humains
 - 3.2.2. Culture des macrophages alvéolaires
 - 3.2.3. Etude de la capacité fonctionnelle du macrophage alvéolaire
 - 1) La phagocytose
 - 2) Mise en évidence des phosphatases acides
 - 3) Une technique d'étude quantitative : le FACS

4. RESULTATS DE L'ETUDE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES DE RAT
 - 4.1. Obtention des cellules macrophagiques par lavage broncho-alvéolaire
 - A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
 - B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate
 - 4.2. Etude de la capacité fonctionnelle des macrophages alvéolaires
 - 4.2.1. Détection enzymatique
 - A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
 - B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate
 - C. Macrophages alvéolaires cultivés avec du sérum à partir de rats stimulés par du BCG
 - 4.2.2. Phagocytose de microcoques
 - A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
 - B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate
 - C. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux" cultivés avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG
 - 4.2.3. Analyse quantitative de la phagocytose
 - A. Phagocytose de microcoques fluorescés
 - B. Phagocytose de billes de latex fluorescés
5. RESULTATS DE L'ETUDE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS
6. DISCUSSION
7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES D'AVENIR

1. INTRODUCTION.

1.1. Les cellules phagocytaires.

Il y a environ une centaine d'années, en 1882, Metchnikoff a considéré les phagocytes comme étant des cellules essentielles pour assurer la défense de l'organisme. C'est ainsi qu'il mit en évidence un processus biologique fondamental : la phagocytose.

En observant divers protozoaires, il constatait que ceux-ci assuraient leur nutrition en captant des particules organiques qu'ils englobaient puis digéraient au sein de vacuoles digestives.

Il y a deux catégories principales de cellules phagocytaires chez l'homme (Fauci, 1978) :

a) Les phagocytes circulants du compartiment sanguin; ils incluent certains granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) et les monocytes.

b) Les phagocytes "fixés" ou macrophages tissulaires.

Une autre façon de classer les phagocytes fut envisagée en 1969 d'après leur degré d'activité phagocytaire. Ainsi fut défini le "système des phagocytes mononucléés" comprenant les cellules mononucléées développant un pouvoir phagocytaire important (Van Furth, 1980).

Ces cellules sont également regroupées d'après des caractéristiques communes de morphologie et de fonction. Elles dérivent à partir d'un précurseur de la moelle osseuse, le monoblaste, qui se différencie en promonocytes, monocytes sanguins et macrophages tissulaires.

Lors d'une réaction inflammatoire, les macrophages sont issus de monocytes sanguins (Van Furth, 1970). Cependant, l'hypothèse d'une origine locale a également été évoquée (Volkman, 1976 cité par Bowden, 1984).

Le macrophage alvéolaire que nous nous proposons d'analyser appartient au système des phagocytes mononucléés.

Le rôle principal des phagocytes est l'ingestion et la destruction de micro-organismes, de débris cellulaires, de tout élément étranger à l'organisme. Outre cette fonction, ces cellules macrophagiques sont capables de synthétiser et de sécréter une variété de substances qui sont directement ou indirectement en relation avec les mécanismes de défense de l'hôte (Stecher, 1970, Fishman and Adler, 1970 cités par Fauci, 1978).

1.2. Origine des phagocytes mononucléés.

Le système des phagocytes mononucléés se subdivise en trois compartiments (Fig.1) : le compartiment médullaire, le compartiment sanguin et le compartiment tissulaire. Le compartiment médullaire comprend les cellules souches communes aux lignées granulocytaire et monocyttaire donnant naissance aux monoblastes puis aux promonocytes et enfin aux monocytes. Les monocytes nouvellement formés quittent la moelle osseuse pour arriver dans le compartiment sanguin. Ils achèvent leur maturation dans les tissus où ils prennent les noms d'histiocytes et de macrophages.

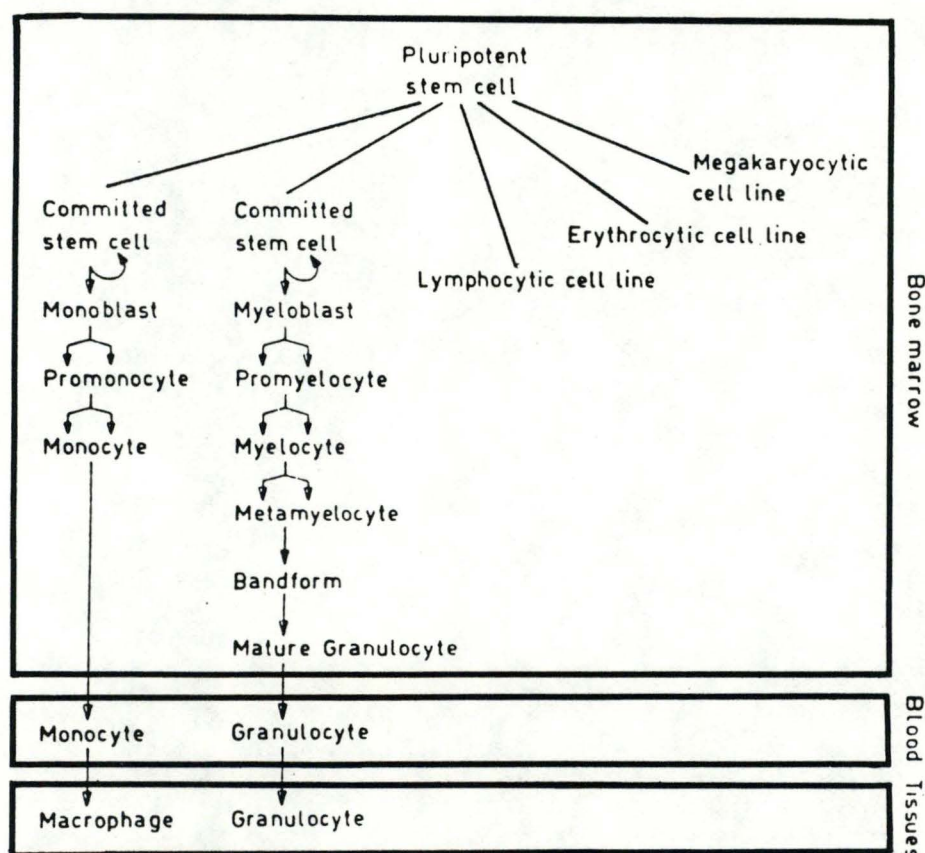


Fig. 1. Lignées des phagocytes polymorphonucléaires et des phagocytes mononucléés (Le, 1984).

En mesurant l'incorporation de la thymidine tritiée par la technique de l'autoradiographie, l'évolution de la première cellule immature du système des phagocytes mononucléés a pu être suivie.

Cette cellule, appelée monoblaste, est identifiée comme étant le précurseur immédiat des promonocytes : localisée au niveau de la moelle osseuse, elle subit une division en deux cellules filles, les promonocytes; ceux-ci se différencient à leur tour pour donner quatre monocytes.

Les promonocytes constituent environ 3 % des cellules de la moelle osseuse.

Les monocytes représentent plus de 10 % des leucocytes (Weiss, 1972). Ils quittent la moelle osseuse dans les 24 heures et résident 32 heures en moyenne dans le compartiment sanguin avant d'atteindre les tissus où ils prennent le nom de macrophages.

L'autoradiographie révélant la proportion de thymidine tritiée incorporée par l'ADN cellulaire a permis de constater une capacité divisionnelle assez faible de la part des monocytes et des macrophages lorsque les conditions sont normales. Il en est tout autrement quand ces cellules se trouvent dans des conditions de stimulation : leur nombre peut augmenter par des multiplications locales; c'est le cas pour le macrophage alvéolaire (Hocking and Golde, 1979; Golde et al., 1974; Blussé Van oud alblos and Van Furth, 1979) et le macrophage hépatique.

Le phénomène de diapédèse des monocytes sanguins issus de la moelle osseuse assure le renouvellement des cellules macrophagiques (Fig.2) : grâce à leurs mouvements amiboïdes, les monocytes sanguins peuvent s'infiltrer entre les cellules endothéliales du vaisseau sanguin et pénétrer dans le tissu conjonctif. Ce passage des monocytes du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire est irréversible.

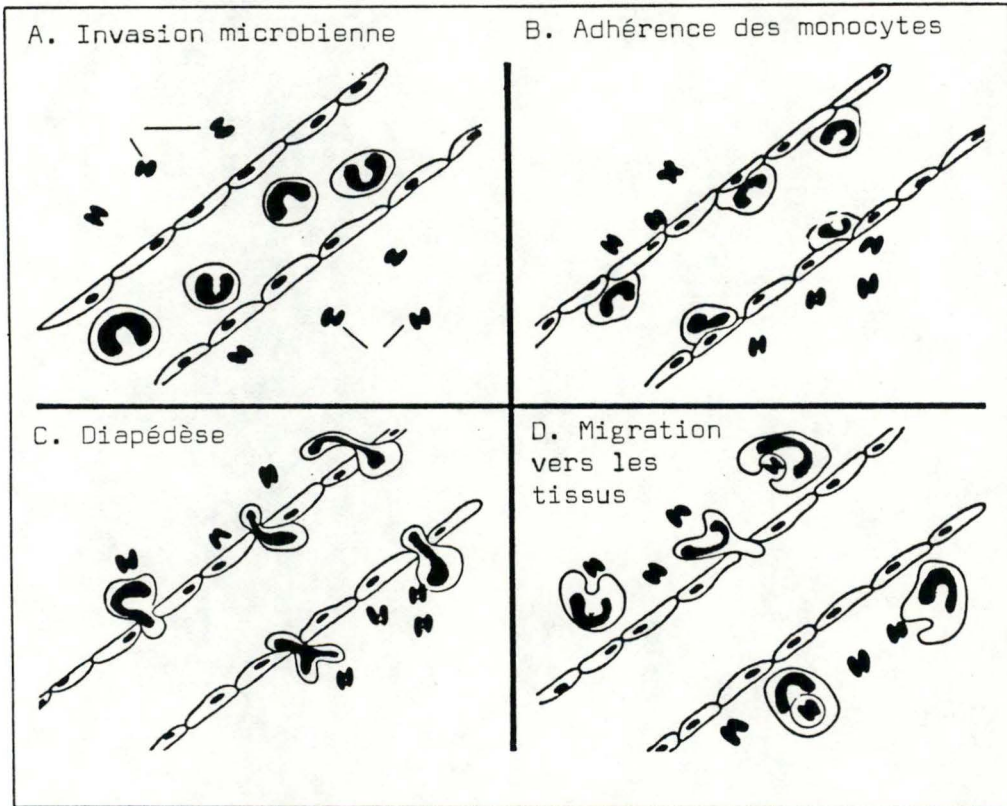


Fig. 2. Migration de monocytes sanguins vers les tissus où s'installe une inflammation.

1.3. Morphologie.

La cellule macrophagique dérive des cellules précurseurs de la moelle osseuse. La différenciation de la cellule précurseur en macrophage tissulaire s'effectue en plusieurs étapes caractérisées par des changements morphologiques.

La première cellule que l'on peut décrire est le monoblaste.

Il est d'une taille relativement grande et présente une chromatine non condensée.

Le promonocyte qui mesure 12 à 18 microns (Lasser, 1984) garde la forme ronde du monoblaste et des cellules souches de la moelle osseuse. Le volume nucléaire est plus important que le volume cytoplasmique. Cette abondance en DNA est mise en rapport avec la division active de la cellule. Les organites présents dans le cytoplasme sont par exemple : des mitochondries, des ribosomes, du reticulum endoplasmique granulaire, un appareil de Golgi.

Le monocyte sanguin, quant à lui, est une petite cellule de 12 à 15 microns de diamètre (Weiss, 1972). Il possède un noyau réniforme avec une chromatine finement texturée. Le noyau et le cytoplasme sont d'égale importance. Le monocyte est nettement moins capable de synthétiser du DNA que le promonocyte. Il ne se divise pas. Son cytoplasme contient un peu de lysosomes et le Golgi bien développé est présent dans l'échancrure nucléaire. Sa membrane plasmique, tout comme celle du promonocyte, présente des microvillosités.

La taille du macrophage varie entre 15 et 20 microns (Weiss, 1972).

Le volume cytoplasmique a considérablement augmenté. Le noyau est vésiculeux et présente souvent des nucléoles proéminents. L'aspect réniforme observé chez le monocyte est conservé. Une autre caractéristique morphologique importante du macrophage est de développer des lamellipodes (Rabinovitch, 1973). Le cytoplasme contient de nombreux organites.

1.4. Fonctions.

Comme il a déjà été signalé précédemment, la fonction première des cellules phagocytaires est d'endocyter du matériel extracellulaire. Pour cette raison, elles possèdent notamment des récepteurs membranaires spécifiques.

Elles ont également la capacité de sécréter une variété de molécules bioactives telles que des enzymes ou des substances médiatrices. En effet, celles-ci attribueraient au macrophage un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire.

1.4.1. La phagocytose.

Ce processus fondamental représente un des mécanismes les plus efficaces de la défense de l'hôte contre des infections bactériennes ou contre une invasion de particules inorganiques. Il consomme de l'énergie; une partie de cette énergie sert à fabriquer des lipides pour constituer des nouvelles membranes (surface cellulaire et vacuoles de phagocytose) (Weiss, 1972).

L'activité antibactérienne des macrophages peut se décomposer en trois étapes :

1) L'adhérence de la particule à la membrane plasmique du macrophage.

2) L'ingestion de la particule par des replis membranaires aboutissant à la formation d'une vacuole ou phagosome.

3) La fusion des lysosomes avec des phagosomes pour constituer des phagolysosomes ou vacuoles digestives. A ce stade, beaucoup de possibilités peuvent se présenter : la destruction de la bactérie ou sa résistance à l'action des enzymes hydrolytiques; dans certains cas, la bactérie se multiplie au sein du cytoplasme de la cellule macrophagique, lorsque celle-ci est infectée, par exemple, par des mycobactéries.

Une bactérie résistante est due par exemple à sa structure particulière inhibant ainsi une étape de la phagocytose (cfr Nature du matériel ingéré.). Une quantité insuffisante d'enzymes synthétisés par le macrophage face à un afflux important de bactéries dans le milieu est une autre explication. Pour plusieurs raisons, le macrophage peut présenter une déficience au niveau de son métabolisme. Aussi, il existe du matériel facile à digérer et du matériel plus

indigeste; c'est le cas des particules de silice (cfr Le système des macrophages alvéolaires.).

1.4.1.1. Phase d'adhérence.

La première étape dans la phagocytose est un contact de la membrane plasmique du phagocyte avec le matériel destiné à être ingéré. Afin que ce contact s'établisse, la cellule macrophagique doit nécessairement migrer vers le foyer infectieux. Cette migration peut s'effectuer par chimiotactisme.

La liaison s'établit sous l'influence de divers facteurs dont les principaux sont les récepteurs distribués sur toute la surface du phagocyte, la nature du matériel à ingérer, l'état du phagocyte et les conditions extracellulaires.

a) Récepteurs membranaires du phagocyte :

La cellule macrophagique est capable de modifier son environnement grâce à des récepteurs membranaires (Hunninghake et al., 1979).

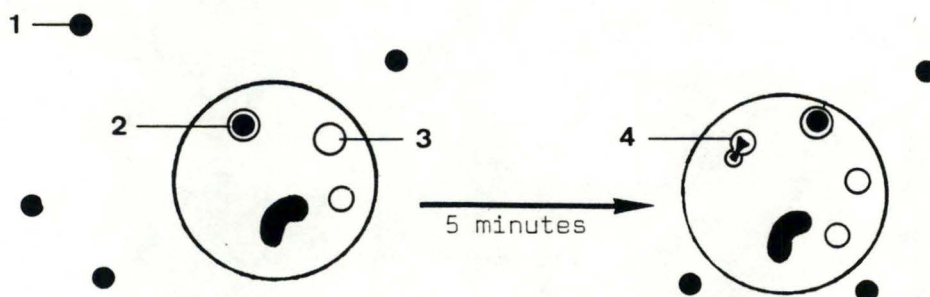
Lorsque les processus de la phagocytose n'impliquent pas la présence de récepteurs, nous parlons de phagocytose non spécifique ou "fluide"; c'est le cas de la phagocytose de billes de latex. Si des récepteurs interviennent, la phagocytose est spécifique ou adsorptive.

Les macrophages possèdent notamment des récepteurs pour des composants du complément et pour le fragment Fc des immunoglobulines.

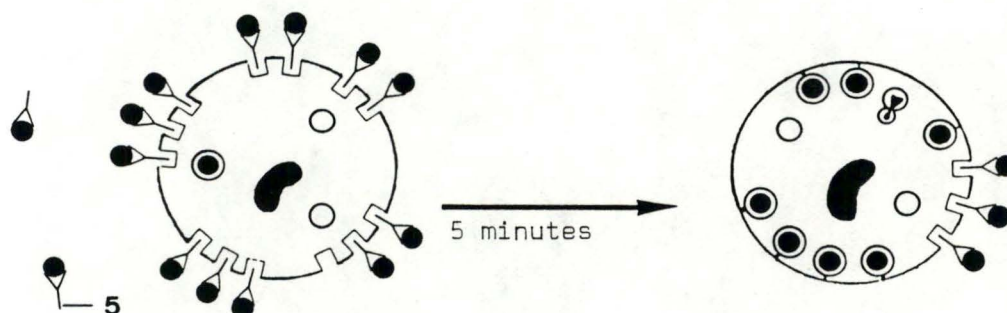
Si la substance étrangère est recouverte d'IgG, le taux de liaison entre cette substance et le macrophage augmente. Les particules organiques sont donc préparées pour être ingérées par des phagocytes. Ce processus s'appelle l'opsonisation (Fig.3).

Le rapport existant entre le phagocyte et sa particule à ingérer est identique à celui d'un récepteur vis-à-vis de son ligand. Le ligand est appelé opsonine. Il est "le condiment qui rend l'antigène appétissant au macrophage". Cette production d'opsonines est induite par une réaction immunitaire de type humoral : des lymphocytes B, possédant à leur surface membranaire des récepteurs pour des antigènes, sont stimulés à produire des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène (Fig.4) (Braun, 1983).

Phagocytose en absence d'anticorps.



Phagocytose en présence d'anticorps.



1 : particule antigénique

2 : phagosome

3 : lysosome

4 : phagolysosome

5 : IgG (immunoglobuline)

Fig. 3. L'opsonisation augmente le nombre de particules antigéniques liées à la membrane du macrophage mais elle n'augmente pas la vitesse du processus (Hood et al., 1978).

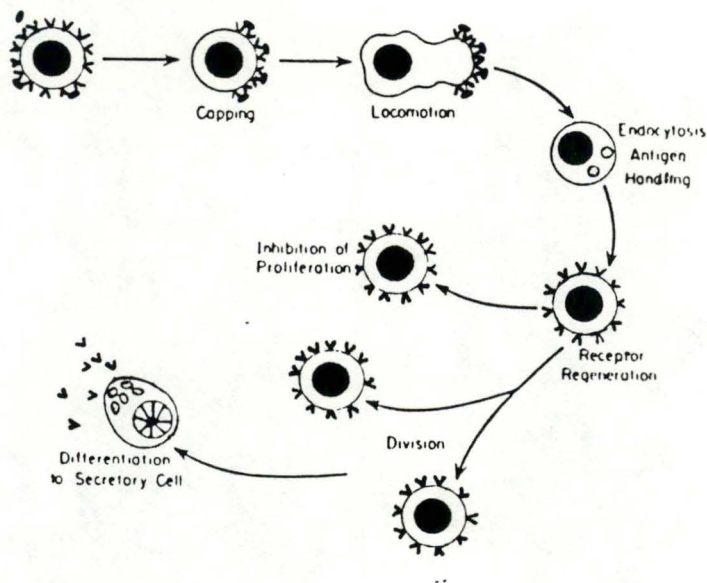


Fig. 4. Séquence temporelle d'une activation d'un lymphocyte suite à une stimulation via des immunoglobulines recouvrant la surface cellulaire (Braun, 1983).

La microscopie électronique a permis d'observer l'existence de "coated pits" et de "coated vesicles" (Fig.5).

Ces deux termes sont utilisés pour parler de vésicules ou de membranes dont les surfaces cytoplasmiques sont recouvertes d'un réseau de protéines d'aspect pentagonal et hexagonal (Ungewickell et Branton, 1982).

La phagocytose induit des épaisissements membranaires localisés. Ce sont les coated pits. Leur internalisation donne des coated vesicles composées d'une matrice de clathrine qui est un polypeptide trimérique. Pearse (1975) fut le premier à isoler des coated vesicles.

Les constituants des "coated membranes" doivent répondre à trois impératifs :

- 1) reconnaître directement ou indirectement des macromolécules spécifiques dans la membrane et interagir avec elles;
- 2) permettre l'invagination des coated pits avec la formation éventuelle de coated vesicles;
- 3) en certains endroits, se dissocier de la membrane, ou du moins, libérer les macromolécules transportées.

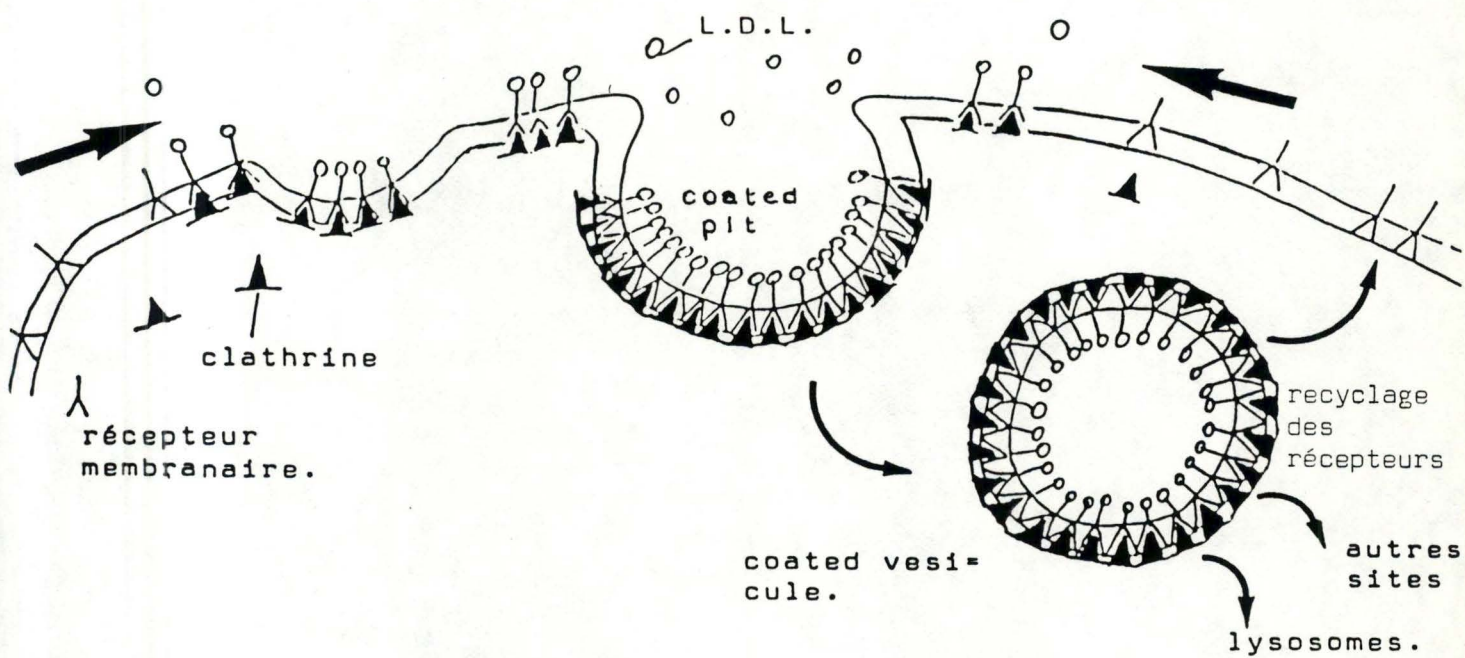


Fig. 5. Système des "coated-pits" et des "coated vesicles".

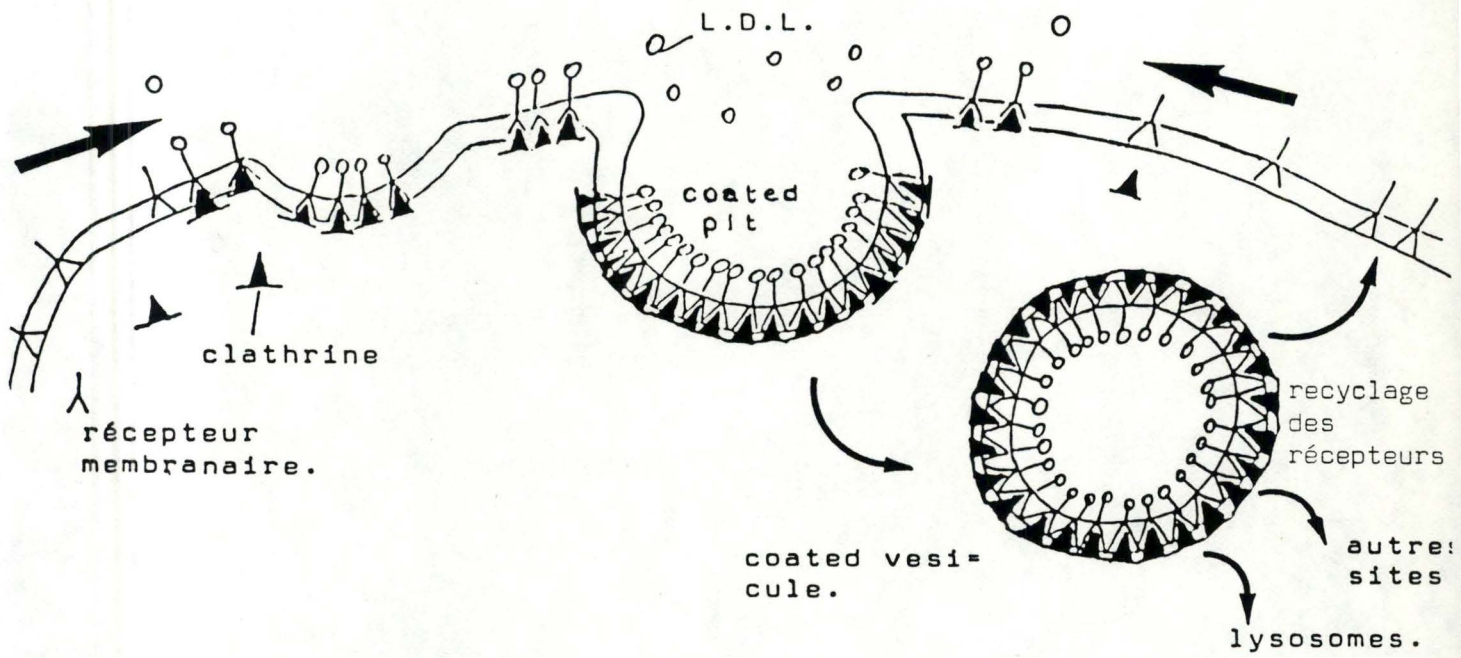


Fig. 5. Système des "coated-pits" et des "coated vesicles".

Cette première étape d'adsorption déclenche non seulement la redistribution des récepteurs membranaires mais aussi la formation d'un réseau sous-membranaire de microfilaments composés notamment de polymères d'actine et de myosine qui vont ancrer et relier entre eux l'ensemble des récepteurs liés à leur ligand (Fig.6).

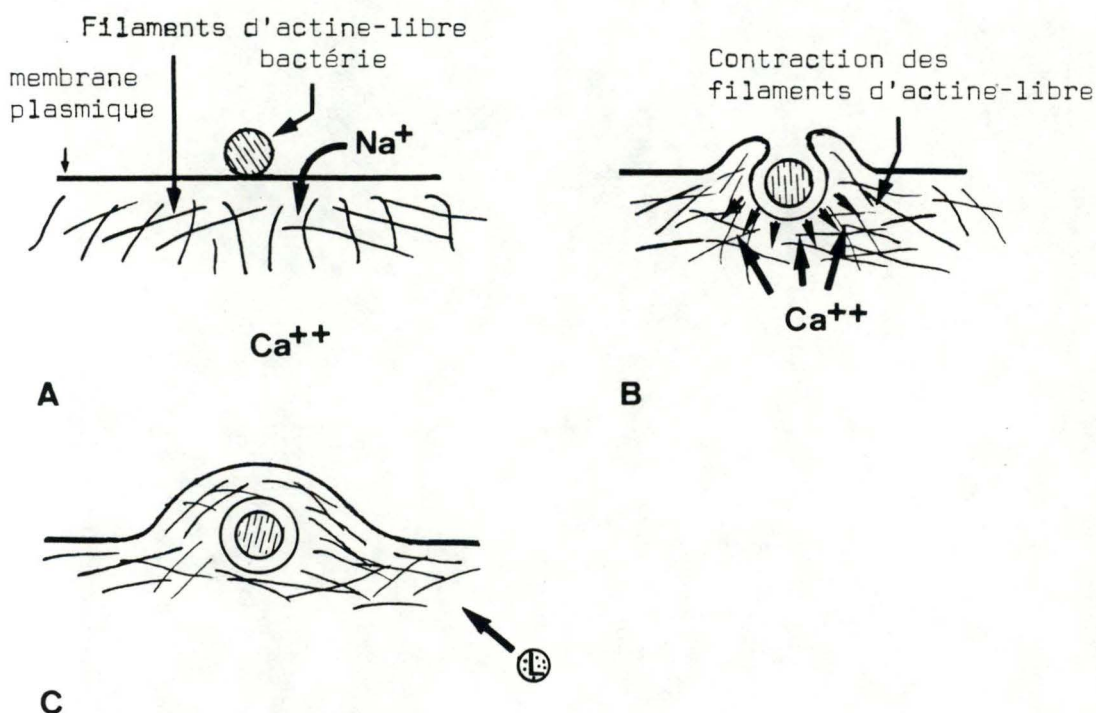


Fig. 6. Rôle des microfilaments dans l'endocytose (Maillet, 1975).

- A : l'adhésivité de la membrane plasmique et de la bactérie immobilise les protéines membranaires. Le Na^+ pénètre en plus grande quantité dans la cellule;
- B : l'onde de dépolarisation crée libère le Ca^{++} (du réticulum endoplasmique) nécessaire à la combinaison actine-myosine;
- C : les lysosomes (**L**) se dirigent vers la vacuole et y libèrent leur contenu.

Remarque sur l'influence des récepteurs (Adams, 1982) :

Les récepteurs membranaires modulent le développement et l'activation des macrophages : un facteur déclenche, via un récepteur, la différenciation de la cellule macrophagique immature.

Ces récepteurs affectent donc les fonctions du macrophage telles que la pinocytose, la phagocytose, le chimiotactisme et la sécrétion.

Ce contrôle de la fonction macrophagique peut aussi bien résider dans les altérations du nombre de récepteurs que dans l'affinité avec le ligand. En effet, une nouvelle hypothèse serait celle d'un changement de la fonction du récepteur : le récepteur pour des peptides chimiotactiques, par exemple, dans un état de petite affinité, induit la sécrétion d'enzymes lysosomales et d'anions superoxydes; par contre, l'engagement du récepteur dans une haute affinité induirait le chimiotactisme.

b) Nature du matériel ingéré :

Le matériel phagocyté a un caractère chimique spécifique qui influence, de ce fait, le mécanisme d'adsorption. Par exemple, la fumée de cigarette inhibe la phagocytose (Hinman, 1980 cité par Lasser, 1984; Green et Cordin, 1967 cités par Voisin et al., 1985). Certains micro-organismes inhibent également la phagocytose : par exemple, le pneumocoque (bactérie Gram +) possède un polysaccharide capsulaire responsable de cette inhibition.

c) Etat du phagocyte :

L'efficacité de la phagocytose augmente avec l'âge du phagocyte (Bowden, 1984; Perkins, 1971 cité par Lasser, 1984). Cette efficacité résulte d'une quantité plus élevée d'enzymes lysosomales synthétisés par le macrophage (Hendrik, 1972 cité par Lasser, 1984). Lorsque le macrophage est activé, il voit son métabolisme augmenter; beaucoup d'ATP est produit, qui, en présence d'ions Mg^{++} transforme la morphologie du phagocyte : celui-ci passe de la forme ronde à la forme amiboïde (Norberg, 1971 cité par Braun, 1983). La capacité d'adsorption en est ainsi augmentée.

d) Conditions extracellulaires :

Le processus d'adsorption est optimal lorsqu'il a lieu à une température analogue à celle de l'organisme d'où sont issues les cellules macrophagiques.

Les ions Ca^{++} et Mg^{++} influencent l'activité contractile du phagocyte : la concentration calcique dans le cytoplasme conditionne localement la contractilité qui entraîne la redistribution de microfilaments et récepteurs qui y sont attachés, caractéristiques du processus de "capping" (Braun, 1983).

1.4.1.2. Phase d'ingestion.

Le matériel attaché à la surface cellulaire est internalisé suite au développement d'un pseudopode (par invagination membranaire) (Fig.7). La vacuole formée demeure dans un premier temps en continuité avec la membrane plasmique du macrophage; par la suite, grâce à des phénomènes de contraction impliquant notamment des filaments d'actine et de myosine, la vacuole est propulsée vers l'intérieur de la cellule (Lasser, 1984). Cette vacuole à l'état libre dans le cytoplasme est appelée phagosome.

En fait, il y aurait une déformation de la surface cellulaire en lamellipodes qui se déplaceraient progressivement le long des parois de la particule (Fig.8). En cas d'opsonisation complète, les lamellipodes cerneraient complètement la particule, fusionneraient et l'ingéreraient (Griffin et al., 1975 cités par Vray, 1984).

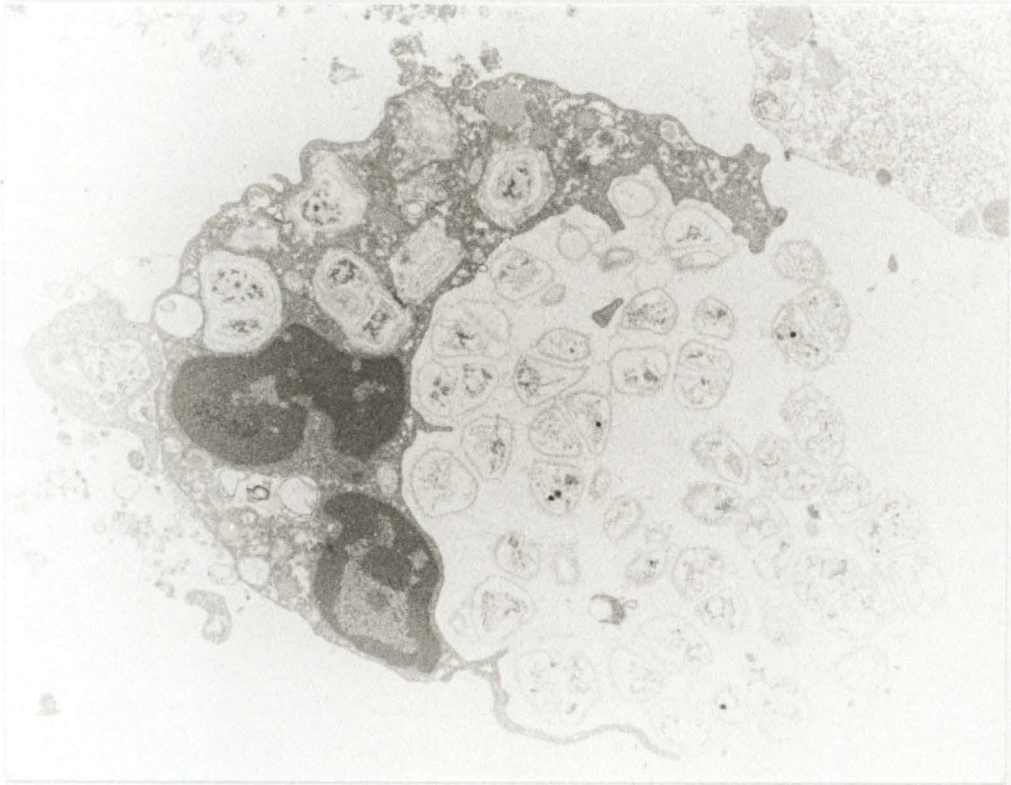


Fig. 7. Phase d'ingestion de microcoques (*Micrococcus lysodeikticus*) par un macrophage alvéolaire humain. (Gross.8835)

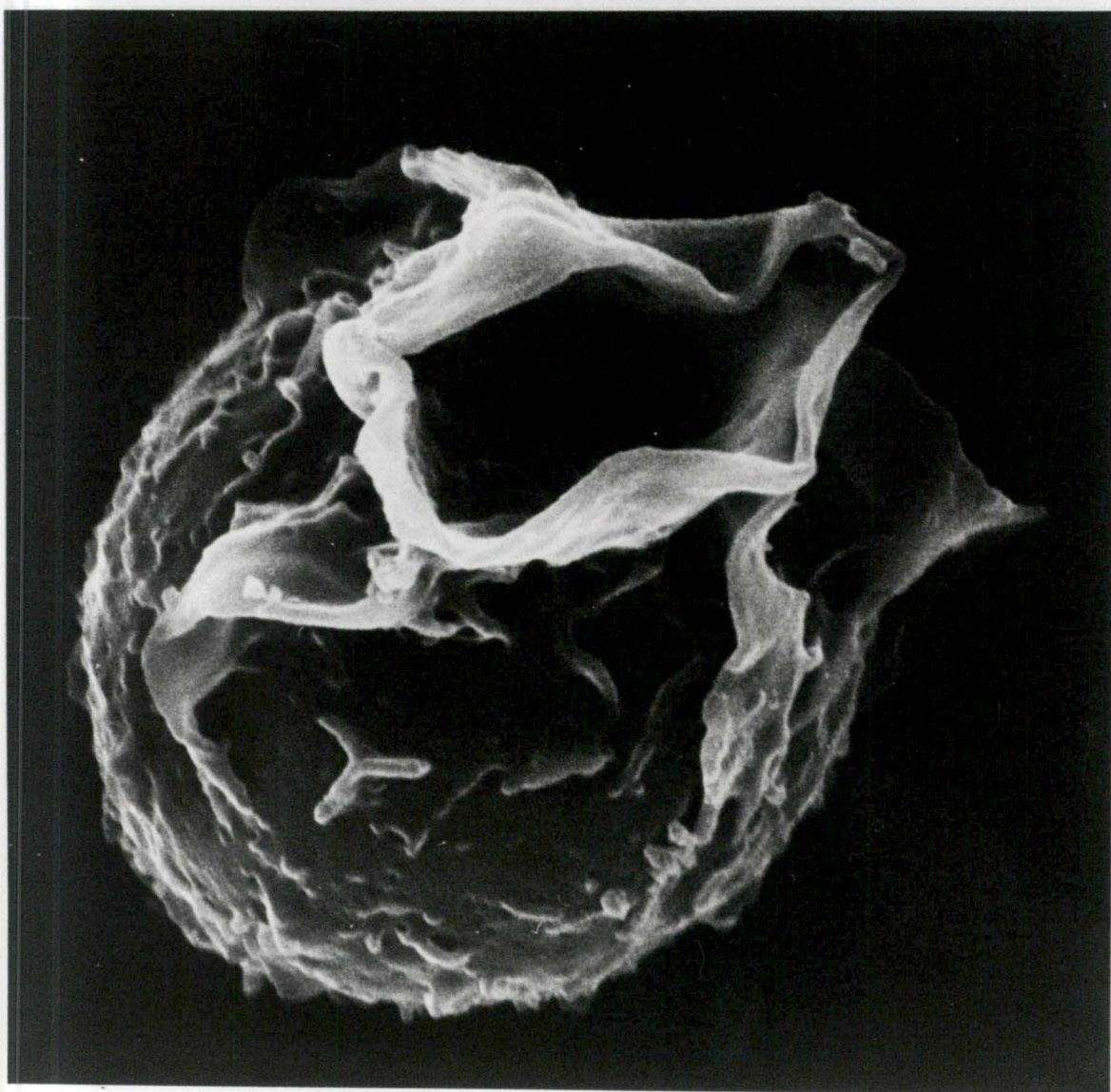


Fig. 8. Macrophage alvéolaire de rat développant des lamellipodes qui se réunissent pour former une sorte de capuchon à un pôle de la cellule.(Gross.9400)

1.4.1.3. Phase de digestion.

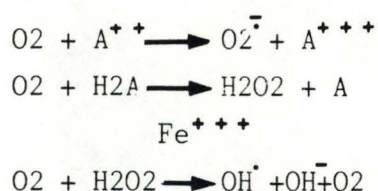
La quantité et la qualité du matériel phagocyté, ainsi que l'état de la cellule phagocytaire constituent des facteurs déterminants dans cette étape de la phagocytose.

En général, la vacuole phagocytaire ou phagosome fusionne avec un lysosome primaire, organe néoformé qui n'est pas encore intervenu dans les phénomènes de dégradation. Les hydrolases du lysosome primaire se déversent dans le phagosome pour former un phagolysosome ou lysosome secondaire (Maillet, 1975). Il en résulte une dégradation enzymatique du matériel ingéré. En même temps, le macrophage produit une variété d'enzymes protéolytiques dont l'élastase et la collagénase (Bowden, 1984). Nous constatons également une production augmentée de radicaux libres, principalement des anions superoxydes (Johnson et al., 1978 cités par Lasser, 1984) et autres métabolites oxygénés toxiques comme le peroxyde d'hydrogène (Fig.9).

Des mécanismes généraux concernant la production des composés toxiques engendrés par la réduction de la molécule d'oxygène sont proposés dans la figure 10.

O_2^-	anion superoxyde
HO_2^{\cdot}	radical hydroperoxyde
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
OH^{\cdot}	radical hydroxyle
O_2^*	oxygène singulet

Fig. 9. Produits toxiques engendrés par la réduction de l'oxygène moléculaire (Prakasch, 1984).



(A = variété de donneurs d'électron)

Fig. 10. Mécanismes généraux quant à la production de composés oxygénés toxiques (Prakasch, 1984).

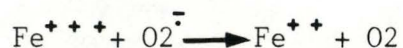


Fig. 11. Réaction de lipoperoxydation engendré par l'anion superoxyde (Debry et al., 1985).

L'anion superoxyde, en réduisant certains métaux, favorise la réaction de lipoperoxydation (Fig.11). Les membranes biologiques sont constituées notamment d'une double couche de phospholipides; ceux-ci comprennent des acides gras polyinsaturés et peuvent subir une peroxydation. La lipoperoxydation induit une désorganisation des membranes cellulaires, aboutissant à la mort de la cellule.

Physiologiquement, les cellules possèdent des systèmes qui les défendent contre les radicaux libres. Des mécanismes enzymatiques peuvent intervenir : par exemple, une enzyme, la superoxyde dismutase, se charge d'éliminer du milieu l'anion superoxyde.

Certains micro-organismes inhibent indirectement l'étape de la digestion. Le bacille de Koch, par exemple, est un agent pathogène très résistant responsable de la tuberculose, qui persiste au sein du cytoplasme de la cellule macrophagique. Cette sorte de symbiose temporaire fait apparaître des cellules géantes multinucléées formées par la fusion de plusieurs macrophages (Haumont, 1976).

1.4.2. Sécrétion d'enzymes.

Suite à une phagocytose, la cellule macrophagique sécrète une variété d'enzymes, incluant des protéases neutres comme la collagénase (Werb and Gordon, 1975, Mainardi et al., 1980 cités par Werb, 1983) et l'élastase (Werb and Gordon, 1975, Banda and Werb, 1981, Werb et al., 1982 cités par Werb, 1983) et des inhibiteurs d'enzymes.

L'élastase dégrade l'élastine. La collagénase dégrade spécifiquement les fibres de collagène (type I et III) des tissus conjonctifs (Werb and Gordon, 1975; Horwitz et al., 1976 cités par Werb, 1983).

L' α 2-macroglobuline est un inhibiteur de toutes les enzymes protéolytiques (Werb et al., 1980 cités par Werb, 1983).

Une autre variété d'enzymes est sécrétée indépendamment des processus inflammatoires et immuns; cette catégorie comprend les phosphatases acides (Martin, 1973 cité par Hunninghake et al., 1979), une β glucuronidase (Hocking and Golde, 1979 cités par Lasser, 1984), des estérases (Harris et al., 1975, Janoff et al., 1971 cités par Hunninghake, 1979) et du lysozyme (Hocking and Golde, 1979 cités par Lasser, 1984). Celui-ci est sécrété continuellement mais son taux s'élève lorsque le phagocyte est sollicité par un agent infectieux.

Le lysozyme est une enzyme bactériolytique qui s'attaque au niveau du peptidoglycane de la paroi bactérienne; il réalise spécifiquement l'hydrolyse des liaisons entre les monomères N-acétyl muramique et N-acétyl glucosamine. Un taux élevé de cette muramidase est observé pendant des périodes de résistance accrue aux infections, par exemple après une administration de BCG à des souris (Capuccino et al., 1964 cités par Lasser, 1984).

1.4.3. Sécrétion de médiateurs.

La sécrétion d'une variété de médiateurs solubles est une fonction bien décrite des phagocytes mononucléés.

La cellule macrophagique est capable de sécréter un facteur activant les lymphocytes (LAF). Ce facteur agit comme un principe mitogénique pour ces cellules lymphocytaires (Lasser, 1984).

Un autre facteur libéré par le macrophage a la propriété d'activer les plaquettes sanguines (Benveniste et al., 1979 cités par Hunninghake et

al., 1979); il induit celles-ci à libérer leurs médiateurs (Henson, 1970 cité par Hunninghake et al., 1979).

Les phagocytes synthétisent également des substances qui stimulent la croissance des fibroblastes (Leibovich, 1978 cité par Lasser, 1984) et jouent un rôle dans la réparation tissulaire du site inflammatoire.

Les cellules monocytaires et macrophagiques auraient un rôle dans l'érythropoïèse (Pesch et al., 1976 cités par Lasser, 1984) en sécrétant de l'érythropoïétine. Elles synthétisent aussi l'interféron, une substance antivirale dont la quantité sécrétée augmente de façon significative lorsque le macrophage est activé (Smith and Wagner, 1967 cités par Lasser, 1984).

Les phagocytes mononucléés synthétisent des facteurs dérivés du complément : certainement les fragments C2 et C4, et probablement aussi les fragments C1q, C3 et C5 (Colten and Einstein, 1976 cités par Hunninghake et al., 1979).

Le complément est un ensemble de 11 protéines qui interviennent dans de très nombreux processus de l'inflammation et de la défense contre des agents infectieux. Ces molécules s'activent en cascade (comme le font les protéines de la coagulation) sous l'influence de stimuli extrêmement divers (Fig.12).

Cette chaîne de réactions comprend trois phases : une phase de reconnaissance (C1), une phase d'activation (C2, C3, C4) et une phase de lyse (C5 C9).

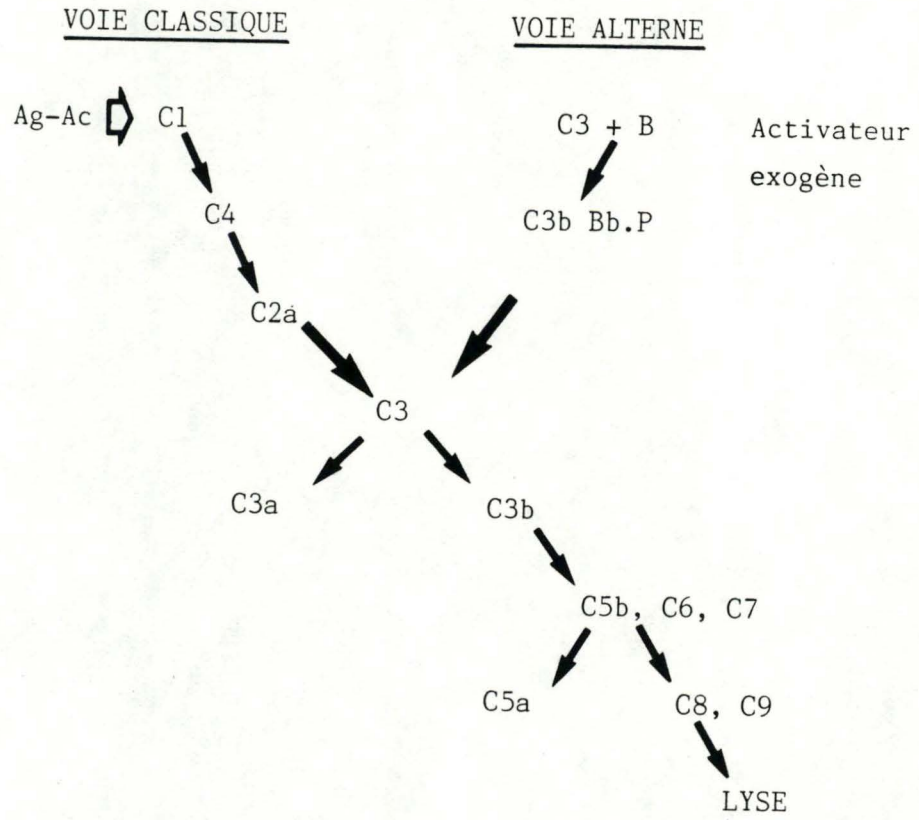


Fig. 12. Le système du complément et ses deux voies d'activation (Depelchin, 1983).

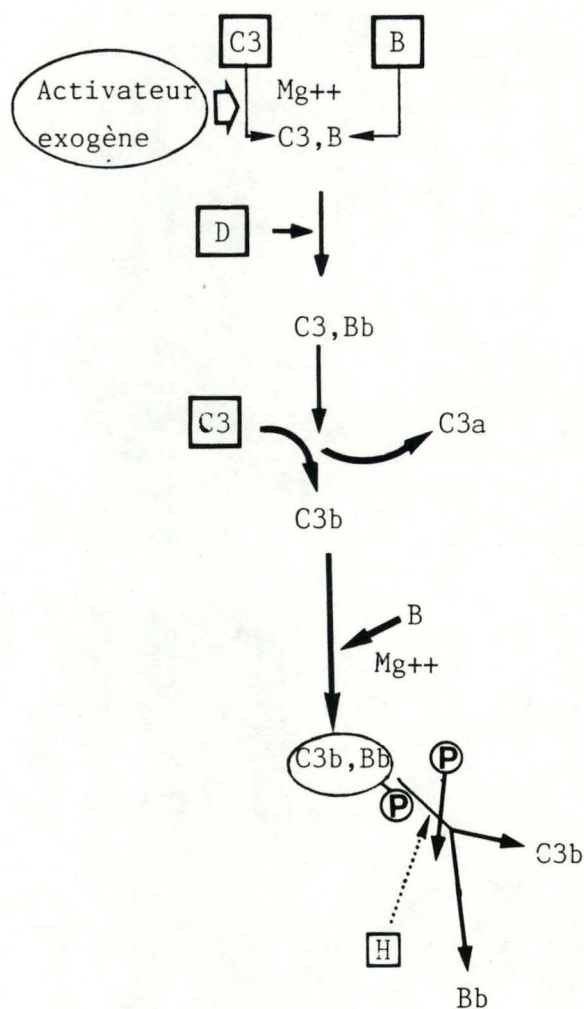


Fig. 13. Activation de la voie alterne et stabilisation par la properdine (Depelchin, 1983).

La voie classique est activée par des anticorps (Ac) liés à leurs antigènes (Ag). Ces anticorps fixateurs du complément sont des IgM et certains IgG (1, 2, 3).

La voie alterne ne nécessite pas la présence d'anticorps mais des facteurs exogènes.

Ces deux voies différentes aboutissent toutes deux à l'activation d'un même composant majeur du complément, la fraction C3. Celui-ci est la pièce centrale de l'édifice.

Activation de la voie classique :

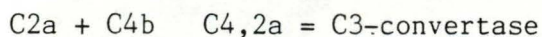
1) La fraction C1 du complément est formée de trois protéines : Clq,Clr et Cls. Le Clq est activé par sa fixation sur un complexe Ag-Ac. Cette activation provoque l'activation de Clr qui active à son tour le

C1s.

2) Le C1s engendre l'activation du C4 en lui retirant une séquence d'acides aminés (C4b).

3) Le C1s active également le C2 (C2a).

Les fragments C4a et C2b participent à la réaction inflammatoire par leur activité "Kinin-like" (activité vasodilatatrice).



4) La C3-convertase est un complexe qui possède une activité protéolytique sur C3. Sous son action, le fragment C3 est clivé en C3a et C3b.

Activation de la voie alterne et stabilisation par la properdine (P) (Fig.13) :

Un facteur B activé (Bb) se combine avec le fragment C3. L'activation du facteur B provient du clivage de ce même facteur par un facteur D. Le fragment C3Bb active le fragment C3 en C3a et C3b. Le fragment C3b, possédant un site hydrophobe, peut se fixer sur les surfaces cellulaires ou bactériennes. Le facteur B, en se liant à lui et en subissant l'action du facteur D, forme un complexe C3b.Bb sur la surface. L'ion Mg^{++} est indispensable à la formation de ce complexe. Cependant ce complexe est peu stable et se défait facilement. Il est inactivé par un facteur H qui déplace le fragment Bb du complexe. Un autre facteur, la properdine (P), stabilise le complexe en se fixant sur lui car il le rend insensible au facteur H.

Le fragment C3a a des propriétés chimiotactiques pour les polymorphonucléaires neutrophiles et des propriétés anaphylatoxiques (vasodilatation généralisée due à une libération d'histamine par les cellules mastocytaires). Quant au fragment C3b, il va permettre la poursuite de la cascade d'activation en activant, par clivage, le fragment C5 donnant naissance aux fragments C5a et C5b. Le fragment C5a a les mêmes propriétés que le fragment C3a et le fragment C5b active d'autres protéines pour aboutir enfin à la lyse bactérienne.

1.4.4. Régulation de la réponse immunitaire.

Il est évident que le système des phagocytes mononucléés possède des cellules qui interviennent dans la réponse immunitaire. Cette participation cellulaire réside dans leur aptitude à présenter l'antigène aux lymphocytes (Nelson, 1976 cité par Hunninghake et al., 1979).

Il y a une étroite interdépendance entre des macrophages et des lymphocytes. Pour qu'un lymphocyte T soit stimulé, un macrophage doit avant tout s'accaparer de l'antigène et le présenter à la cellule T. D'un autre côté, pour que ce macrophage développe une capacité optimale dans la maîtrise des micro-organismes et des tumeurs, il doit d'abord être activé. Cette activation résulte de son interaction avec des lymphokines qui sont des produits libérés par des lymphocytes T stimulés (Rocklin et al., 1980 cités par Lasser, 1984).

L'interaction entre le macrophage et la cellule T comprendrait donc deux étapes : la première serait une étape d'induction durant laquelle un antigène interagit avec des macrophages, aboutissant à une stimulation du lymphocyte; lors de la seconde étape, le macrophage serait activé et manifesterait ainsi ses effets bactériostatiques et cytotoxiques.

Il y aurait également des interactions entre des lymphocytes T et des lymphocytes B au moment de l'induction. Le fruit de ces interactions consisterait en une production d'anticorps par les lymphocytes B.

1.5. Le poumon.

1.5.1. Descriptions anatomique, histologique et fonctionnelle.

Le poumon est un viscère pair, situé dans le thorax et entouré de la plèvre. Il est d'une constitution molle et très déformable.

Il est le principal organe de l'appareil respiratoire ou appareil broncho-pulmonaire dont la disposition architecturale générale peut être considérée de deux façons : la première a une base fonctionnelle (Policard et Galy, 1970).

L'"arbre aérien" développe ses ramifications à partir de la glotte. Après la trachée et les bronches souches, situées en dehors des lobes pulmonaires, viennent les bronches intrasegmentaires, grosses, moyennes et petites; ces voies aériennes sont situées en dehors des lobules pulmonaires. Le lobule peut être considéré comme l'unité anatomique constitutive du poumon. Celui-ci apparaît alors formé par un ensemble de lobules juxtaposés.

Au-delà viennent les bronchioles logées dans le lobule (Fig.14).

Les premières bronchioles, dites terminales, possèdent un épithélium continu. Celui-ci devient discontinu vers la vingtième génération de ces mêmes bronchioles terminales. Des alvéoles se développent de place en place sur la paroi broncho-alvéolaire; ce sont les bronchioles respiratoires. Lorsque l'épithélium a complètement disparu, la bronchiole respiratoire est devenue le canal alvéolaire entièrement garni d'alvéoles.

Cet ensemble de bronchioles et d'alvéoles forme le lobule pulmonaire, unité histologique du poumon.

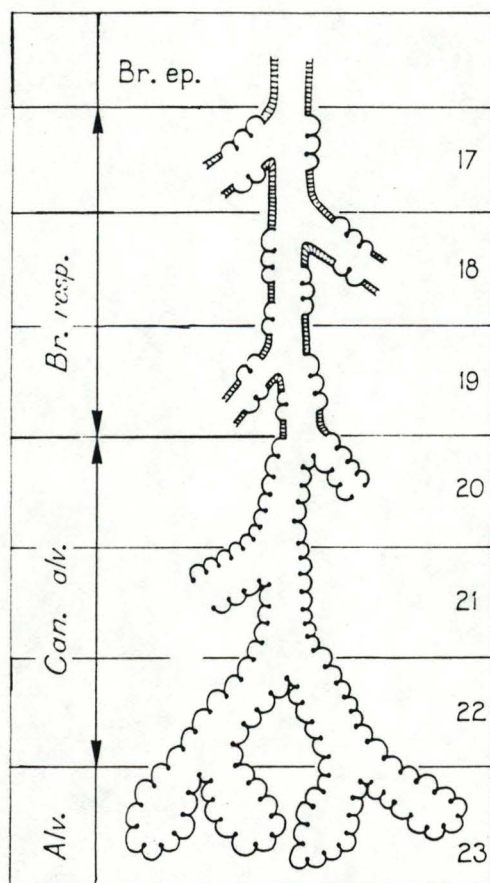


Fig. 14. Schéma des dernières générations bronchiques
(de la 17 à la 23) (Policard et Galy, 1970).

Br. ép. : bronchiole entièrement épithélialisée
(bronchiole terminale).

Br. resp. : bronchiole respiratoire.

Can. alv. : canal alvéolaire.

Alv. : alvéoles.

L'architecture fonctionnelle de l'appareil broncho-pulmonaire est une conception plus actuelle.

Elle permet de mieux comprendre le fonctionnement normal ou anormal de l'appareil respiratoire.

Le centre fonctionnel du poumon est la membrane air-sang, lieu de l'échange des gaz. La paroi alvéolaire est en effet une véritable membrane biologique. Un équilibre entre la perfusion sanguine des alvéoles, la ventilation et la diffusion des gaz à travers la paroi alvéolaire est essentiel pour l'échange normal de l'oxygène et du dioxyde de carbone. C'est donc au niveau de la membrane que prennent contact les cavités alvéolaires et le réseau capillaire alvéolaire (apportant le sang à épurer).

L'élément structural fondamental du parenchyme pulmonaire est la cloison alvéolaire ou mieux, interalvéolaire. Il n'y a pas en effet une paroi propre à chaque alvéole, mais une paroi commune entre alvéoles voisins.

Chaque cloison interalvéolaire est constituée par une membrane conjonctivo-élastique à laquelle sont fixés les réseaux de capillaires sanguins communs aux deux alvéoles contigus. Un revêtement cellulaire tapisse chaque alvéole (Fig.15).

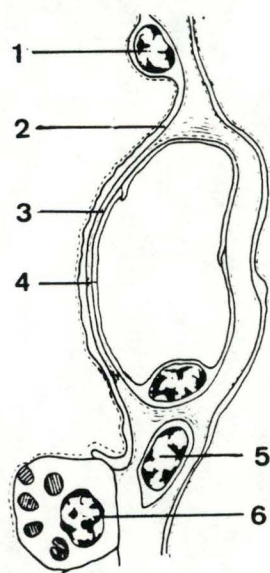


Fig. 15. Schéma de la constitution d'une paroi alvéolaire (Policard et Galy, 1970).

Petite cellule alvéolaire (1) avec son expansion membranause (2); partie conjonctive de la paroi (3); endothélium du capillaire (4); cellule septale (5); grande cellule alvéolaire avec structures lamellaires (6); pointillés : film surfactant.

a) La cloison interalvéolaire.

Elle est constituée par du tissu conjonctif comprenant de la substance fondamentale, un réseau de fines fibrilles de collagène et des formations élastiques (Fig.16). Dans cette substance conjonctive se trouve inclus le réseau des capillaires sanguins. Les cellules propres aux cloisons interalvéolaires sont du type fibroblaste ou du type myoblaste peu différencié.

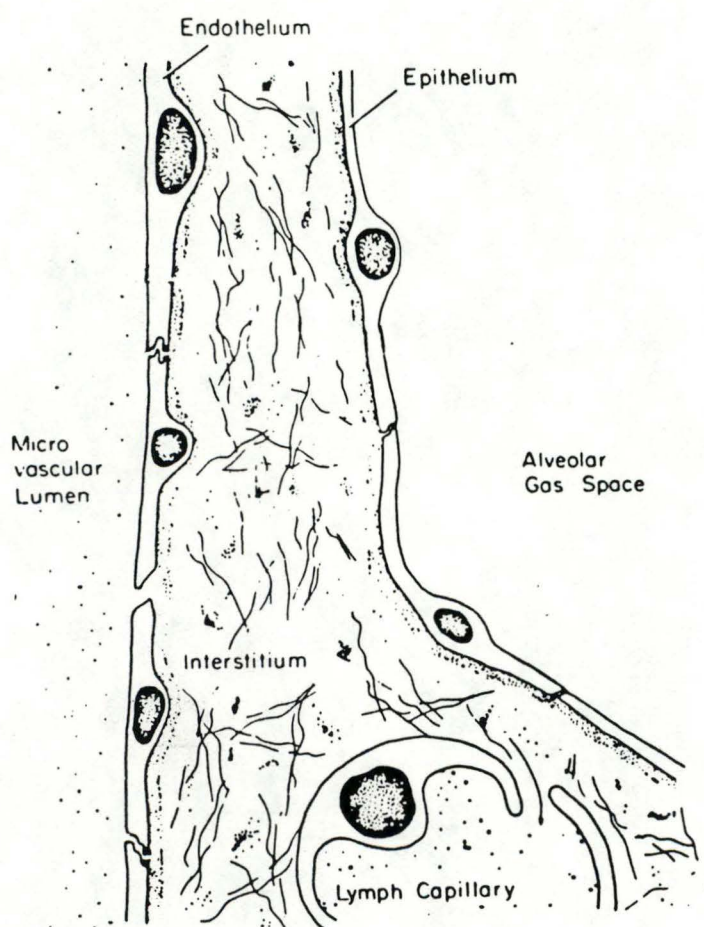


Fig. 16. Cloison interalvéolaire (Demling, 1980).

b) Le réseau capillaire.

Aux cloisons interalvéolaires sont accrochés les réseaux de capillaires sanguins. Ces capillaires font saillie indifféremment vers l'un ou l'autre des alvéoles que sépare la cloison. Ils ne sont jamais nus dans l'alvéole mais toujours recouverts par le mince revêtement cellulaire continu de la surface alvéolaire.

Le réseau de collagène, la composante élastique et les vaisseaux sanguins sont responsables non seulement de l'intégrité structurale mais aussi de l'élasticité du poumon normal (Kilburn, 1970 cité par Ratliff, 1980).

c) Le revêtement épithélial.

A la surface des cloisons alvéolaires s'étend un revêtement cellulaire. Il s'agit d'une extension en voile lamelliforme de certains éléments appelés pneumocytes de type I. Ce sont des cellules pavimenteuses qui sont très similaires en apparence aux cellules endothéliales des capillaires (Bertalanffy, 1965 cité par Ratliff, 1980); elles sont attachées les unes aux autres par des "tight junctions" s'opposant à la fuite de liquides et de protéines vers les alvéoles.

Elles représentent 97 % de la surface alvéolaire.

A côté de celles-ci se trouvent des cellules plus grosses, sans expansions lamellaires; ce sont les pneumocytes granuleux (cellules de type II) (Bensch et al., 1964, Kilburn, 1970 cités par Ratliff, 1980). Elles sont de forme polyédrique et leurs côtés reçoivent les expansions membraneuses des cellules de type I. Elles ont beaucoup de fonctions dont la production du surfactant pulmonaire (Kuhn, 1976, King, 1979 cités par Gail, 1982). L'existence de ce surfactant a été postulée en 1926 par Von Neergaard. Celui-ci soulignait la présence d'un facteur à la surface des alvéoles abaissant la tension superficielle à ce niveau. Le surfactant est un mélange de phospholipides saturés avec une quantité moindre de lipo- et glycoprotéines (Weibel and Gill, 1968 cités par Ratliff, 1980); il a le rôle d'empêcher les alvéoles de se remplir de liquide et de se collaber en abaissant fortement la tension de surface à l'interface

entre l'air alvéolaire et la surface humide des alvéoles (Policard et Galy, 1970).

Ces cellules constituent 3 % de la surface alvéolaire (Hammond, 1980).

Enfin, dans beaucoup de conditions normales ou pathologiques, s'observe à la surface alvéolaire une troisième catégorie de cellules. Ce sont des cellules mononucléées douées de propriétés phagocytaires actives, les macrophages alvéolaires. Comme cette capacité phagocytaire s'exerce souvent sur des poussières inhalées avec l'air respiré, on appelle aussi ces cellules les cellules à poussières (Policard, 1955).

Elles jouent donc un rôle très important dans la défense du poumon vis-à-vis de corps étrangers entraînés avec l'air respiré.

1.5.2. Bref aperçu sur deux groupes de maladies pulmonaires.

A. La fibrose pulmonaire.

Il est difficile de séparer les modifications de la paroi des alvéoles de celles de leur cavité. Dans les alvéolites, les processus pariétaux perturbent le contenu alvéolaire, qui à son tour, retentit sur la paroi.

L'agression de l'épithélium alvéolaire a pu être réalisé chez l'animal par différentes façons : par inhalations avec 15 % de CO₂, ou d'O₂ pur, ou de poussières minérales diverses; les injections intratrachéales furent aussi très utilisées (Policard et Galy, 1970).

Les phénomènes observés sont les suivants : d'abord oedème alvéolaire avec gonflement, vacuolisation et nécrose des cellules alvéolaires.

Ce sont les cellules de type I qui sont les plus susceptibles de se blesser par divers agents (Gail and Lenfant, 1982). Leur nécrose est suivie par la mitose des cellules de type II qui se divisent rapidement (les cellules de type I ne se divisent pas) et se différencient ensuite en cellules de type I. C'est donc grâce aux cellules de type II que la surface alvéolaire est à nouveau comblée.

Contre les parois alvéolaires se déposent des membranes hyalines faites de débris de cellules nécrosées et de protéines, en particulier, de fibrine. Les pneumocytes perdent leurs granulations; les corps lamellaires sont accompagnés par des vacuoles lipidiques. L'altération de la membrane basale joue un rôle important dans

l'évolution des lésions. Si elle est détruite, un véritable ulcère alvéolaire se produit; des histiocytes y apparaissent, puis des cellules fibroblastiques avec apparition de fibrilles de collagène.

De nombreuses affections s'accompagnent de fibrose pulmonaire diffuse dont les connectivites autoimmunes, certaines maladies professionnelles dues aux poussières inorganiques (cfr Le système des macrophages alvéolaires), certaines infections et affections médicamenteuses (Read et al., 1984). En ce qui concerne les réactions pulmonaires suite à l'administration de certains médicaments, nous avons l'exemple des sulfamides. Ces composés peuvent produire différentes formes d'infiltrats pulmonaires interstitiels avec éosinophilie sanguine. Cette réaction s'accompagne habituellement de symptômes tels que la fièvre, la dyspnée et la toux; ceux-ci disparaissent à l'arrêt du traitement (Read et al., 1984).

Hamman et Rich, en 1935, ont été les premiers à décrire un tableau caractérisé par une fibrose pulmonaire rapidement progressive, évoluant en général vers l'insuffisance respiratoire et la mort dans un délai moyen de quatre ans à partir du début des symptômes.

Liebow et Carrington, en 1967, ont classé ces affections fibrosantes d'étiologie connue, selon des critères histopathologiques, en pneumonie interstitielle desquamative (PID) et pneumonie interstitielle classique (PIC). La PID se caractérise par une infiltration cellulaire diffuse, et la PIC par peu d'infiltration et une fibrose plus importante.

Une étude cytologique du liquide de lavage broncho-alvéolaire permet d'établir un diagnostic quant à la nature d'une pneumopathie interstitielle. En général, le pourcentage de lymphocytes du liquide de lavage permet de distinguer deux catégories générales de pneumopathies interstitielles : élévation du nombre de lymphocytes (pneumopathies par hypersensibilité, sarcoïdose), nombre de lymphocytes normal (fibrose pulmonaire idiopathique et fibrose pulmonaire dans le cadre d'une collagénose).

Dans les collagénoses auto-immunes s'accompagnant de fibrose telle que la polyarthrite, les mécanismes immunopathologiques restent obscurs. Cependant, il a été montré que des lapins immunisés avec des antigènes tels que l'albumine sérique bovine, lorsqu'un état d'équilibre relatif antigène-anticorps est atteint, développent des lésions membraneuses et prolifératives au niveau de leurs poumons; ces lésions

s'accompagnent de dépôts tissulaires d'antigènes, d'immunoglobulines de l'hôte, de complément, et de fibrine. Il est possible qu'un processus similaire intervienne au cours de la fibrose interstitielle associée aux maladies humaines à "complexes immuns".

B. L'emphysème pulmonaire.

L'emphysème est une maladie de la paroi alvéolaire à évolution atrophique et destructrice.

La lésion fondamentale de l'emphysème est une atrophie de la paroi alvéolaire. Celle-ci s'accompagne de la destruction des dispositifs de résistance constitués par les capillaires sanguins et le réseau de réticuline.

L'atrophie des parois, leur distension et leur rupture, aboutissent à la formation de cavités aériennes, réduisant beaucoup le champ alvéolaire. La taille de ces cavités s'accroît par destruction progressive des parois (Fig.17).

Le mécanisme exact de ce processus d'amincissement et de rupture des cloisons alvéolaires reste imprécisé.

Une hypothèse intéressante est celle de l'intervention de troubles enzymatiques.

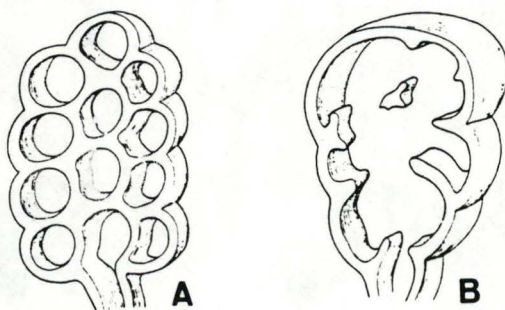


Fig. 17. Schéma (d'après GIESE) montrant la réduction de la surface d'hématose dans une vésicule d'emphysème.

A: Etat normal.

B: Emphysème.

1.6. Le système des macrophages alvéolaires.

Ce système joue un rôle important dans la défense du poumon : il laisse les alvéoles pulmonaires propres et stériles et répond aux exigences du milieu par un afflux de nouvelles cellules dans les sacs aériens.

Le macrophage alvéolaire est un composant essentiel de la chaîne immunologique. Cependant, le phagocyte libre du poumon est à distinguer du macrophage tissulaire : celui-ci est impliqué principalement dans la transformation et le transfert d'antigènes vers des récepteurs lymphocytaires. Le phagocyte libre pulmonaire, quant à lui, est surtout concerné par la phagocytose et la clearance (cfr Clearance pulmonaire). Ainsi, toute particule antigénique inhalée n'a pas la possibilité de traverser la barrière épithéliale et d'atteindre le compartiment interstitiel.

Mais, bien que ce rôle de protection soit dominant chez le macrophage alvéolaire, cette cellule peut participer, directement ou indirectement, à la genèse de maladies pulmonaires chroniques. Ces maladies viennent d'être évoquées; il s'agit de la fibrose interstitielle et de l'emphysème. De telles réponses inappropriées impliquent des interactions avec des cellules fibroblastiques, d'une part, et la sécrétion de protéases par le macrophage, d'autre part.

1.6.1. Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles.

En comparaison avec les autres macrophages, celui qui nous intéresse a un cytoplasme d'aspect plus vacuolaire. Cette observation est à mettre en rapport avec la situation du macrophage alvéolaire : cette cellule est directement exposée aux aléas de l'environnement. Le cytoplasme contient également un nombre élevé de mitochondries, des ribosomes ainsi que du réticulum endoplasmique granulaire et des dictyosomes bien développés. Des enclaves lipidiques sont également présentes. L'hétérogénéité morphologique de ces cellules macrophagiques pulmonaires, obtenues par un lavage broncho-alvéolaire, dépend de leur âge, des phases de leur activité cellulaire et de la quantité de matériaux qui a été phagocytée (Bowden, 1984).

Le macrophage alvéolaire exerce de multiples fonctions dont la principale est de maintenir stérile le tractus respiratoire inférieur (Green, 1980) par la phagocytose de micro-organismes, de débris cellulaires.

Les macrophages alvéolaires possèdent des récepteurs pour les composants C3b et C3d du complément, et pour le fragment Fc des immunoglobulines (Hunninghake et al., 1979). Ces récepteurs favorisent donc le contact entre la cellule macrophagique et sa particule à ingérer.

Le macrophage alvéolaire phagocyte des micro-organismes (bactéries, champignons, virus,...), des particules inertes (poussières, cristaux de silice,...), des débris cellulaires (cellules âgées ou cellules abîmées) et des configurations lamellaires provenant des pneumocytes de type II (Bowden, 1984).

L'énergie requise pour la phagocytose provient, chez le macrophage pulmonaire, de la glycolyse aérobie (Lasser, 1984).

Le macrophage pulmonaire peut phagocyter des agents infectieux ou des agents non infectieux. Lorsqu'il phagocyte des agents infectieux comme par exemple des micro-organismes, il entre dans un état d'activation qui se traduit par une consommation accrue d'oxygène et une utilisation plus rapide du glucose (Hoidal et al., 1979 cités par Hunninghake et al., 1979).

La capacité maximale de cette cellule à libérer de larges quantités de métabolites oxygénés toxiques est observée lorsqu'il est sollicité par des lymphocytes sensibilisés. En général, les neutrophiles et les monocytes en libèrent beaucoup plus (Stossel, 1983).

Le lysozyme est particulièrement abondant dans le macrophage alvéolaire (Hocking and Golde, 1979 cités par Lasser, 1984).

La phagocytose d'agents non infectieux, comme par exemple, celle de poussières inorganiques, provoque une activation générale du macrophage alvéolaire (Brain et al., 1978 cités par Hunninghake et al., 1979). Ces particules peuvent blesser le macrophage et causer éventuellement sa mort. L'accumulation de matériel indigeste ou de micro-organismes peut entraîner des maladies comme la béryllose, la silicose, l'asbestose, les maladies granulomateuses, etc...(Read et al., 1984).

Les produits de sécrétion du macrophage alvéolaire incluent des protéases neutres, une collagénase, une élastase (Condon et Harris,

1975, Levine et al., 1976 cités par Hunninghake et al., 1980) et des inhibiteurs d'enzymes.

Cette sécrétion inclut également des enzymes qui n'ont pas de relation avec des processus inflammatoires et immuns au niveau pulmonaire; il s'agit des phosphatases acides, d'une β -glucuronidase (Hocking and Golde, 1979 cités par Lasser, 1984), etc...

Les structures alvéolaires sont raisonnablement bien protégées contre une attaque protéolytique : une antiprotéinase, l' α 1-antiprotéinase, est trouvée dans le macrophage alvéolaire humain (Godek et al., observations non publiées cités par Hunninghake et al., 1979). Il est important de noter, cependant, que malgré une quantité importante de cette antiprotéinase dans le poumon, elle n'assure pas une protection complète des structures alvéolaires. Des études récentes suggèrent que l' α 1-antiprotéinase inhibe l'élastase sécrétée par le neutrophile (Ohlsson and Olsson, 1974 cités par Hunninghake et al., 1979). Cependant, l'antiprotéinase n'inhibe pas l'élastase libérée par le macrophage alvéolaire (White et al., 1977 cités par Hunninghake et al., 1979).

La sécrétion de médiateurs est peu connue chez le macrophage alvéolaire, mais il est probable que ces cellules possèdent des capacités similaires.

Arton et Myrvik ont montré, en 1966, que des macrophages alvéolaires de lapin auxquels on a inoculé in vitro un virus du genre Parainfluenza produisent un inhibiteur du virus ayant des propriétés analogues à celles de l'interferon. La sécrétion de cet inhibiteur empêcherait la réplication des virus infectant le tractus respiratoire inférieur. Des macrophages alvéolaires de lapin sont également capables de sécréter un facteur activant les lymphocytes (LAF) après une stimulation in vitro (Ulrich, 1977 cité par Hunninghake et al., 1980). La production de ce facteur peut être un mécanisme important qui impliquerait l'interaction des macrophages pulmonaires avec des lymphocytes dans diverses réactions immunologiques de type cellulaire. Il est évident que le macrophage alvéolaire joue un rôle central dans les processus inflammatoires et immuns au niveau du poumon (Schwartz and Bellanti, 1977 cités par Hunninghake et al., 1979). Des macrophages alvéolaires humains peuvent amplifier une réponse inflammatoire en produisant notamment un facteur stimulant la formation de colonies (Golde et al., 1974 cités par Hunninghake et

al., 1979), un facteur activant les plaquettes sanguines (Benveniste et al., 1979 cités par Hunninghake et al., 1979) et des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles (Kazmierowski et al., 1977, Hunninghake et al., 1978 cités par Hunninghake et al., 1979).

Le facteur stimulant la formation de colonies est probablement responsable d'une production de granulocytes et de monocytes (Golde et al., 1972 cités par Hunninghake et al., 1979).

Récemment, on a identifié deux facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles, libérés par le macrophage alvéolaire : le fragment C5 du complément et un second facteur de faible P.M. (Reynolds, 1982).

La production du complément n'a pas encore été démontrée pour le macrophage alvéolaire humain.

Il a été démontré que des macrophages alvéolaires de nombreuses espèces sont aptes à relâcher ce (ou ces) facteur(s) chimiotactique(s) pour des neutrophiles in vivo et in vitro (Roos et al., 1977, Hunninghake et al., 1978 cités par Henson et al., 1979).

La nature de cette activité chimiotactique n'est pas encore définie.

Les stimuli capables d'initier la libération de ce facteur chimiotactique incluent divers micro-organismes, des particules organiques et inorganiques et des complexes immuns. La sécrétion de ce facteur constituerait un moyen important pour les macrophages alvéolaires d'amplifier les réponses inflammatoires chroniques et aiguës caractérisées par une accumulation des neutrophiles dans le poumon.

Les macrophages alvéolaires interviennent également dans la réponse immunitaire.

Dans certaines situations anormales, nous pouvons trouver des lymphocytes dans le tissu interstitiel et sur la surface épithéliale des structures alvéolaires. Il est probable que ces lymphocytes se déplacent à partir du sang périphérique, du tissu lymphoïde associé aux bronches, et des nodules lymphoïdes locaux vers les structures alvéolaires (Daniele et al., 1977 cités par Hunninghake et al., 1979).

De tels lymphocytes activés produisent des lymphokines incluant un facteur inhibant la migration du macrophage alvéolaire, un second facteur inhibiteur pour la motilité du polymorphonucléaire neutrophile (PMN) et favorisant le développement de colonies de PMN et de monocytes (Weisbart et al., 1985), et enfin, un facteur chimiotactique pour le monocyte (Hunninghake et al., 1979, Warr and Martin, 1973,

Bartfeld and Atoynatan, 1970 cités par Hunninghake et al., 1979). Des macrophages alvéolaires récoltés chez des individus immunisés avec, par exemple, le virus de l'Influenza présentent des taux élevés d'enzymes lysosomiaux. Cela suggérerait que les cellules macrophagiques ont été activées.

Les lymphocytes T possèdent à leur surface des récepteurs Fc pour des IgM et des IgG; ces dernières seraient l'étiquette du lymphocyte T activé (Krammer et al., 1975, Fridman et al., 1977 cités par Hunninghake et al., 1979).

La majorité des lymphocytes B ont leur surface garnie d'immunoglobulines des classes IgM et IgD principalement (Danieli et al., 1975 cités par Hunninghake et al., 1979). En outre, le lymphocyte B pulmonaire a probablement des récepteurs pour le fragment C5 du complément (Warr et al., 1976 cités par Hunninghake et al., 1979).

A propos de la nature de l'interaction entre le lymphocyte T et le macrophage, des études in vitro ont démontré qu'une prolifération lymphocytaire (lymphocytes T) optimale induite par l'action mutagénique du macrophage est observé lorsque le rapport macrophage alvéolaire / lymphocyte T est approximativement de 1 : 4. Donc, cette interaction est probablement régulée en partie par les relations physiques de ces cellules à l'intérieur des structures alvéolaires (Hunninghake et al., 1980).

1.6.2. Origine et cinétique.

Nous savons que des monocytes circulants sont originaires d'une population de promonocytes qui se sont divisés dans la moelle osseuse. Il est admis également que les monocytes quittent la circulation sanguine. Mais il y a une incertitude quant à la nature du chemin final emprunté lorsqu'ils passent du compartiment sanguin aux alvéoles (Bowden and Adamson, 1980) (Fig.18).

Il y a au moins quatre possibilités (Bowden, 1984) : la première est une migration directe de monocytes traversant l'endothélium, l'espace interstitiel et l'épithélium pour atteindre les alvéoles (Van Furth, 1970 cité par Bowden, 1984); la seconde possibilité consiste en une migration de monocytes ou d'unités cellulaires ayant un aspect de colonies, qui dérivent de la moelle osseuse pour se diviser dans les

tissus interstitiels et subir une maturation finale avant de pénétrer dans les alvéoles; une troisième origine possible réside dans une division de macrophages résidentiels interstitiels dont les cellules-filles migrent jusqu'aux sacs aériens; enfin, la dernière possibilité est la combinaison de la première avec la troisième (Bowden and Adamson, 1980).

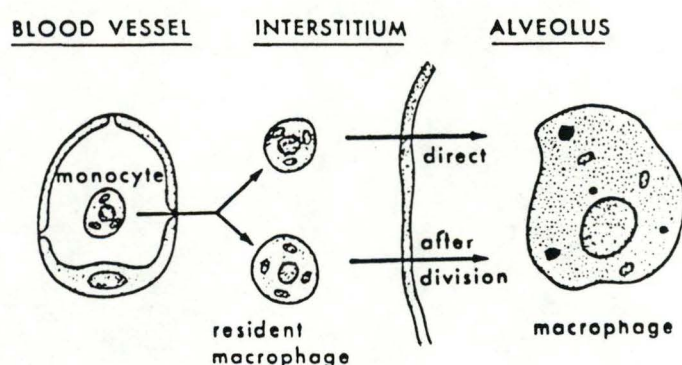


Fig. 18. Double origine des macrophages alvéolaires (Bowden and Adamson, 1980).

Par des expériences de marquage avec de la thymidine tritiée, Van Furth (1970) a constaté que le temps de demi-vie des monocytes sanguins était de 24 heures environ.

Récemment, cette technique a été utilisée pour mesurer le temps de passage des monocytes dans le sang, le tissu interstitiel pulmonaire et les alvéoles pulmonaires (Bowden and Adamson, 1980). Les temps de demi-vie sont respectivement de 24 heures, 2 jours et 4 jours.

Cette étude a révélé qu'une petite proportion de macrophages alvéolaires est issue d'une division de cellules résidentielles interstitielles. Une multiplication de macrophages libres dans les alvéoles peut avoir lieu, bien qu'elle soit inhabituelle lorsque les circonstances sont normales (Evan et al., 1973 cités par Bowden, 1984).

En résumé, la majorité des macrophages atteignent les alvéoles directement à partir des monocytes sanguins; une proportion nettement moins élevée de ces macrophages alvéolaires résulte de la division de cellules résidentielles interstitielles qui vont alors migrer vers les alvéoles.

1.6.3. Réponse adaptative.

L'air que les êtres vivants respirent n'est jamais pur. Le système pulmonaire est sans cesse "agressé" par des polluants divers, solides (poussières), liquides (aérosols) ou gazeux, vivants ou non.

L'hétérogénéité de la population macrophagique obtenue par un lavage broncho-alvéolaire reflète la capacité que possèdent ces cellules à s'adapter aux conditions ambiantes.

Dans une situation normale, nous savons que la population des macrophages alvéolaires augmente de deux façons, la plupart des cellules macrophagiques sont issues des monocytes sanguins, une plus petite proportion provient d'une division lente des cellules macrophagiques interstitielles. Lorsque l'environnement est concentré en polluants divers, l'afflux des cellules macrophagiques est augmenté par une accélération du système normal (cfr ci-dessus).

L'origine initiale des macrophages est le monocyte sanguin; dans un second temps, des cellules monocytaires interstitielles ou nouvellement arrivées dans le tissu interstitiel témoignent d'une activité mitotique augmentée. Ce supplément de cellules grossit la population macrophagique. Grâce à ce processus, les sacs alvéolaires demeurent stériles et non encombrés de particules potentiellement nocives, ni de débris cellulaires.

Excepté dans certaines circonstances inhabituelles, le mécanisme d'adaptation fonctionne bien.

1.6.3.1. Influence de la dose.

La production des cellules macrophagiques serait influencée par l'importance de la charge, de sa composition chimique de la taille des particules polluantes (Brain, 1971 cité par Bowden, 1984). La charge représente la quantité de polluants. Ces réponses macrophagiques sont en relation plus étroite avec le nombre de particules qu'avec la masse globale de polluants. Des petites particules induisent une réponse plus importante que celle engendrée par une charge identique composée de particules plus grosses.

Les deux origines, monocytaires et interstitielle, du système de production sont en coordination pour répondre à une charge alvéolaire

la réponse monocytaire est plus rapide mais transitoire, quelle que soit la dose; l'autre voie de recrutement est plus tardive et se manifeste plus lentement, mais elle est plus durable. Chez des individus où la moelle osseuse est déficiente (c'est le cas de certains patients leucémiques), la production de macrophages est maintenue grâce aux cellules du compartiment interstitiel (Golde et al., 1974 cités par Bowden, 1984).

1.6.3.2. Contrôle du recrutement des macrophages alvéolaires.

Le débordement de macrophages qui fait suite à l'arrivée d'une charge particulaire dans les sacs aériens s'effectue très rapidement et atteint son maximum au moins 24H avant que ne débute la prolifération des cellules interstitielles (Bowden and Adamson, 1980 cités par Bowden, 1984). Cette production de macrophages s'accompagne d'un afflux important de polymorphonucléaires neutrophiles. Ceux-ci sont attirés par des facteurs chimiotactiques libérés par les macrophages (Hunninghake et al., 1978 cités par Cohen and Batra, 1980).

Lors de l'inhalation de particules cytotoxiques, on observe une arrivée considérable de cellules phagocytaires; l'inhalation d'un nombre similaire de particules moins toxiques n'entraîne pas un apport aussi important. Les macrophages ayant phagocyté des particules toxiques seraient lysés; les produits de cette lyse avertissent le système de recrutement des macrophages qui de son côté serait responsable d'un nombre plus élevé de neutrophiles.

1.6.4. Clearance pulmonaire.

La clearance pulmonaire ou épuration des voies aériennes représente une fonction fondamentale de l'appareil pulmonaire. L'épuration du poumon est réalisée par deux mécanismes parallèles mais distincts, concourant tous deux au même résultat, celui des mécanismes mucociliaires qui nettoie les voies aériennes et celui des macrophages alvéolaires qui défend les alvéoles. Normalement, la demi-vie du macrophage dans le compartiment alvéolaire est de quatre jours environ (Bowden and Adamson, 1980 cités par Bowden, 1984). Lorsqu'il se trouve dans un environnement stérile, sa demi-vie peut être plus longue.

Quel est le sort des macrophages pulmonaires ?

L'élimination des macrophages pulmonaires s'effectue principalement par les voies respiratoires. Cela implique un mouvement de cellules à partir des sacs aériens jusqu'aux ouvertures des bronchioles respiratoires et terminales. Dès que le macrophage se trouve sur l'épithélium de la bronchiole, il est transporté par un mouvement ciliaire jusqu'au pharynx où il passe dans le tube digestif.

Les macrophages alvéolaires pourraient emprunter d'autres routes : grâce à leurs capacités migratrices, les macrophages chargés traverseraient l'épithélium pour pénétrer dans le tissu interstitiel; de là, ils se dirigeraient vers les vaisseaux lymphatiques dont le courant les aide dans leur cheminement. Cette hypothèse est soutenue par la présence de macrophages chargés dans les tissus interstitiels. C'est le cas de macrophages chargés de particules de charbon (Policard et Galy, 1970).

Des particules inhalées atteignent également les vaisseaux lymphatiques. Ces particules sont endocytées par les pneumocytes de type I pour arriver dans le tissu interstitiel et de là, atteindre le système lymphatique. Elles seront phagocytées par des macrophages interstitiels (Adamson and Bowden, 1980 cités par Bowden, 1984). Ce processus semble être plus lent.

Dans certaines circonstances, les mécanismes de la clearance sont entravés : la silice, par exemple, détruit le macrophage, provoquant une libération de particules qui sont alors absorbées par d'autres macrophages. Ce processus diminue la clearance et facilite le passage trans-épithélial du matériel toxique vers le tissu interstitiel. Un autre exemple est celui des gaz polluants comme le NO₂ et l'O₃ (ozone) qui blessent sélectivement les bronchioles respiratoires; celles-ci se nécrosent et inhibent, de ce fait, le transfert macrophagique des alvéoles aux bronches. Il est vrai que, lors de l'élimination des macrophages alvéolaires par le mécanisme mucociliaire, ceux-ci semblent passer dans les canaux alvéolaires puis dans les bronchioles parce qu'ils y sont entraînés par un courant liquide parti des alvéoles. La propulsion de ce liquide est facilitée par les compressions expiratoires exercées sur les alvéoles.

En résumé, la clearance pulmonaire s'effectue principalement par la voie mucociliaire. Le système lymphatique est une autre solution pour la clearance, mais elle semble être d'une signification moindre. De

plus, il n'est pas prouvé que des macrophages alvéolaires libres retraversent l'épithélium pour atteindre le tissu interstitiel. Des particules polluantes arrivent jusqu'au tissu interstitiel en étant transportées à travers l'épithélium et sont phagocytées par des macrophages localisés dans la paroi alvéolaire.

1.6.5. Réponses excessives.

L'aptitude des poumons à éliminer des particules toxiques ou allergéniques dépend, d'une part, du fonctionnement de la clearance par voie mucociliaire et d'autre part, de l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires.

Si la capacité d'adaptation du macrophage est dépassée ou si ses fonctions défensives sont perturbées, il peut s'ensuivre des changements pathologiques.

Le rôle de défense attribué au macrophage doit être considéré comme dominant. Cependant, il est possible que cette cellule participe notamment directement ou indirectement à la genèse de deux groupes de maladies pulmonaires : la fibrose pulmonaire chronique et l'emphysème. De telles réponses inappropriées impliquent des interactions avec des cellules fibroblastiques et l'apparition de dégâts tissulaires initiés par des sécrétions macrophagiques.

1.6.5.1. Interactions entre le macrophage alvéolaire et le fibroblaste.

Une phagocytose de complexes immuns (Fig.19), comme cela se produit dans divers types d'alvéolite allergénique, initie la synthèse et le relargage d'hydrolases (élastase, collagénase, etc...). Ceux-ci constitueraient un stimulus continu pour la sécrétion de fibres de collagène par des cellules fibroblastiques, signal de l'installation d'une fibrose interstitielle (Cardella et al., 1974 cités par Bowden, 1984).

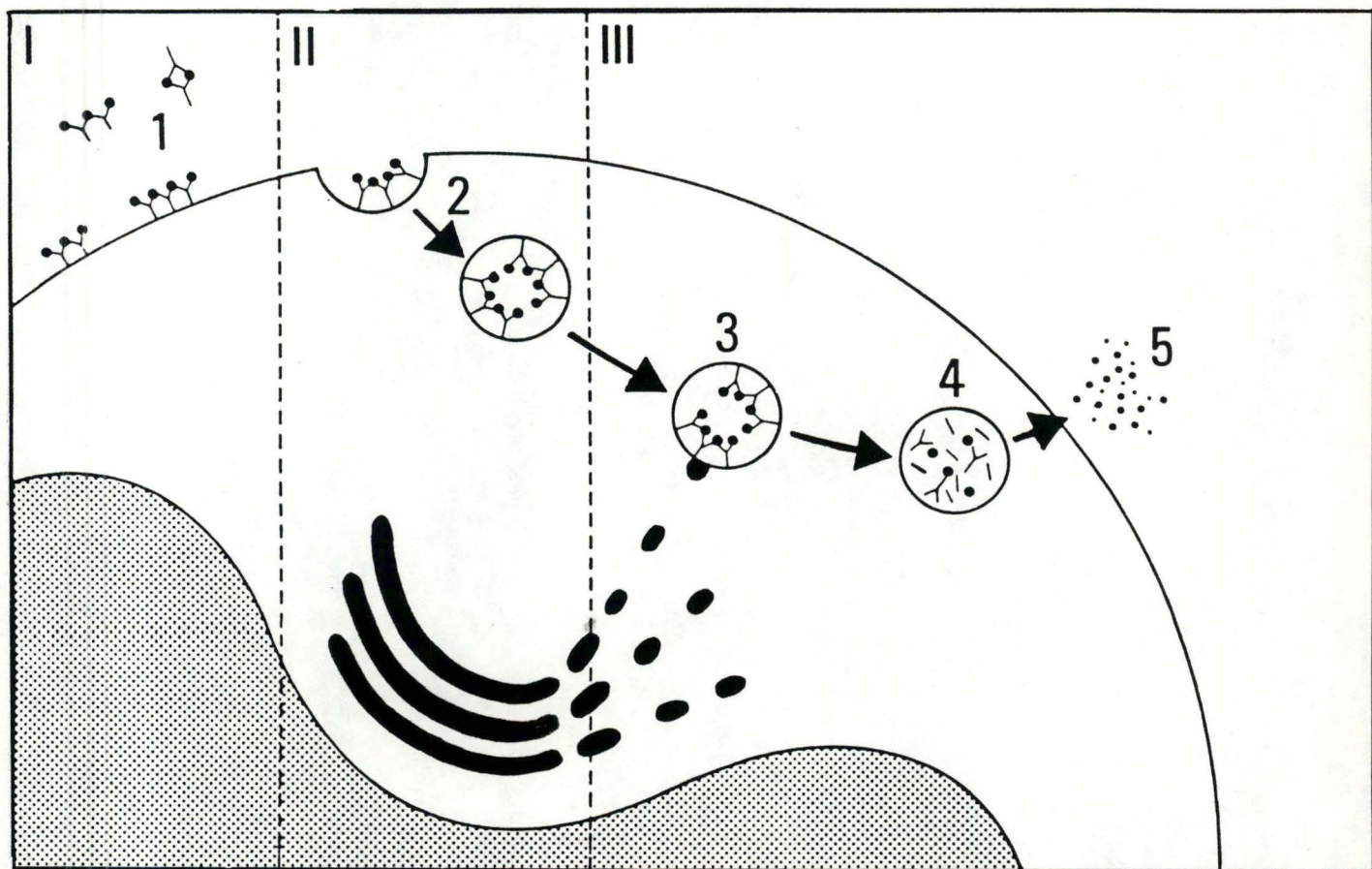


Fig. 19. Représentation schématique des processus impliqués dans la dégradation de complexes immuns par la cellule macrophagique (Leslie, 1980).

Il est possible qu'une stimulation fibroblastique par des macrophages blessés constitue un mécanisme général (Spector, 1974 cité par Bowden, 1984).

Cette stimulation directe a lieu dans le tissu interstitiel et dépend de particules toxiques traversant la barrière épithéliale : il a déjà été signalé que la silice peut détruire les macrophages pulmonaires et induire la libération d'hydrolases lysosomales et d'autres substances chimiotactiques qui recrutent en permanence des cellules inflammatoires dans le poumon. La séquence répétée de la phagocytose, de la mort cellulaire et du relâchement de particules de silice dans les sacs aériens favoriserait la capture des cristaux de silice par les pneumocytes I et leur passage vers le tissu interstitiel. A cet endroit, se développeraient des nodules silicosiques et une fibrose. Les structures alvéolaires des patients atteints d'une fibrose pulmonaire sont caractérisées par un nombre élevé de fibroblastes et une quantité importante de fibronectine. La fibronectine est une

glycoprotéine présente dans le plasma et les tissus qui participe à l'attachement des fibroblastes à la matrice extracellulaire (Bitterman et al., 1983). Elle interagit avec des substances telles que la fibrine, le collagène et autres macromolécules tapissant les surfaces cellulaires. On lui attribue par conséquent un rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire, ainsi que dans (l'étalement) et la locomotion (Stenman et Vaheri, 1978, Mosesson et Amsani, 1980 cités par Lasser, 1984). La fibronectine a aussi la caractéristique d'attirer des cellules par ses propriétés chimiotactiques (Gauss-Müller et al., 1980, Postlethwaite et al., 1981 cités par Rennard et al., 1981).

Là où le tissu est abîmé, on trouve des phagocytes mononucléés qui produiraient une quantité importante de fibronectine; celle-ci recruterait des fibroblastes qui contribueraient ainsi au processus de la réparation tissulaire (Rennard et al., 1981).

Les macrophages alvéolaires sécrètent de la fibronectine. Nous savons que ce taux de production s'élève chez des patients atteints de maladies pulmonaires interstitielles conduisant à une fibrose pulmonaire. Ce fait est une propriété commune aux macrophages alvéolaires lorsqu'ils sont sollicités par les maladies pulmonaires interstitielles en général. Il n'est donc pas spécifique d'un processus de maladie bien précis.

La fibronectine aurait un rôle chimiotactique envers les fibroblastes pulmonaires : des macrophages activés recruteraient des fibroblastes et les inciteraient à se multiplier par la sécrétion d'un facteur de croissance; il s'ensuivrait une production élevée de collagène par des fibroblastes plus nombreux. L'accumulation du collagène aboutirait au développement d'une fibrose locale.

De plus, comme la fibronectine intervient dans l'adhésion des fibroblastes à la matrice extracellulaire, sa production accrue dans les problèmes de fibrose modulerait la topographie des fibroblastes alvéolaires.

En résumé, les macrophages joueraient un rôle dans la réorganisation des structures alvéolaires dans les maladies pulmonaires interstitielles. Ce réarrangement serait le fruit d'une sécrétion de fibronectine avec pour conséquence un recrutement de fibroblastes dans les territoires où s'installe une inflammation.

1.6.5.2. Lésions pulmonaires.

Les macrophages alvéolaires sont différents des autres macrophages par leurs activités métaboliques. Ceci est dû aux différences de milieu où opèrent les macrophages. Dans l'ensemble, les macrophages absorbent par phagocytose, tout ce qu'ils rencontrent; ils ne font pas le choix.

Les macrophages alvéolaires sont plus sujets aux agressions de l'environnement d'où une activité métabolique intense. Cependant, si celle-ci devient trop importante, le macrophage alvéolaire, au lieu de le défendre fait du tort à l'organisme.

L'aptitude des phagocytes à tuer les microbes, par exemple, implique leur capacité à réduire l'oxygène en métabolites oxygénés toxiques signalés précédemment. Cependant, des macrophages alvéolaires et des neutrophiles peuvent également libérer ces composants toxiques dans l'environnement extracellulaire.

Un macrophage activé est capable de synthétiser des enzymes qui peuvent être responsables de dégâts cellulaires et tissulaires dans son environnement immédiat.

A. L'effet de la fumée de cigarette sur le macrophage alvéolaire.

La réponse du macrophage alvéolaire à la fumée de cigarette est d'un intérêt considérable. La fumée de cigarette est un facteur dominant dans l'étiologie d'un emphysème.

La quantité de macrophages récoltés chez un fumeur par un lavage broncho-alvéolaire est plus importante que chez une personne saine (Harris et al., 1970; Velluti et al., 1984). On observe souvent des macrophages en relation étroite avec des lymphocytes qui serait l'expression morphologique d'un échange d'information entre ces cellules (Velluti et al., 1984).

L'inhalation de fumée de cigarette est associée à une accumulation de leucocytes polymorphonucléaires dans le poumon. Les macrophages alvéolaires de fumeurs relâchent spontanément un facteur chimiotactique pour les PMN; la fumée peut stimuler in vitro les cellules macrophagiques à libérer ce facteur. Cette stimulation peut

être dûe aux constituants toxiques (hydrocarbures, nicotine...) contenus dans la cigarette. Le fumeur n'inhalant jamais la fumée, empêche les constituants nocifs d'atteindre les alvéoles pulmonaires et de passer dans le courant sanguin (Kornitzer et Kittel, 1986). Donc, l'attraction de PMN vers le poumon en association avec la fumée de cigarette serait médiée par l'interaction de la fumée avec des macrophages alvéolaires (Hunninghake et al., 1980).

Les macrophages alvéolaires des fumeurs ont des caractéristiques différentes de ceux des non fumeurs : leur morphologie est différente (Harris et al., 1970; Voisin et al., 1985), leurs mécanismes biochimiques sont altérés (utilisation trois fois plus élevée du glucose, déficience en ATP, sécrétion de protéases? etc...).

En ce qui concerne les différences morphologiques, on observe ceci : les cellules macrophagiques sont plus larges (Huber et al., 1980), leur reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont bien développés, le cytoplasme des macrophages alvéolaires libres et des macrophages localisés dans l'interstitium alvéolaire est rempli de dépôts de kaolinite et de silicate d'aluminium (Brady and Craighead, 1975 cités par Bowden, 1984); les fumeurs ont aussi leur macrophages riches en corps résiduels renfermant des inclusions ressemblant à des fibres (Harris et al., 1970). Ils contiennent de toutes façons plus d'inclusions que des macrophages issus d'individus non fumeurs (Pratt et al., 1969 cités par Pratt et al., 1971).

Comment expliquer ces différences morphologiques ?

Les macrophages alvéolaires participeraient à l'inactivation des composants toxiques de la fumée de cigarette. Sans ce stimulus de la prolifération phagocytaire, les composants irritants et carcinogéniques de la fumée atteindraient probablement des concentrations assez élevées au niveau pulmonaire et contribueraient ainsi à la pathogénie de maladies respiratoires chroniques. Encore une fois, le macrophage alvéolaire met en évidence sa fonction dominante : il défend l'organisme qui l'abrite, contre toute agression directe (lésions pulmonaires dues aux vapeurs brûlantes, à l'oxygène, noyades,...) ou indirecte (polytraumatismes, intoxications médicamenteuses graves,...). C'est pour cette raison que les macrophages alvéolaires des fumeurs présentent un contenu cytoplasmique riche en matériel phagocyté absent chez les individus sains.

Paradoxalement, l'accumulation locale de macrophages dans le poumon, en tant que réponse défensive, peut également participer à la pathogénie de maladies respiratoire chroniques. En effet, les phagocytes relâcheraient des enzymes lysosomales telles que l'élastase et la collagénase qui léseraient le tissu pulmonaire. Le nombre élevé de lysosomes remarqué dans les macrophages alvéolaires humains suggèrent que ceux-ci contiennent de grandes quantités d'enzymes hydrolytiques.

La superoxyde dismutase (cfr 1.4.1.3. Phase de digestion.) voit son activité diminuée de 30 % après une trentaine de jours d'exposition à la fumée. Il en résulterait une libération de métabolites d'oxygène toxiques qui affecteraient l'intégrité fonctionnelle des macrophages pulmonaires et la structure du poumon lui-même (Huber et al., 1980; Hoidal et al., 1980).

La fumée de cigarette peut influencer négativement le mécanisme mucociliaire (cfr 1.6.4 Clearance pulmonaire.) par ses effets toxiques sur la fonction ciliaire; cependant le pourcentage élevé et quasi semblable de macrophages viables obtenus, d'une part, chez des individus fumeurs et d'autre part, chez des individus non fumeurs, suggère que la fumée de cigarette ne provoque pas un taux significatif de mortalité des macrophages in vivo (Harris^{et al.}, 1970).

En absence de fumée, des macrophages alvéolaires humains issus d'individus fumeurs sont aptes in vitro de phagocyter et d'inactiver des bactéries non virulentes avec une aisance analogue à celle des macrophages d'individus sains. L'exposition directe in vitro des macrophages pulmonaires à la fumée de cigarette semble inhiber la phagocytose, et cette observation expliquerir partiellement la plus grande incidence des infections respiratoires chez les fumeurs (Velluti et al., 1984).

Les effets de la fumée de cigarette ont été également étudiés sur des macrophages alvéolaires de cobaye : la déficience de la cellule en ATP témoigne de la cytotoxicité de la fumée vis-à-vis du macrophage alvéolaire; des problèmes apparaissent aussi au niveau de la synthèse des protéines (Holt and Keast, 1973, Leffingwell and Low, 1979 cités par Voisin et al., 1985) et au niveau de l'action de la bactéricidie (Green and Carolin, 1967 cités par Voisin et al., 1985).

Chez les fumeurs, les macrophages alvéolaires présentent une activité

accrue des protéases qui dégradent l'élastine (Janoff et al., 1972 cités par Janoff et al., 1979), les protéoglycanes (Janoff et al., 1976 cités par Janoff et al., 1979) et la membrane basale (Janoff, 1970 cité par Janoff et al., 1979).

La figure 20 propose un mécanisme biochimique pour le développement d'un emphysème (Kimbel, 1980) : la fumée de cigarette stimule la production d'élastase par le polymorphonucléaire neutrophile et par le macrophage alvéolaire (Janoff, 1979), réduit l'efficacité de l' α -1-antitrypsine (inhibiteur de protéases comme l'élastase). L'élastine est par conséquent attaquée. Les macrophages stimulés par la fumée produisent un facteur chimiotactique pour les neutrophiles apportent un large supplément de protéases neutres qui s'ajoutent au potentiel responsable des lésions protéolytiques.

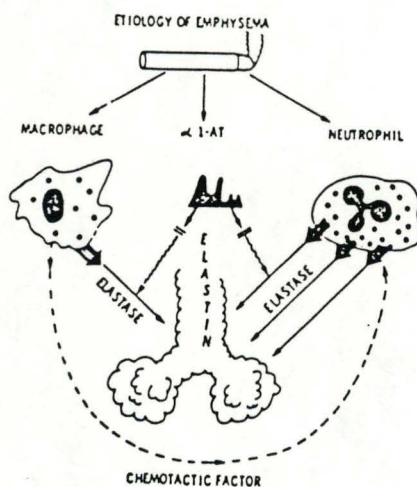


Fig. 20. Mécanisme biochimique proposé pour le développement d'un emphysème (Kimbel, 1980).

P. Le syndrome de détresse respiratoire aigüe chez l'adulte (ARDS).

a) Définition.

L'insuffisance respiratoire aigüe de l'adulte (ARDS) est un syndrome caractérisé par une détresse respiratoire secondaire à un oedème pulmonaire.

Contrairement à l'oedème pulmonaire cardiogénique secondaire à des modifications de pression hydrostatique dans les capillaires

pulmonaires, l'oedème dans l'ARDS est lésionnel et secondaire à une augmentation de la perméabilité capillaire pulmonaire (Maton, 1978).. Le pourcentage de mortalité s'élève à 50-60 % selon les centres médicaux.

Ce syndrome est commun à de multiples étiologies (Petty, 1975 cité par Maton, 1978; Divertie and Petty, 1979; Newman, 1983; Sibbald, 1983) (Fig.21) : états de choc, polytraumatisme, septicémie, pancréatite, embolie pulmonaire, infections pulmonaires, intoxications diverses, affections cérébrales, etc... Dans ce syndrome, on distingue les affections pulmonaires primaires qui atteignent directement l'appareil respiratoire (inhalation d'eau, de fumée, de liquide gastrique; brûlures; agents chimiques; etc...) et les affections pulmonaires secondaires qui se développent suite à diverses pathologies systémiques graves (septicémie, pancréatite, choc, embolie, etc...) (Auzépy, 1983).

- Choc
- Traumatismes (surtout polytraumatismes)
- Infections :
 - septicémies à Gram (-)
 - pneumonie virale
 - pneumonie bactérienne
 - pneumonie fongique (rare)
- Embolies (cruorique, gazeuse, graisseuse, amniotique)
- Hématologiques :
 - coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)
 - circulation extracorporelle (CEC)
 - transfusions multiples
- Aspirations de :
 - liquide gastrique (syndrome de Mendelson)
 - eau douce ou de mer
 - hydrocarbures
 - produits corrosifs (NO₂, Cl₂, NH₃, phosgène, cadmium)
- Autres causes accidentelles :
 - brûlures
 - ingestion de Paraquat (herbicide)
 - surdosage de « drogues » (héroïne, méthadone, barbiturates, colchicine)
- Intoxication aux fortes concentrations d'oxygène
- Haute altitude
- Divers :
 - acidocétose diabétique
 - pancréatite
 - urémie
 - éclampsie
 - choc électrique externe
 - poumon radiothérapique

Fig. 21. Circonstances étiologiques de l'ARDS (Auzépy, 1983).

b) Physiopathologie de l'ARDS.

La morphologie du poumon des patients atteints d'ARDS est caractéristique (Riede et al., 1982 cités par Marbaix, 84-85).

D'un point de vue macroscopique, les poumons sont congestifs, durs, augmentés de poids et ont perdu toute leur élasticité.

Les études expérimentales sur la morphologie du poumon de choc sont compliquées par la grande variabilité qu'il existe entre les différents animaux, et chez un même animal lorsque l'on considère les différentes surfaces pulmonaires (Wilson et al., 1970 cités par Ratliff, 1980). En dépit de cela, il a été possible d'établir clairement les altérations morphologiques du poumon de choc dans le cadre d'expériences animales : progression d'un oedème interstitiel vers un oedème intra-alvéolaire, congestion vasculaire intense, congestion lymphatique, hémorragie périvasculaire et intra-alvéolaire, et atelectasie multifocale (Cook and Webb, 1968, Lowery et al., 1970, Wilson et al., 1970, Wilwerth et al., 1967 cités par Ratliff, 1980).

Chez l'homme, les poumons subissent des changements morphologiques similaires.

b.1.) Modifications anatomo-fonctionnelles.

L'ARDS évolue en trois stades de gravité croissante plus ou moins intégrés. La réversibilité est toujours possible mais est d'autant plus difficile que l'on passe d'un stade à un autre. On distingue ainsi un stade initial d'oedème pulmonaire, un stade intermédiaire dit de "membranes hyalines" et enfin, un stade plus tardif de fibrose (Pontoppidan et al., 1982; Auzépy, 1983).

Phase oedémateuse.

L' oedème pulmonaire est lié à une altération de la paroi alvéolo-capillaire qui devient perméable aux protéines de grand poids moléculaire; cet oedème est riche en protéines, envahit l'alvéole et l'interstitium et induit une disparition du gradient de pression oncotique entre les zones intra- et extravasculaires. La fuite protéique interstitielle augmente l'extravasation liquidienne, d'où

l'importance et la rapidité d'installation de l'oedème pour une pression capillaire pulmonaire normale (Tenailon et al., 1983; Matamis et al., 1982).

L'oedème débute dans la région des tissus conjonctifs pérbronchique et périvasculaire. Histologiquement, il se reconnaît par des dilatations des vaisseaux lymphatiques autour des vaisseaux sanguins (Riede et al., 1979). Par la suite, l'oedème atteint l'interstitium des parois alvéolaires.

Stade intermédiaire (24-48 heures).

Ce stade est rapidement atteint et se caractérise par l'apparition de membranes hyalines formées de la nécrose des pneumocytes I et d'un coagulum de protéines ayant diffusé lors de la phase oedémateuse. En même temps, les pneumocytes II envahissent la surface alvéolaire, modifiant la forme des alvéoles et les caractéristiques du surfactant.

L'interstitium devient également un gel de protéines. Il est riche de cellules et de fibres collagènes et élastiques.

L'oedème diminue en règle générale, si le drainage lymphatique est efficace et si la pression hydrostatique à l'intérieur des vaisseaux ne s'élève pas.

Une hypertension artérielle pulmonaire apparaît progressivement, liée à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires.

Stade de fibrose (à partir du sixième jour).

L'architecture pulmonaire se modifie : sur le plan vasculaire, on assiste à la rupture des petits vaisseaux avec hémorragie locale qui aboutit à leur destruction; des thromboses apparaissent. Les lésions sont distribuées de façon anarchique.

Les alvéoles contiennent toujours quelques membranes hyalines; elles sont de plus tapissées de pneumocytes II formant une épaisse couche de cellules cubiques. Les espaces alvéolaires ont disparu : les altérations de la membrane basale ont permis l'envahissement des alvéoles par des cellules interstitielles; suite à une prolifération fibroblastique, une fibrose intra-alvéolaire s'installe, faite de fibres anormales de collagène. En effet, un intense métabolisme cellulaire se produit dans l'interstitium avec destruction et construction rapide de nouveaux matériaux : les fibres collagènes

augmentent nettement en nombre mais leurs caractéristiques sont largement modifiées; les fibres élastiques disparaissent progressivement. Le parenchyme pulmonaire devient, par conséquent, inextensible et inapte à toute ventilation (Tenailon et al., 1983).

b.2.) Mécanismes physiopathologiques responsables de l'ARDS.

En ce qui concerne le siège de la lésion, il est admis qu'il porte sur l'endothélium vasculaire, d'où l'apparition de l'oedème interstitiel. Quel que soit le mécanisme, l'inondation alvéolaire pourrait s'expliquer par la rupture du barrage solide que représente l'épithélium alvéolaire.

La séquence d'évènements conduisant à un ARDS commencerait donc avec des lésions au niveau de l'endothélium des capillaires pulmonaires ou au niveau de l'épithélium pulmonaire (Carvalho, 1985).

Les mécanismes sont multiples et encore incomplètement élucidés.

- Dans le cadre des causes systémiques ou extrathoraciques de l'ARDS, plusieurs substances humorales sont libérées : produits du complément, radicaux libres d'oxygène, protéases, métabolites de l'acide arachidonique, produits de dégradation du fibrinogène, activation du facteur de Hageman, libération de kinines... (Repine, 1985).

- De plus, dans les capillaires pulmonaires se forment des micro-agrégats de polynucléaires, de plaquettes, de fibrine. Ces agrégats peuvent également libérer des substances humorales dans la microcirculation pulmonaire : complément, dérivés de l'acide arachidonique, protéases, formes radicalaires de l'oxygène, sérotonine, histamines...

- Il y a une interaction entre ces micro-agrégats et les substances humorales : les micro-agrégats libèrent des substances humorales et d'autre part, dans les états cliniques conduisant à l'ARDS, la libération des substances humorales favorisent la formation de micro-agrégats.

La conséquence est une altération de l'endothélium capillaire pulmonaire entraînant une augmentation de sa perméabilité et une fuite liquidienne des capillaires vers le tissu interstitiel pulmonaire. L'oedème formé entraîne une détresse respiratoire avec une hypoxémie, une réduction de la capacité résiduelle fonctionnelle et de la compliance pulmonaire.

La séquestration pulmonaire des polymorphonucléaires neutrophiles est provoquée par la libération de substances chimiotactiques (Zimmerman et al., 1983). Celles-ci proviennent du complément, des macrophages alvéolaires, de l'activation de la coagulation ou d'agents microbiens (Bachofen and Weibel, 1982).

Le fragment chimiotactique C5a favorise l'agrégation des polymorphonucléaires neutrophiles (Goldstein, 1980; Hammerschmidt et al., 1980) qui libèrent des formes toxiques de l'oxygène, des protéases (Mcguire et al., 1982) et des substances vasoactives (Said, 1979).

L'emballlement des réponses inflammatoires locales dans l'ARDS pourrait trouver son explication dans l'action des protéases sur le fragment C5 : lorsque la paroi alvéolaire est lésée, des protéases issues de sources multiples (plasma, cellules de la paroi alvéolaire abîmées, cellules inflammatoires telles que des macrophages ou des neutrophiles...) peuvent cliver le fragment C5 (localisé dans les alvéoles normales, dérivé du plasma, synthétisé probablement par des pneumocytes de type II...) en un fragment modifié (C5fr). Celui-ci devient chimiotactique et recrute plus de cellules inflammatoires, en particulier des polymorphonucléaires neutrophiles, dans les espaces alvéolaires. Les PMN libèrent des protéases supplémentaires qui clivent, à leur tour, des molécules C5 apparues au cours de la réaction inflammatoire. Ce cercle vicieux expliquerait la perpétuité du processus inflammatoire qui peut persister longtemps après que la blessure initiale se soit dissipée (Fig.22).

En cas d'hyperoxie (Fig.23), les macrophages alvéolaires stimulés libèrent des dérivés toxiques de l'oxygène et des substances chimiotactiques pour les polymorphonucléaires neutrophiles (Harada et al., 1984). De même, les polymorphonucléaires neutrophiles activés augmentent facilement leur consommation d'oxygène et produisent des formes toxiques de l'oxygène. Les effets toxiques de l'oxygène et de ses formes intermédiaires peuvent se résumer comme suit : destruction des membranes cellulaires, notamment endothéliales; inactivation d'enzymes membranaires, glycolytiques et de la chaîne respiratoire; inactivation de l' α 1-antitrypsine (Kimbel, 1980).

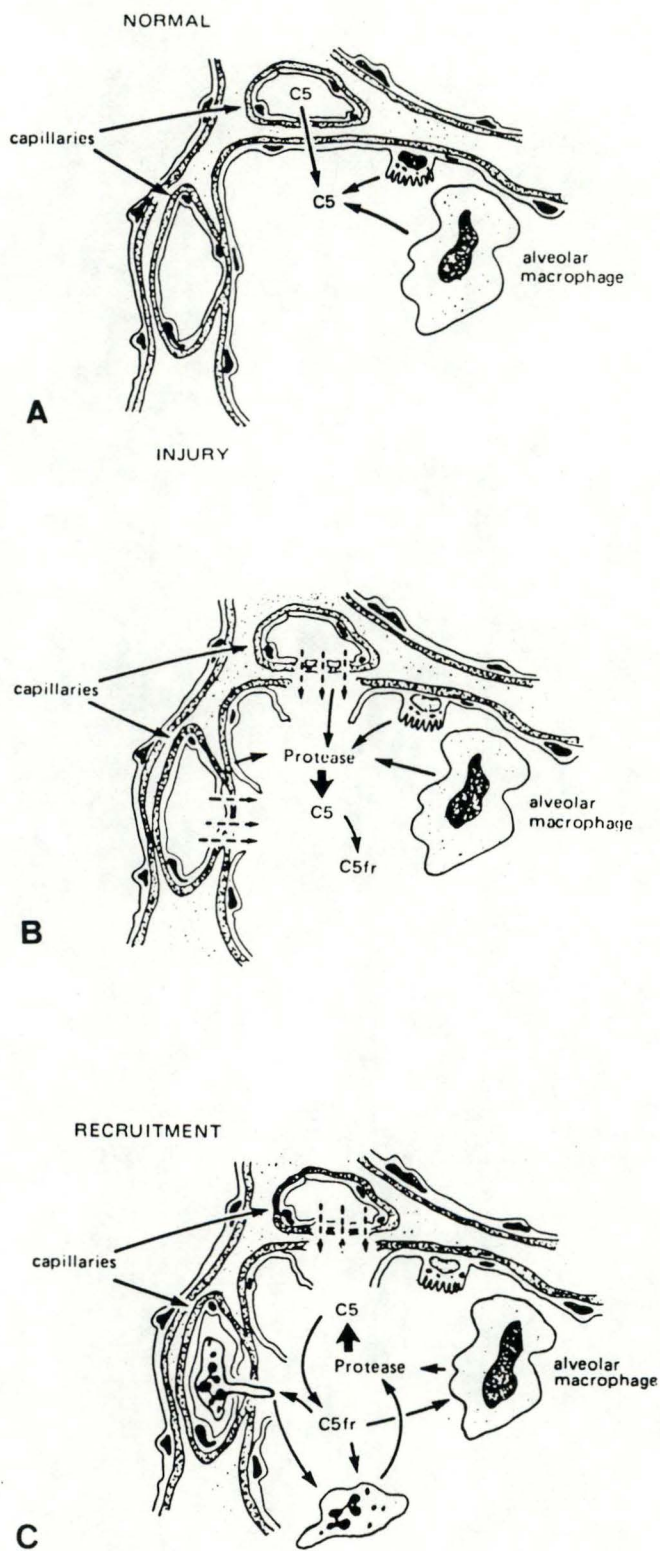


Fig. 22. Rôle du clivage du fragment C5 dans l'installation des réponses inflammatoires dans l'ARDS (Shaw et al., 1985).

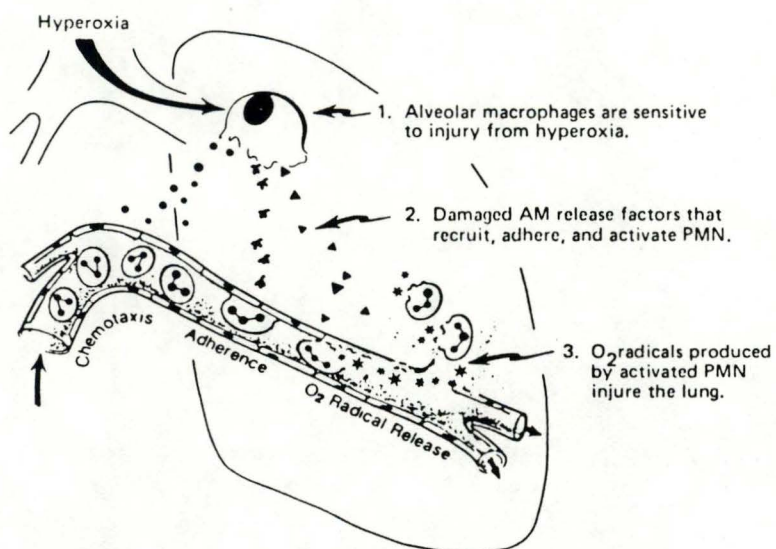


Fig. 23. Mécanisme hypothétique proposé pour le recrutement, l'activation, et la contribution des neutrophiles dans le développement d'une insuffisance respiratoire aiguë à partir d'une hyperoxie (Repine, 1985).

1.7. Perspectives d'avenir dans l'étude du macrophage alvéolaire.

Les macrophages alvéolaires humains jouent un rôle majeur dans la défense du poumon, le milieu ambiant constituant un ensemble d'agressions permanentes. Ces phagocytes, en effet, débarassent la surface alvéolaire de débris divers et sont les premières cellules à s'attaquer à la plupart des micro-organismes qui envahissent le tractus respiratoire inférieur. Il en résulte que le système immunitaire est moins sollicité.

D'une part, l'intégrité de l'appareil pulmonaire est directement assurée par les macrophages alvéolaires et d'autre part, les dégâts engendrés par des réactions immunitaires à médiation cellulaire sont moins importantes.

Il est clair, cependant, que le macrophage alvéolaire a d'autres fonctions.

Comme conséquence de ses autres capacités, il est absolument confirmé que cette cellule peut blesser le poumon.

Des études récentes ont démontré, par exemple, que les macrophages de fumeurs sécrètent spontanément une élastase. De même, des lésions pulmonaires apparaissent suite à leur sécrétion de facteurs chimiotactiques qui attirent les polymorphonucléaires neutrophiles au niveau du poumon. Ceux-ci, à leur tour, seraient responsables de dégâts pulmonaires en libérant de larges quantités de protéases.

Il est à souligner également que les macrophages alvéolaires pourraient modifier la pathogénie du cancer en neutralisant des composants carcinogéniques (Cantrell et al., 1973 cités par Hunninghake et al., 1980).

C'est dans ce sens qu'il serait intéressant d'étudier les macrophages alvéolaires.

Les travaux effectués jusqu'à présent sont assez récents vu la difficulté à obtenir le matériel d'étude. A présent, grâce au bronchoscope en fibre optique, il est probable que ces études vont, dans un avenir proche, connaître une expansion considérable.

2. BUT DU TRAVAIL.

Les êtres vivants ne vivent pas dans un environnement stérile : ils respirent constamment un air chargé en poussières diverses.

Afin de sauvegarder l'intégrité de l'appareil pulmonaire, ils disposent de mécanismes d'épuration pulmonaire dont le mécanisme mucociliaire et celui des macrophages alvéolaires.

Le macrophage alvéolaire se distingue des autres macrophages, histiocytes tissulaires, etc..., par une physiologie très particulière. Celle-ci est mise en évidence par une morphologie particulière.

Les macrophages alvéolaires sont continuellement sollicités par une diversité et une quantité variable de polluants. Lorsque ceux-ci atteignent les alvéoles en quantité importante, la population macrophagique augmente par le phénomène de diapédèse et par des multiplications locales. Cet apport de nouvelles cellules accentue l'hétérogénéité de la population des macrophages alvéolaires récoltée par des lavages broncho-alvéolaires. En effet, ces nouvelles cellules n'ont pas encore eu beaucoup l'occasion de phagocyter du matériel étranger qui vient bombarder les alvéoles; elles ont, par conséquent, une morphologie différente de celle des cellules qui ont déjà été très sollicitées.

Notre objectif a été de chercher à savoir si des macrophages, ayant déjà eu des activités métaboliques diverses (dont un pouvoir phagocytaire évident), pourraient, par des stimulations diverses et de niveaux croissants, réacquérir des capacités de synthèse enzymatique et de phagocytose.

3. MATERIEL ET METHODE.

3.1. Matériel.

A. Matériel d'étude.

Nous avons réalisé notre étude à partir de matériel animal, et plus précisément, à partir du rat de souche Wistar.

Nous avons également reçu un lot de macrophages alvéolaires humains provenant de différents cas pathologiques.

B. Composition de produits utilisés.

milieu PBS (phosphate buffered saline) :

8,5 gr NaCl

8,9 gr Na₂HPO₄.2H₂O

1 litre H₂O distillée

pH ajusté à 7,4 avec HCl N

milieu Hank's sans Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ :

8 gr NaCl

0,06 gr Na₂HPO₄.H₂O

0,4 gr KCl

0,06 gr KH₃PO₄

1 gr dextrose

0,01 gr rouge phénol

pH ajusté à 7,4

Ficoll à densité 1,093 :

7,65 gr Ficoll 400 (Pharmacia) à dissoudre dans 100 ml d'H₂O distillée;

ajouter 16 ml d'urographine 76 % (Schering);

ajuster le pH à 7,4;

prendre 95 ml du milieu auxquels on ajoute 5 ml d'urographine;

au moyen d'un réfractomètre (Analis), amener la densité à la valeur de 1,093;

milieu RPMI :

- 1 litre de RPMI 1640 (Gibco)
- 0,85 g NaHCO₃ (Merck)
- 10 ml de sodium pyruvate 100 mM (Gibco)
- 1 ml de géomycine 80 mg/ml (Schering)

3.2. Méthode.

3.2.1. Isolement des macrophages alvéolaires.

A. Méthode pour isoler les macrophages alvéolaires de rat.

Après avoir guillotiné les rats, nous les disséquons pour en dégager les poumons et la trachée et nous introduisons par celle-ci un tube flexible raccordé à une seringue de 10 cc. Cette seringue contient une solution physiologique à pH 7,4 qui est soit du milieu de Hanks sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, soit du PBS; la température de la solution est de 4°C. Le lavage se fait lentement afin de préserver l'intégrité du poumon, et plus précisément, des alvéoles pulmonaires.

Le liquide injecté est immédiatement aspiré et versé dans des tubes de 25 cc. Ceux-ci sont placés dans une centrifugeuse dont la température est réglée sur 4°C. Une première centrifugation de 1800 RPM pendant 5 minutes permet de laver la suspension riche en macrophages pulmonaires. Nous obtenons un culot que nous resuspendons dans du PBS et que nous déposons sur une solution de Ficoll à densité 1,093. 30 minutes de centrifugation à 1800 RPM sont nécessaires pour obtenir un anneau riche en macrophages alvéolaires situé à l'interface Ficoll-milieu de suspension cellulaire.

Nous effectuons ensuite trois lavages avec du PBS pour éliminer le Ficoll du milieu. Après le troisième lavage, nous resuspendons le culot avec un volume précis de PBS qui nous aidera à calculer le nombre de cellules récoltées. Le comptage s'effectue au moyen d'une cellule de Burker.

Nous obtenons une population de cellules dont la composition est la suivante : environ 90 % de macrophages alvéolaires, 10 % de polymorphonucléaires et de lymphocytes et quelques globules rouges.

Afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules macrophagiques, chaque rat reçoit, quatre jours avant son sacrifice, une injection d'une solution aqueuse et stérile de thioglycollate 10 % (Difco). Le

thioglycollate est irritant et a pour effet de stimuler la réaction immunitaire de type cellulaire.

B. Technique du lavage bronchoalvéolaire pour obtenir des macrophages alvéolaires humains.

Un fibroscope est bloqué dans le lobe inférieur ou dans le lobe moyen du poumon droit (Haslam, 1984).

Une vingtaine de ml d'un liquide physiologique est injecté au moyen d'une seringue. L'aspiration du liquide injecté se fait immédiatement et en douceur; le liquide est recueilli dans un récipient auquel les cellules n'adhèrent pas ou très peu, comme par exemple, le verre siliconé.

L'opération est répétée environ 5 fois jusqu'à une injection de 100 ml de solution physiologique (Hunninghake et al., 1980).

La récupération est d'environ de 40 à 60 % du liquide injecté.

3.2.2. Culture des macrophages alvéolaires.

Pour chaque expérience, une fois que l'isolement des cellules a été réalisé, une fraction des macrophages est directement fixée à la glutéraldéhyde 2 % dans du cacodylate 0,05 M et du CaCl_2 0,05 %.

Avec le reste du lot nous réalisons différentes fractions, chacune correspondant à un temps de culture bien spécifique.

Les macrophages alvéolaires peuvent être cultivés de deux façons : soit on les laisse adhérer à une surface, soit ils restent en suspension dans un liquide.

Nous avons choisi la seconde méthode pour standardiser les expériences.

Comme milieu de culture permettant au macrophage de se "nettoyer", nous avons choisi du RPMI avec 10 ou 20% de sérum. Le RPMI est un milieu riche en acides aminés, vitamines, etc...;il assure également la fourniture en ions indispensables à la mise en mouvement du macrophage (émission de pseudopodes), à savoir les ions Ca^{++} et Mg^{++} .

Le sérum mis dans le milieu de culture est du sérum frais. Lorsqu'il s'agit d'incuber des macrophages humains, nous utilisons le sérum du malade (sérum homologue). Nous qualifions donc ce sérum de sérum inflammatoire. Son rôle est d'accélérer le processus d'activation du macrophage vu sa richesse en anticorps et médiateurs (lymphokines).

La culture requiert une température de 37°C et un bain qui permet l'agitation des tubes contenant les milieux de suspension des cellules.

3.2.3. Etude de la capacité fonctionnelle du macrophage alvéolaire.

Comme il a déjà été évoqué, cette étude est réalisée sur des macrophages alvéolaires de rat et humains.

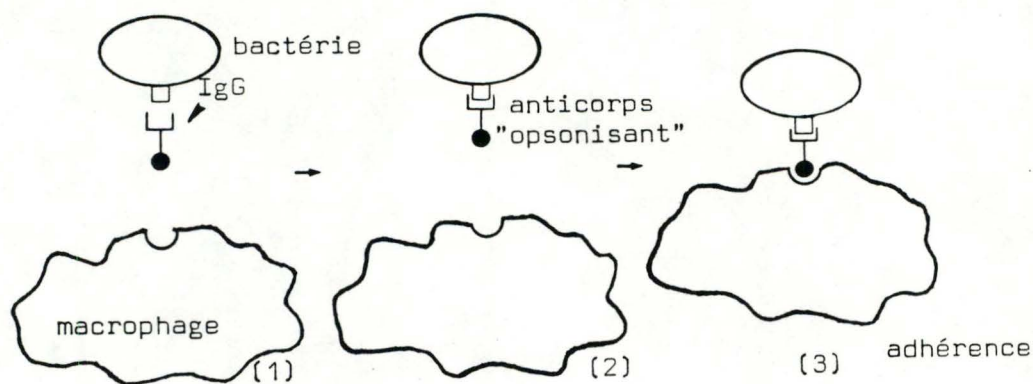
Il est à rappeler que les macrophages humains sont tous issus de cas pathologiques. Sur les macrophages de rat, nous avons effectué cette étude fonctionnelle en comparant des macrophages non stimulés à des macrophages stimulés.

1) La phagocytose.

Après avoir cultivé in vitro nos macrophages alvéolaires, nous avons étudié leur capacité de rephagocyter des microorganismes tels que des microcoques (*Micrococcus lysodeikticus*).

* Opsonisation des microcoques.

Les microcoques sont opsonisés pour faciliter leur phagocytose.



Nous mettons en présence :

- 1 ml d'une suspension de microcoques à une concentration de 5 mg/ml PBS.
- 2,5 ml de PBS.
- 500 l de sérum de rat normal.
- 100 l de sérum anti-microcoques de lapin (dilution : 1/50).

Cette suspension de microcoques est placée dans un bain à 37°C sous

agitation, pendant 30 minutes. Une centrifugation à 5000 RPM pendant 5 minutes nous permet d'obtenir un culot contenant les microcoques. Deux lavages supplémentaires avec du PBS éliminent l'excès d'anticorps. Le culot est finalement resuspendu avec du PBS.

* Phagocytose proprement dite.

Elle débute avec l'incubation à 37°C des microcoques dans le milieu de culture contenant les macrophages alvéolaires.

Après 30 minutes, la suspension cellulaire (macrophages alvéolaires et microcoques) est fixée avec de la glutéraldéhyde 2 % tamponnée au cacodylate 0,05 M/CaCl₂ 0,05 %.

* Préparation des cellules pour leur observation au microscope électronique.

Une première fixation de 5 minutes est réalisée avec de la glutéraldéhyde 2 % (il en a été question juste avant).

Après cette fixation rapide, les cellules sont postfixées au tétroxyde d'osmium 2 % (OsO₄ de J.M.C. Precious métal Products) tamponné au cacodylate 0,05 M/CaCl₂ 0,05 %. La postfixation dure environ une heure.

Un lavage avec un tampon cacodylate 0,05 M/CaCl₂ 0,05 % élimine l'excès de tétroxyde d'osmium.

Nous commençons ensuite l'étape de la déshydratation cellulaire : les culots cellulaires sont trempés dans différents bains d'éthanol de concentration croissante (25° 100°).

L'inclusion des cellules est effectuée dans de l'épon (TAAB).

L'observation des cellules au microscope optique (MO) précède la réalisation de coupes ultrafines pour la microscope électronique. Des coupes de 1 µm d'épaisseur sont étalées sur des lames, colorées avec du bleu de toluidine (0,2 %) et observées au grossissement 100 du microscope optique. Cette première observation nous permet de sélectionner les parties intéressantes à regarder de plus près au microscope électronique à transmission (TEM).

Les coupes ultrafines ont une épaisseur de 400 Å environ; elles sont déposées sur des grilles. Le TEM exige, comme le MO, de contraster le matériel à observer. Ce contraste est obtenu avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de Plomb.

2) Mise en évidence des phosphatases acides.

Ce test a été réalisé d'une part, sur des macrophages alvéolaires issus de rats non stimulés, et d'autre part, sur des macrophages issus de rats stimulés au thioglycollate et sur des macrophages cultivés in vitro avec du sérum BCG.

* Réactions.

Les phosphatases acides sont des enzymes sécrétés par le macrophage alvéolaire qui peuvent être colorés selon la réaction suivante :

- fixation du glycérophosphate de Na sur l'enzyme.
- addition de nitrate de Pb ($Pb(NO_3)_2$) enzyme + glycérophosphate de Pb

précipité brun visible
au TEM

Le fluorure de Na (NaF) inhibe la réaction Pb et glycérophosphate.

Cette coloration enzymatique peut être visible au MO en ajoutant 20 % de sulfure d'ammonium ($(NH_4)_2S$) tamponné au sucrose 7,5 % / CaCo 0,05 M / $CaCl_2$ 0,05 %. Nous laissons agir pendant une minute avant de rincer avec du tampon sucrose. La coloration résulte de la précipitation du soufre.

* Préparation des culots cellulaires.

Nous avons besoin de tubes à centrifuger en cellulose nitrate (N° 303369 size 5/16 dia X1-15/16).

Les cellules sont fixées pendant une minute avec de la glutéraldéhyde 5 % tamponnée au Cacodylate 0,1 M / $CaCl_2$ 0,1 %.

Nous effectuons ensuite trois rinçages avec du tampon sucrose.

Les cellules sont en culot. Nous leur ajoutons 2 à 3 gouttes de fibrinogène 1 % dilué dans du PBS. Après les avoir remises en suspension, nous ajoutons encore une goutte de thrombine (Topostasine - flacon de 3000 U à diluer dans 5 ml d' H_2O) avec une seringue tuberculine.

Une agitation délicate permet d'obtenir un culot cellulaire pris dans une sorte de gel.

Le fond du tube est découpé afin de décoller le culot. Celui-ci est déposé sur la table du cryostat. Les coupes à congélation ont une épaisseur supérieure à 40 microns; elles sont recueillies dans du tampon sucrose.

* Incubation.

Lors de chaque expérience, nous avons réalisé une fraction test et une fraction témoin.

Solution préparée pour la fraction test :

- 40 ml H₂O
- 20 ml Pb(NO₃)₂ 15 mM (à filtrer)
- 20 ml tampon acétate de Na 0,1 M à PH 5
- 20 ml glycérophosphate de Na 5 mM à PH 5.

Solution préparée pour la fraction témoin :

- 20 ml tampon acétate de Na 0,1 M à PH 5
- 20 ml Pb(NO₃)₂ 15 mM (à filtrer)
- 20 ml glycérophosphate de Na 5 mM à PH 5
- 40 ml NaF 25 mM.

Le nitrate de Plomb est préparé le jour de son utilisation; il en est de même pour la solution de fibrinogène.

Une fois que les solutions test et témoin sont préparées, nous y ajoutons les coupes.

Une incubation de 30 minutes à 37°C sous agitation est suffisante pour que le plomb précipite.

Les coupes sont ensuite rincées trois fois dans du tampon sucrose.

* Préparation des cellules pour la microscopie électronique.

Nous commençons par une postfixation d'une heure avec de l'osmium 2 % tamponné au cacodylate 0,05 M / CaCl₂ 0,05 %. L'excès d'osmium est éliminé par un lavage avec du tampon sucrose.

Les cellules sont ensuite déshydratées avec une concentration

croissante d'éthanol. Cette déshydratation se fait un peu plus rapidement.

La suite des opérations est identique à celle de la préparation classique.

3) Une technique d'étude quantitative : le FACS.

Le FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter de Becton-Dickinson) est un appareil qui analyse et trie en même temps les cellules. Il effectue cette analyse de façon rapide et sa sensibilité est très élevée.

Dans le cas qui nous intéresse, il analyse la phagocytose de particules fluorescentes.

L'avantage de cette technique réside en la mesure simultanée et corrélative de plusieurs paramètres relatifs aux cellules. Ces paramètres sont le scatter, l'intensité de fluorescence et le nombre relatif de cellules (cellules macrophagiques dans notre cas); ils peuvent être regroupés en un graphique à trois dimensions (Fig.24).

Le scatter représente l'intensité de la lumière diffusée par la cellule ayant été frappée par la source lumineuse; il est directement proportionnel à la taille cellulaire.

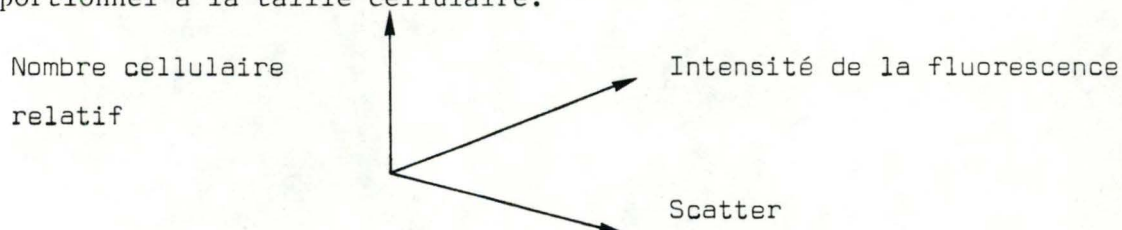


Fig.24 Graphique tridimensionnel regroupant trois paramètres relatifs aux cellules fluorescentes.

Principe de fonctionnement :

Les cellules sont injectées par un système hydropneumatique dans un flux de liquide dont la vitesse est constante (12 m/sec); elles sont entraînées une à une (1000/sec). Un laser à argon est à l'origine d'une source de lumière monochromatique venant frapper les cellules. Si le fluorochrome utilisé est de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la longueur d'onde choisie pour exciter les molécules de FITC est de 488 nm.

Les cellules vont interagir avec le laser et les conséquences de cette

interaction sont, d'une part, la diffusion dans toutes les directions de la lumière frappant la cellule et d'autre part, l'absorption de la lumière associée à une longueur d'onde de 488 nm de la part des cellules marquées par du FITC. Celles-ci réémettent ensuite une fluorescence verte de longueur d'onde de 517 nm. Comme cette longueur d'onde est supérieure à celle du laser, il est aisé de différencier les cellules véritablement associées à des molécules de FITC des autres cellules émettant une autofluorescence naturelle.

Fluorescence et diffusion sont captés par un système de détecteurs convertissant l'énergie photonique en énergie électrique. Celle-ci est amplifiée et comprise par un dispositif informatisé qui présente les données sous forme de cytogramme, d'histogramme ou encore sous forme de représentation isométrique pouvant être vue de façon aérienne.

Grâce au FACS, les cellules peuvent également être triées une à une. Il est possible d'évaluer l'existence de sous-populations cellulaires (cellules de grande taille et cellules de petite taille, par exemple). Nous pouvons également orienter notre analyse vers une sous-population particulière qui nous semblerait plus intéressante.

Fluorescéinisation des microcoques.

Du tampon NaHCO_3 0,1 M de pH 9 à la concentration de 10 mg/ml est utilisé pour remettre en suspension les microcoques lyophilisés qui seront marqués ultérieurement à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

La méthode de marquage est la suivante : nous mélangeons volume à volume la suspension de microcoques avec la solution de FITC dont la concentration est de 0,5 mg/ml tampon carbonate. Ensuite, le mélange est incubé à 4°C pendant une durée de 24 heures et dans l'obscurité. Le marquage des microcoques s'effectuera si ces conditions sont réalisées.

Suite à cette incubation, nous effectuons deux lavages dans un tampon phosphate pour éliminer un excès de molécules de FITC (non fixées sur les microcoques). Des bactéries fluorescentes peuvent être stockées à une température de -20°C et à l'abri de toute luminosité.

Phagocytose des microcoques fluorescents.

Nous avons effectué nos expériences sur des macrophages alvéolaires issus de rats stimulés au thioglycollate.

La phagocytose s'est déroulée dans un milieu de RPMI additionné de 10 % de sérum frais homologue. En effet, les cellules macrophagiques ont d'abord été mises en culture à 37°C, sous agitation et pendant des durées allant de 30 minutes à 4 heures. Un temps zéro (témoin négatif) est également réalisé afin de différencier l'autofluorescence naturelle de la véritable fluorescence de la part des cellules. Suite à cela, nous procédons à l'incubation des microcoques fluorescés dans le milieu de suspension des cellules macrophagiques. Ainsi débute la phagocytose. Elle s'est effectuée à une température de 37°C, sous agitation et pendant 30 minutes. Le rapport nombre de microcoques par macrophage est de 50/1 car des expériences préliminaires effectuées au département ont montré que sous ce rapport, le FACS donnait une meilleure reproductibilité des résultats. Nous arrêtons la phagocytose en fixant les cellules à la paraformaldéhyde (1 % dans du PBS). Ce fixateur est caractérisé par une faible autofluorescence naturelle. Après la fixation, nous soumettons les microcoques à l'action du lysozyme afin que les cellules fluorescentes ne soient plus que les macrophages alvéolaires. Ensuite le FACS analyse chaque échantillon comportant un minimum de 5000 cellules (analyse de 1000 cellules par seconde).

Phagocytose de billes de latex fluorescentes.

Les expériences ont été réalisées sur des macrophages alvéolaires issus de rats stimulés au thioglycollate.

Nous avons choisi des billes de latex-FITC (Polysciences) de 0,1 μ m de diamètre.

Comme pour les microcoques fluorescés, la phagocytose de billes de latex-FITC s'est effectuée dans un milieu de culture auquel est ajouté 20 % de sérum frais homologue. Cette phagocytose dure de 15 à 30 minutes. Le rapport du nombre de billes de latex-FITC par macrophage est de 10/1.

Nous avons réalisé des temps de culture allant de 2 h à 5 h ainsi qu'un temps zéro (témoin négatif).

4. RESULTATS DE L'ETUDE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES DE RAT.

4.1. Obtention ces cellules macrophagiques par lavage broncho-alvéolaire.

Pour obtenir le matériel qui nous intéresse, c'est-à-dire des macrophages alvéolaires, nous avons sacrifié des rats de souche Wistar de 120 à 300 gr et procédé à la réalisation de lavages broncho-alvéolaires.

Les rats ont été élevés dans des conditions normales : ils sont disposés dans des cages dont la litière est constituée de sciure de bois, dans une pièce (animagerie) où la température est réglée sur 22°C et l'atmosphère saturée à 50-60 %, et maintenus dans un cycle d'illumination diurne (12 heures de réveil et 12 heures de sommeil). Nous avons qualifié ces rats de rats "normaux". En effet, de leur vivant, ces rats n'ont été soumis à aucun traitement particulier. Cependant, et c'est le propre de tout être vivant, le rat ne vit pas dans un environnement stérile : il inhale continuellement un air chargé en poussières provenant notamment de la litière sur laquelle il repose.

Dans un premier temps, il nous paraissait intéressant de voir quel aspect ont les macrophages alvéolaires issus de tels rats.

Nous nous attendions à récolter une population de cellules hétérogène, c'est-à-dire de taille et d'aspect différents. Pourquoi ?

La sauvegarde des alvéoles contre un bombardement constant de cellules douées d'activités phagocytaires. Lorsque nous effectuons le lavage broncho-alvéolaire, nous devrions obtenir, d'une part, des cellules macrophagiques résidentielles, c'est-à-dire qui occupaient le territoire alvéolaire depuis un certain temps et d'autre part, des cellules nouvellement arrivées dans les alvéoles par le phénomène de diapédèse des monocytes sanguins.

Ce phénomène est accentué lorsque l'intégrité de l'organisme est menacée. Nous constatons alors un afflux de cellules dans les sacs aériens qui grossit la population macrophagique déjà présente.

Notre intention a alors été de provoquer cette diapédèse chez le rat en lui injectant, par voie intrapéritonéale, un liquide irritant qui est la solution de thioglycollate. Cette injection se fait quatre jours avant le sacrifice des rats car c'est après ce laps de temps que nous obtenons le plus grand nombre de cellules.

Ainsi, nous nous sommes préoccupés de voir quel aspect ont les macrophages alvéolaires lorsqu'ils sont récoltés, d'une part, à partir de rats normaux et d'autre part, à partir de rats stimulés au thioglycollate.

Pour cela, nous avons réalisé des fractions de cellules macrophagiques que nous qualifions de cellules témoins : dès que le lavage broncho-alvéolaire était réalisé, les cellules étaient fixées directement par la glutaraldéhyde 2 % tamponnée au cacodylate 0,05 M / CaCl₂ 0,05 % à un pH de 7,4.

A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux".

Nous avons obtenu une population de cellules généralement sphériques.

Les cellules macrophagiques ont leur membrane plasmique hérissée de microvillosités (**mv**). Le contenu cytoplasmique est hétérogène, principalement en ce qui concerne les cellules de plus grande taille. Cette hétérogénéité est en relation avec le nombre variable, la taille et le contenu des phagolysosomes (**pl**). Le cytoplasme contient également des mitochondries (**mt**), du réticulum endoplasmique granulaire développé (**reg**), des ribosomes (**rb**), quelques dictyosomes (**dt**) (unités formant l'appareil de Golgi) dont nous distinguons les citernes et les vésicules (Fig.25) (Fig.26). La forme du noyau diffère : il est soit réniforme, soit la forme plus irrégulière (Fig.27); il possède un nucléole (**nu**) et sa chromatine est finement granuleuse.

Ce sont des signes d'activité au niveau du cytoplasme et au niveau du noyau (activité de synthèse). Le nucléole est un organite responsable de la synthèse des acides ribonucléiques des ribosomes (rRNA) (Maillet, 1975).

Les cellules montrent également une importante activité de pinocytose (Fig.28).

Les cellules que nous avons donc récolté ne présentent pas une intense activité de phagocytose, du moins, en ce qui concerne la phase d'adhérence du macrophage à du matériel (poussières, débris cellulaires, etc...) qui serait phagocyté. En effet, nous observons une membrane plasmique seulement hérissée de microvillosités avec parfois la présence de petits lamellipodes (**lp**) (Fig.29). La quantité de phagolysosomes varie d'une cellule à l'autre : certaines en

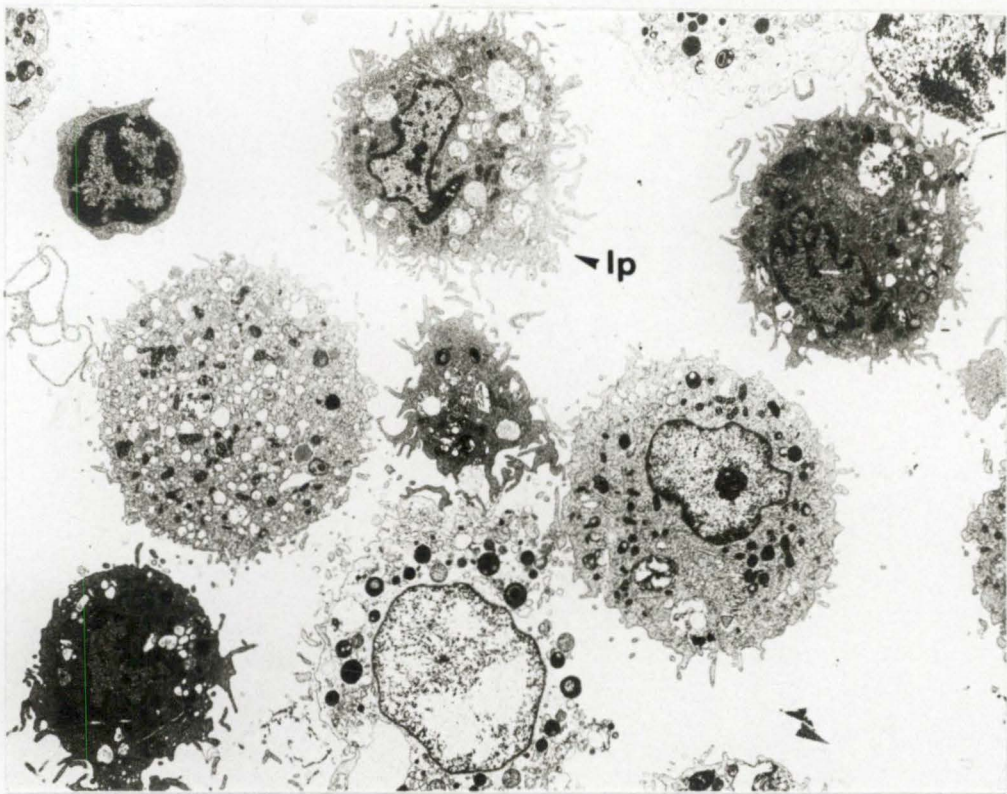


Fig. 29. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
(Gross. 3.850).

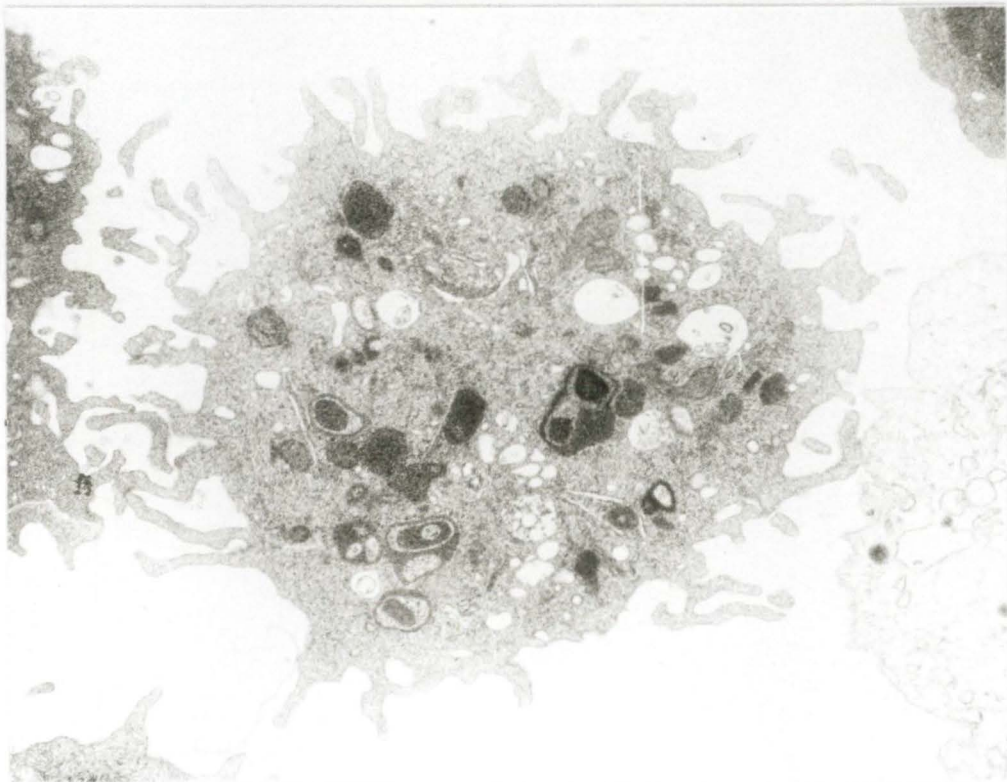


Fig. 30. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
(Gross. 12.000).

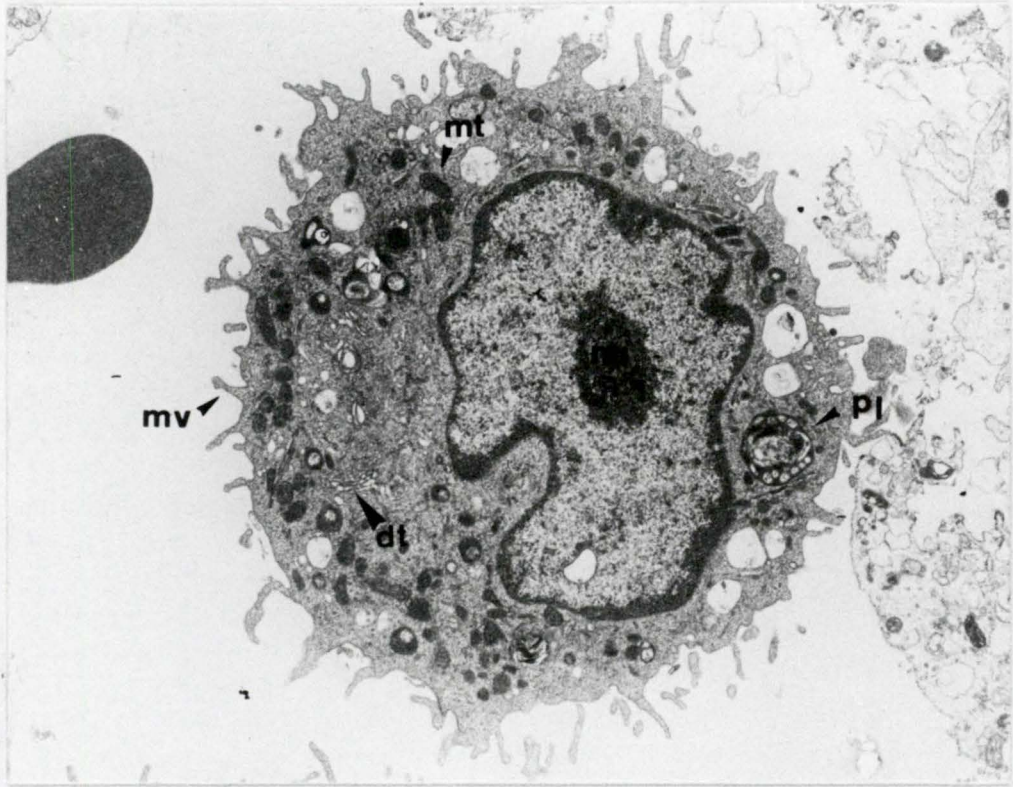


Fig. 25. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
(Gross. 7.800).

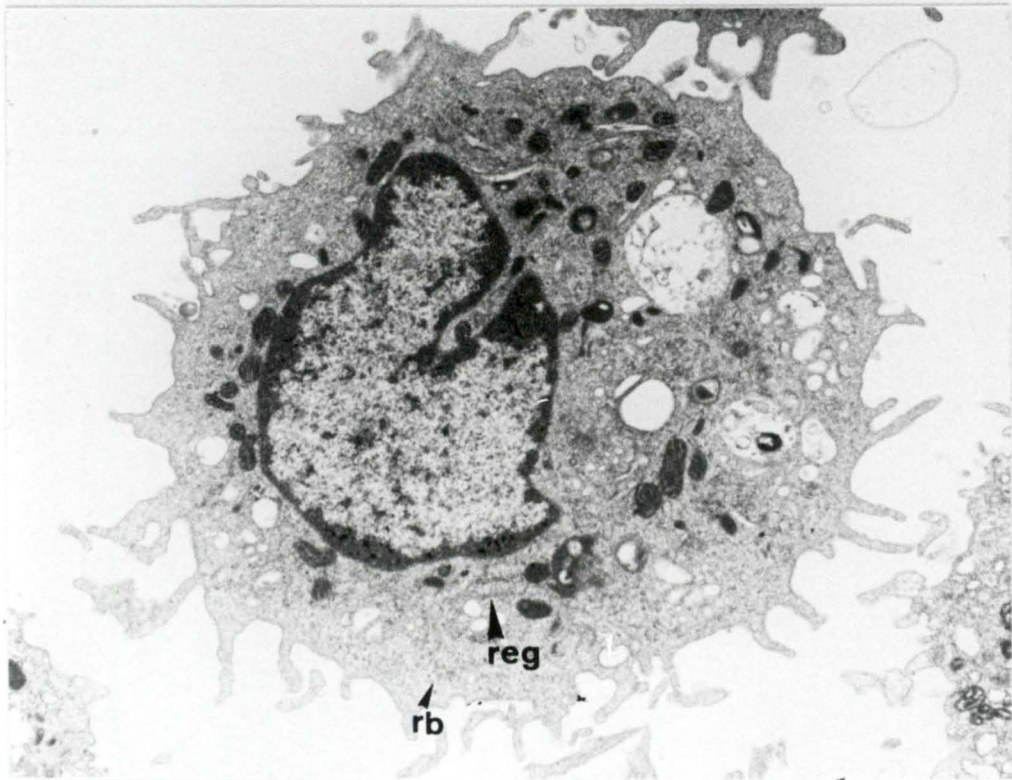


Fig. 26. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
(Gross. 11.175).

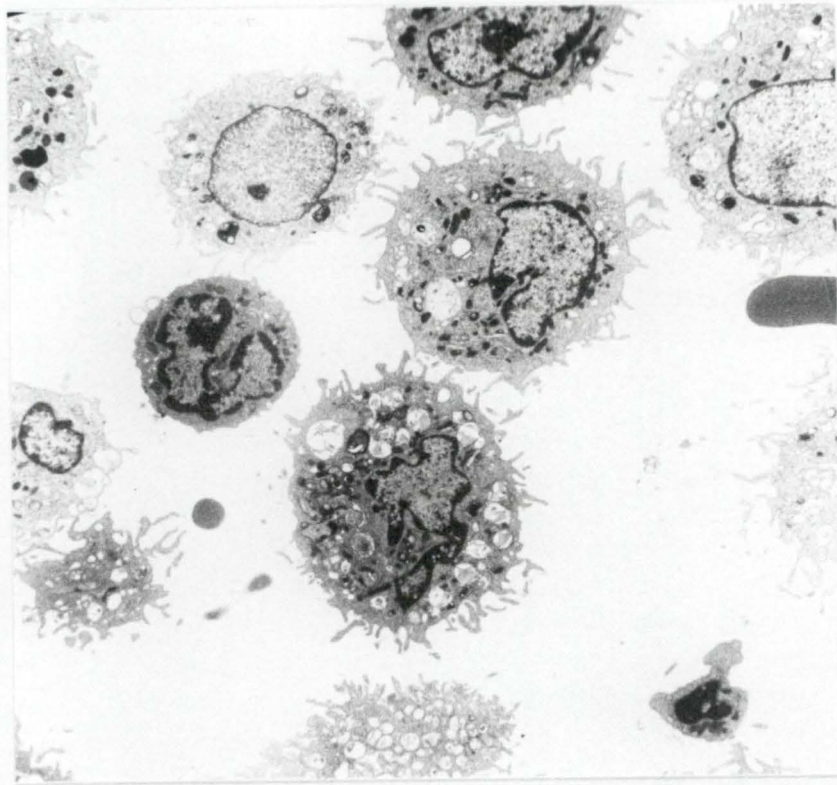


Fig. 27. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
(Gross. 6.705).

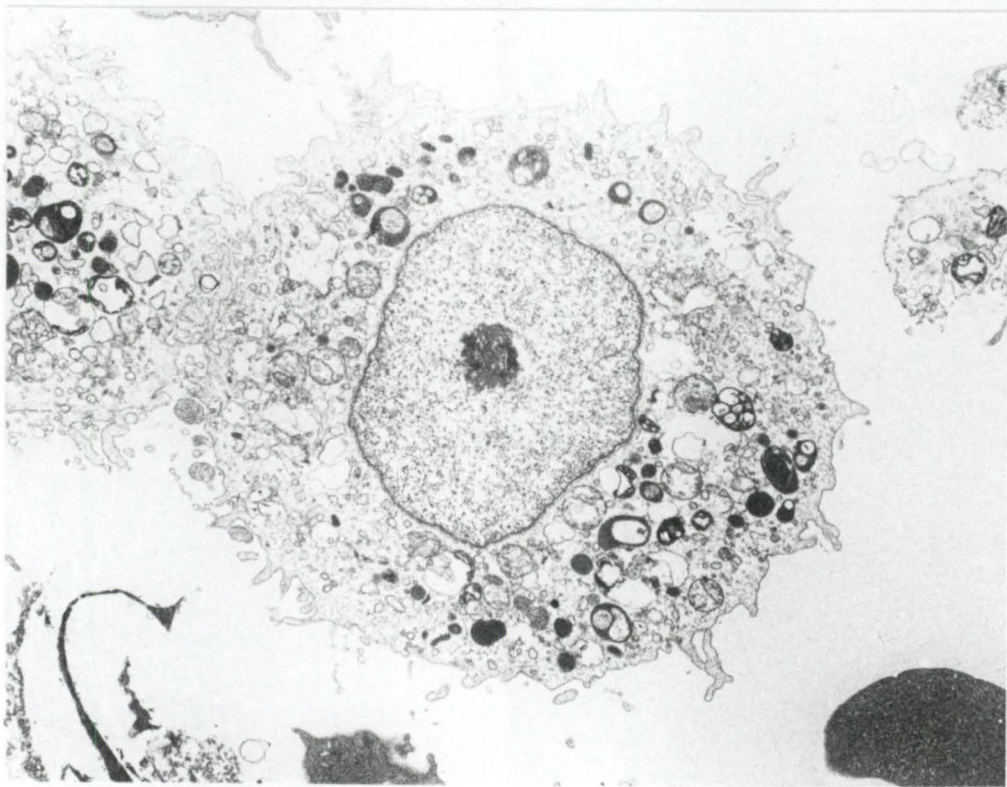


Fig. 28. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
(Gross. 7.800).

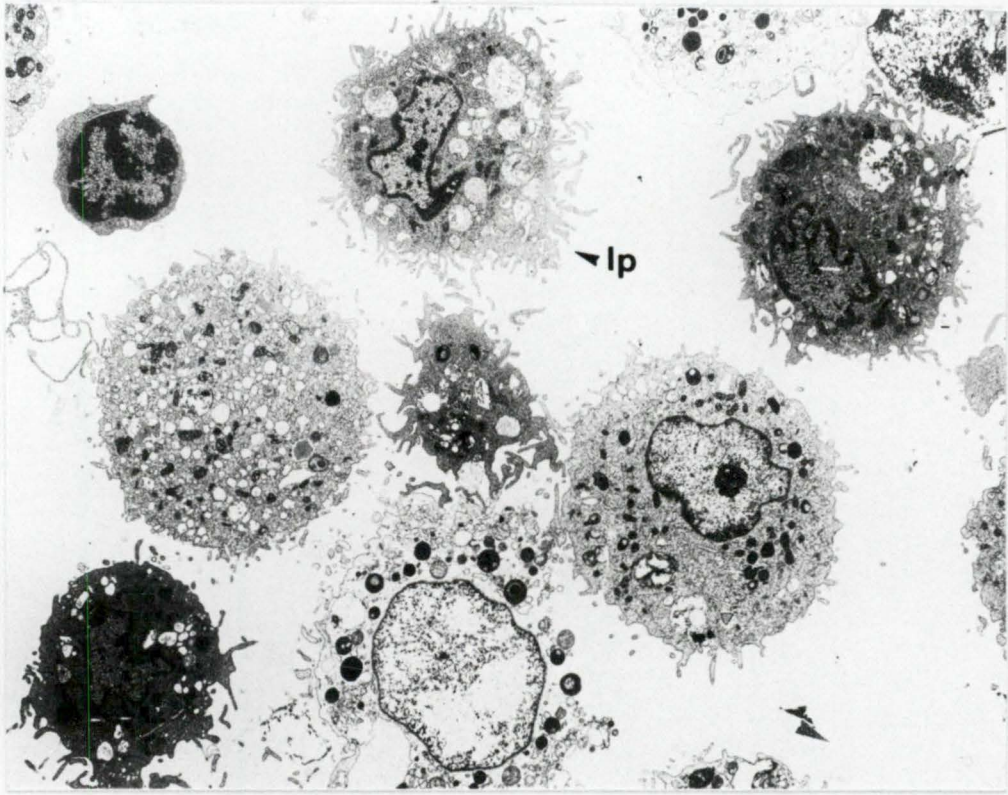


Fig. 29. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux"
(Gross. 3.850).

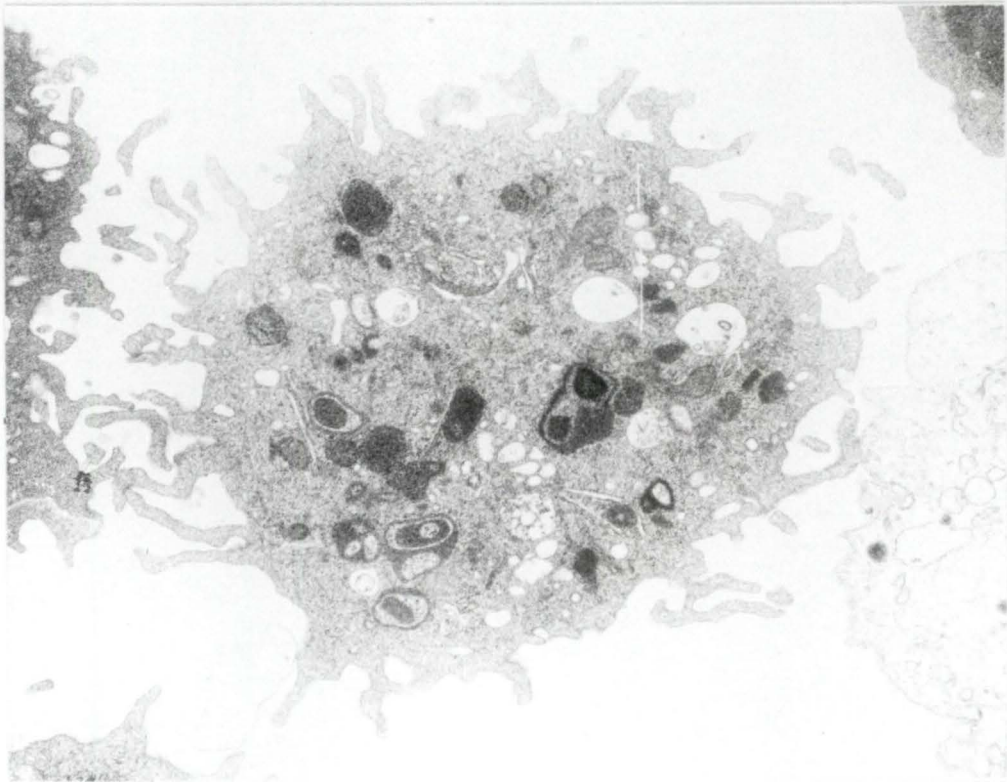


Fig. 30. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
(Gross. 12.000).

contiennent beaucoup et sont quasi dépourvues d'organites; ce seraient des cellules assez âgées. D'autres en sont encore assez pourvues mais des organites sont bien présents (Fig.30), ce qui signifie que ce seraient des cellules encore capables de fonctionner. Enfin, nous observons des cellules sans phagolysosomes et possédant beaucoup d'organites (Fig.27). Ce sont des cellules qui n'ont sans doute pas eu beaucoup l'occasion d'exercer leur fonction de phagocytose dans le compartiment alvéolaire (cellules jeunes).

B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate.

Comme nous l'avons déjà signalé, la solution de thioglycollate est un liquide irritant qui alerte le système immunitaire, et plus particulièrement, l'immunité à médiation cellulaire. Il s'ensuit une accentuation du phénomène de diapédèse.

Nous avons constaté que la plupart des cellules ont un cytoplasme rempli de phagolysosomes assez hétérogènes qui sont parfois volumineux. Certains de ces phagolysosomes contiennent des corps lamellaires qui pourraient être du surfactant ou des débris membranaires (Fig.31).

La taille et la forme sont deux caractéristiques qui varient assez bien.

Nous remarquons la présence de petites cellules sphériques contenant un noyau réniforme avec un nucléole. Ces cellules sont cependant assez rares. Elles possèdent des organites reflétant une activité de synthèse à savoir un appareil de Golgi bien développé, de nombreux canaux de réticulum endoplasmique granulaire, des ribosomes, beaucoup de mitochondries et des lysosomes primaires. Leur noyau est réniforme et il contient un nucléole. Leur membrane plasmique ne présente pas de digitations.

Les cellules de plus grande taille, quant à elles, sont soit de forme sphérique, soit de forme plus irrégulière seraient des cellules en pleine activité de phagocytose de matériel présent dans les alvéoles (poussières, particules organiques ou minérales, etc...) étant donné la présence de lamellipodes.

Malgré la présence de leurs nombreux phagolysosomes, les grandes

cellules ont un cytoplasme riche en organites. En effet, nous observons des mitochondries, énormément de ribosomes disposés en amas et de canaux de réticulum endoplasmique granulaire et beaucoup de petites vésicules blanches qui pourraient être des vésicules golgiennes. Le noyau est souvent d'aspect réniforme et il contient un nucléole.

Nous observons aussi de grandes cellules au cytoplasme blanchâtre et floconneux contenant cependant beaucoup de phagolysosomes. Ces cellules semblent complètement dégénérées ou, du moins, sur le point de dégénérer.

Leur noyau n'a pas l'aspect d'un noyau en pleine activité.

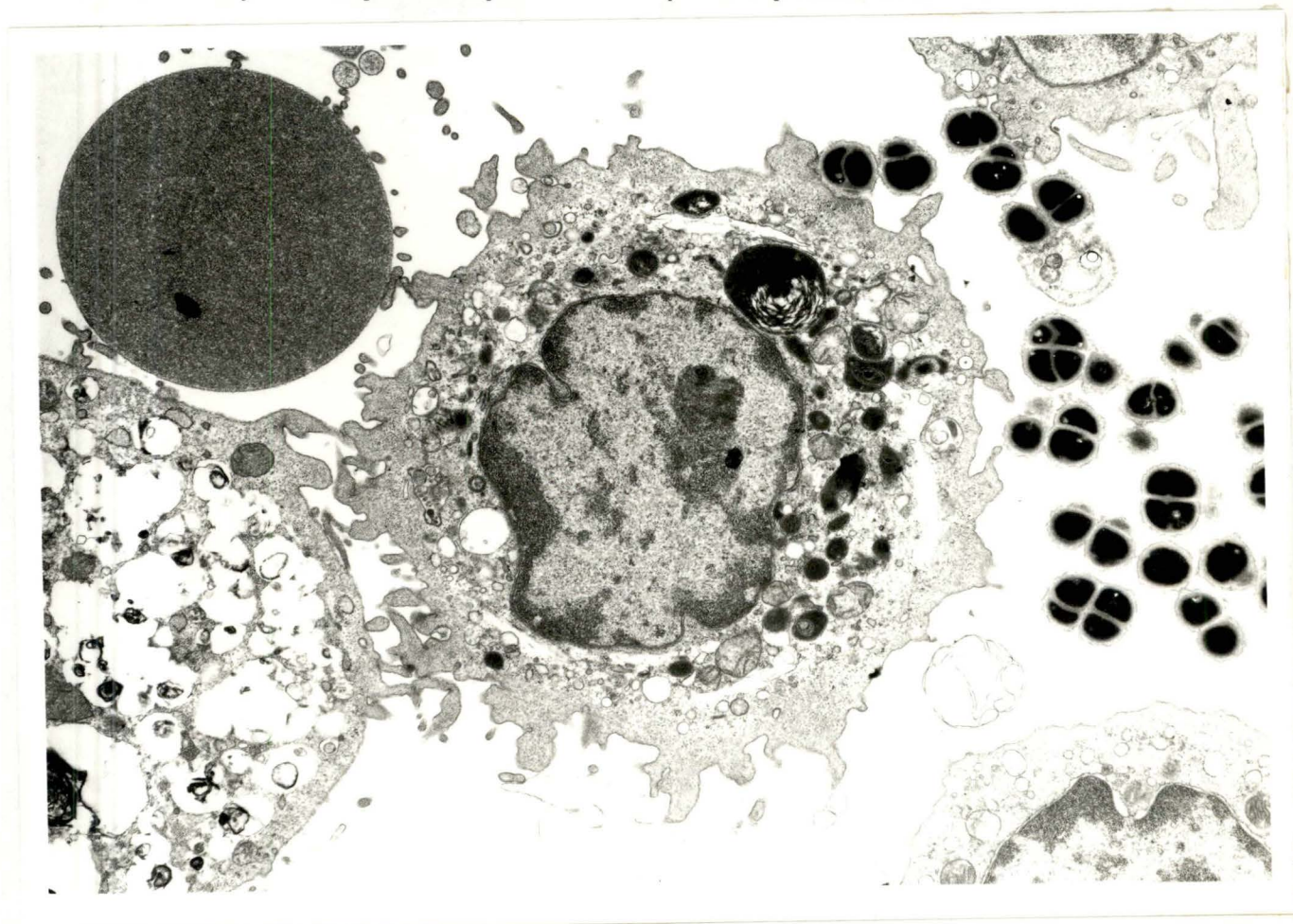


Fig.31. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.
Témoin négatif d'une phagocytose de microcoques fluorescents.
(Gross. 9.000)

4.2 Etude de la capacité fonctionnelle des macrophages alvéolaires.

Des travaux réalisés auparavant au département notamment, ont montré que les macrophages péritonéaux, forment une population macrophagique plus homogène que celle occupant les compartiments alvéolaire chez le rat "normal".

La différence d'environnement explique probablement ces différences morphologiques. En effet, un macrophage alvéolaire est constamment sollicité par une grande diversité d'agents (organiques, minéraux ou inertes). Ce n'est pas le cas d'un macrophage résidentiel occupant la cavité péritonéale car il n'est pas ou peu en contact avec le monde extérieur.

La plupart des macrophages alvéolaires récoltés par lavage sont remplis de phagolysosomes. Nous nous sommes alors demandés s'il n'y avait pas moyen de débarrasser ces cellules de tout ce qu'elles auraient pu ingérer au cours de leur séjour dans les alvéoles. Pour cela, nous les avons soumis à des cultures à court terme. Nous avons choisi les temps de culture en fonction d'expériences préliminaires effectuées au laboratoire. En effet, il a été constaté que le macrophage alvéolaire, en comparaison avec le macrophage péritonéal, a besoin d'un temps de culture plus long pour se libérer de tous les déchets qu'il renferme.

Dans quel but souhaitons-nous que cette cellule macrophagique se débarrasse de tout le matériel phagocyté auparavant dans les alvéoles ? Nous cherchons à savoir, si grâce à cela, les macrophages alvéolaires sont encore capables d'exercer la fonction de phagocytose. Pour cela, nous avons étudié leur morphologie lorsqu'ils sont impliqués dans une phagocytose de microcoques (*Micrococcus lysodeikticus*).

Afin d'effectuer une analyse plus précise de la phagocytose de particules, nous avons tenté d'utiliser la technique d'étude de la phagocytose en cytométrie de flux. Cette technique requiert la fluorescence du matériel à analyser; dans notre cas, il s'agit des particules qui seront phagocytées par les macrophages.

Cette méthode aurait dû nous permettre de trier les cellules macrophagiques en fonction de leur taille et en fonction de l'intensité de leur fluorescence. Ainsi nous pourrions être renseignés, d'une part, sur les pourcentages relatifs aux tailles

cellulaires de la population macrophagique alvéolaire et d'autre part, sur l'éventuelle corrélation entre la taille cellulaire et la quantité de particules fluorescentes phagocytées.

Cependant, pour exercer la fonction de phagocytose, le macrophage a besoin d'un équipement enzymatique adéquat.

Nous avons donc commencé par essayer de détecter la présence d'une catégorie d'enzymes à savoir les phosphatases acides. Nous avons réalisé ces expériences de détection enzymatique sur des macrophages alvéolaires témoins et sur des macrophages cultivés, appartenant à des niveaux croissants de stimulations.

Il était en effet intéressant de savoir si des macrophages ayant déjà été sollicités auparavant peuvent, par des stimulations à des degrés croissants, resynthétiser et rephagocyter.

4.2.1. Détection enzymatique.

Nous avons choisi de mettre en évidence les phosphatases acides.

Notre curiosité s'est d'abord portée sur la quantité de phosphatases que nous pourrions trouver chez des macrophages alvéolaires issus de rats "normaux".

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonction de synthèse enzymatique, d'une part, chez des macrophages provenant de rats stimulés par du thioglycollate et d'autre part, chez des macrophages activés par du sérum produit à partir de rats stimulés par du BCG (Bacille de Calmette et Guérin).

Les macrophages alvéolaires, issus de rats stimulés par du thioglycollate ont également été soumis à des cultures à court terme afin de voir si, dans ces conditions, nous n'assisterions pas à une modification du taux de synthèse enzymatique.

Il est à remarquer que pour obtenir des cellules en culot pour la réalisation ultérieure de coupes ultrafines, nous avons dû ajouter 2 à 3 gouttes de fibrinogène dans la suspension des cellules; c'est pour cette raison que la microscopie électronique nous montre des cellules entourées de fibrine.

A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux".

Après avoir effectué le lavage broncho-alvéolaire, les cellules macrophagiques sont rapidement fixées par la glutaraldéhyde à 5 % tamponnée au cacodylate 0,1 M / CaCl₂ 0,1 % dont le pH est de 7,4. La détection des phosphatases est ensuite réalisée selon la technique décrite dans le chapitre "Matériel et Méthode".

Les cellules que nous avons récoltées présentent de nettes différences entre elles. Cependant, chez la majorité d'entre elles, nous ne distinguons pas très bien les organites. Ceux-ci sont peut-être masqués par la présence dominante de phagolysosomes et de lysosomes primaires que nous repérons facilement grâce à la mise en évidence des phosphatases. En effet, la synthèse de ces enzymes n'est pas négligeable et elle nous rend compte de la quantité de phagolysosomes et de lysosomes primaires au sein du cytoplasme de la cellule. Nous observons donc des cellules qui ne seraient pas au repos. En ce qui concerne la membrane plasmique, elle apparaît souvent hérissée de microvillosités de longueur moyenne (Fig.32).

D'autres cellules présentent un cytoplasme très vacuolisé et d'aspect floconneux (Fig.33). Nous observons des phosphatases mais nous les distinguons assez difficilement (la précipitation du plomb serait plus faible en raison d'une synthèse enzymatique moins importante). Seraient-ce des cellules en dégénérescence ? Cette proposition n'est pas insensée étant donné que les macrophages alvéolaires sont des cellules continuellement sollicitées et que par conséquent, leur capacité fonctionnelle diminue avec la durée de leur séjour dans les alvéoles. Il semblerait d'ailleurs qu'elles soient quasi dépourvues d'organites; leur noyau a un aspect granuleux en raison d'une chromatine anormalement dispersée. De petits lamellipodes sembleraient parfois présents mais peu développés.

B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate.

* Cellules témoins.

Une fois le lavage broncho-alvéolaire effectué, les cellules récoltées sont directement fixées.

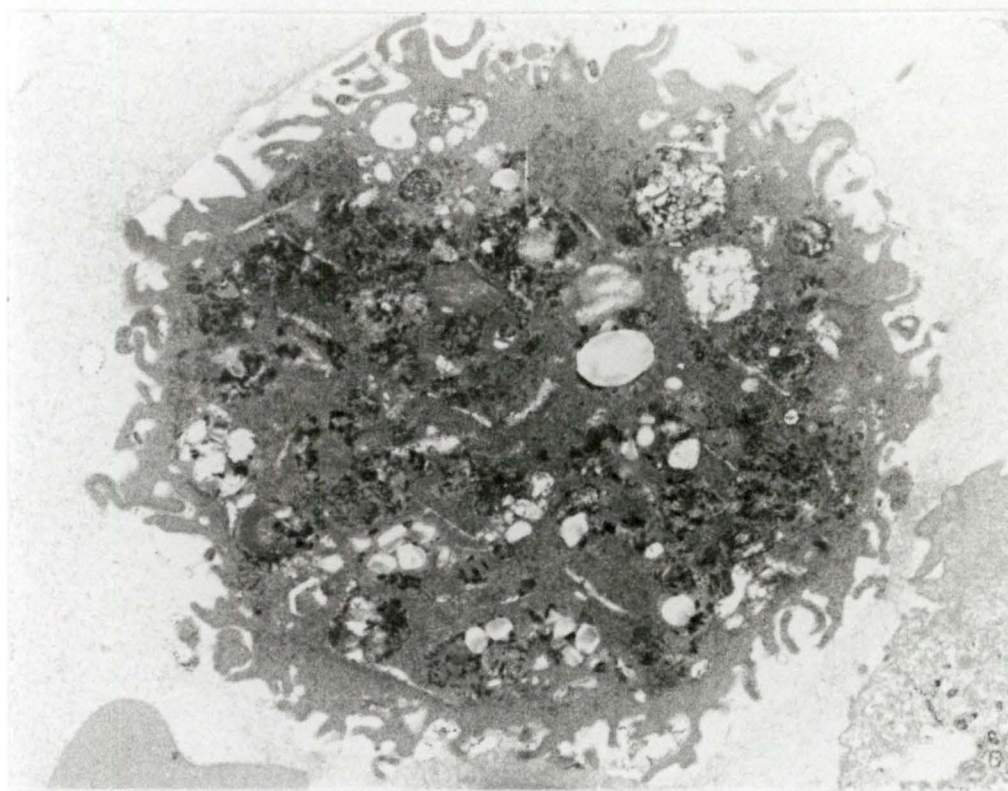


Fig. 32. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
Détection enzymatique (Gross. 14.560).

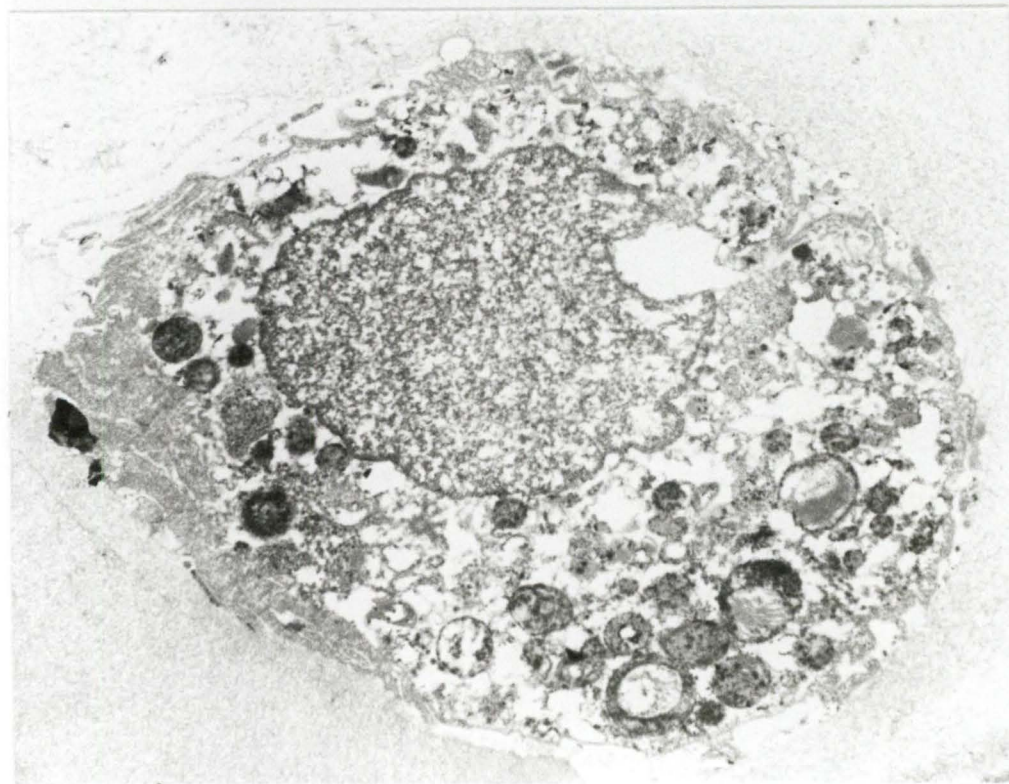


Fig. 33. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux"
Détection enzymatique (Gross. 13.440).

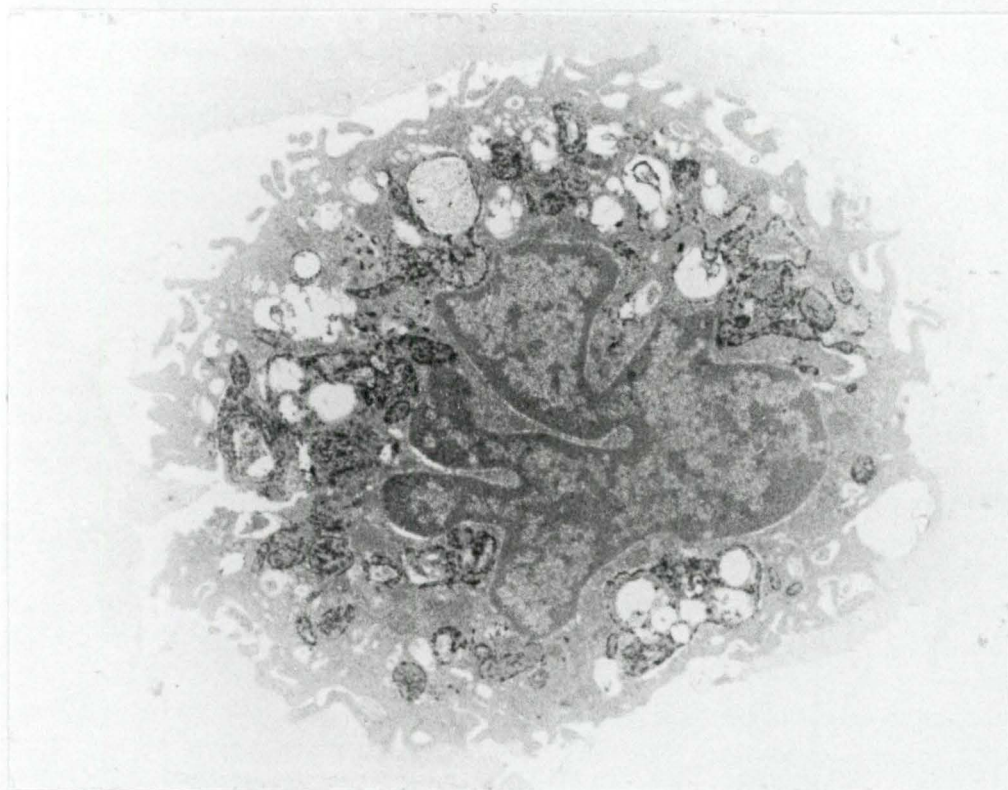


Fig. 34. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.
Détection enzymatique, cellule témoin (Gross. 8.835)

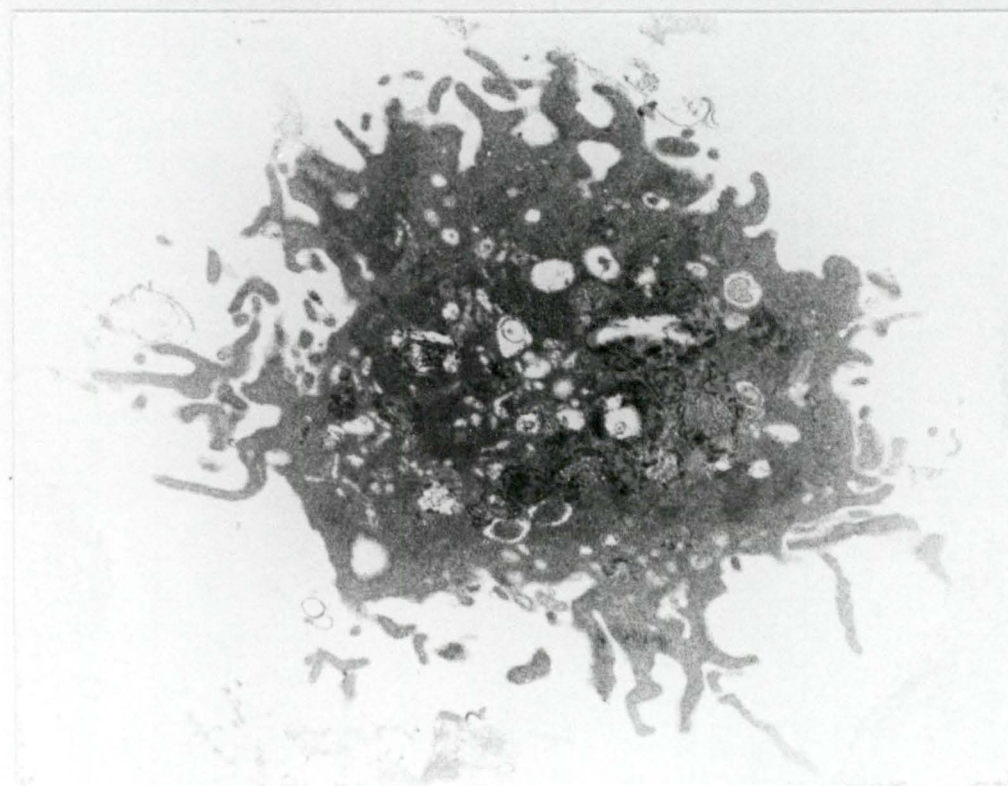


Fig. 35. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.
Détection enzymatique, cellule témoin (Gross.19.000).

Les rats utilisés pour cette expérience ont reçu chacun une injection de 5 ml d'un liquide irritant, le thioglycollate.

Leur sacrifice a eu lieu quatre jours après l'injection afin d'obtenir le plus grand nombre de cellules macrophagiques. Ceci est dû à une exsudation de monocytes vers les territoires inflammatoires. Nous qualifions ces cellules de cellules stimulées.

Les cellules que nous devrions récolter par lavage broncho-alvéolaire seraient des cellules résidentielles (cellules se trouvant déjà sur place avant la stimulation par le thioglycollate) et des cellules stimulées (nouvellement arrivées en raison de l'injection de thioglycollate).

Dans la plupart de ces cellules, nous distinguons bien les phosphatases acides au sein des phagolysosomes et des lysosomes primaires. Cela nous inciterait à penser que leur métabolisme n'est pas nul. Les uns paraissent cependant plus actives (Fig.34) que d'autres (Fig.35).

Nous observons que le cytoplasme contient des mitochondries (Fig.36), des vacuoles d'endocytose, des enclaves lipidiques (Fig.37). Ce seraient encore une fois des signes d'activité. La membrane plasmique est hérissée de microvillosités. Nous observons également quelques lamellipodes mais ils ne paraissent pas très développés (Fig.38) (Fig.37).

Certaines cellules contiennent beaucoup de vacuoles d'endocytose (Fig.37) tandis que d'autres ont un cytoplasme plus riche en phagolysosomes et lysosomes primaires (Fig.38). Les premières auraient été récoltées alors qu'elles se trouvaient dans une phase d'internalisation de matériel localisé dans leur environnement; les secondes seraient occupées à le digérer.

La forme du noyau varie d'une cellule à l'autre. Nous apercevons parfois un nucléole volumineux, signe d'une synthèse protéique importante (Fig.38) (Fig.39).

* Culture à court terme des macrophages alvéolaires.

Nous avons incubé les cellules macrophagiques dans du milieu RPMI auquel est ajouté 20 % de sérum frais homologue.

Le milieu RPMI est riche en acides aminés, vitamines et autres substances nécessaires au métabolisme de la cellule. De plus, il fournit des ions Ca^{++} et Mg^{++} indispensables notamment au

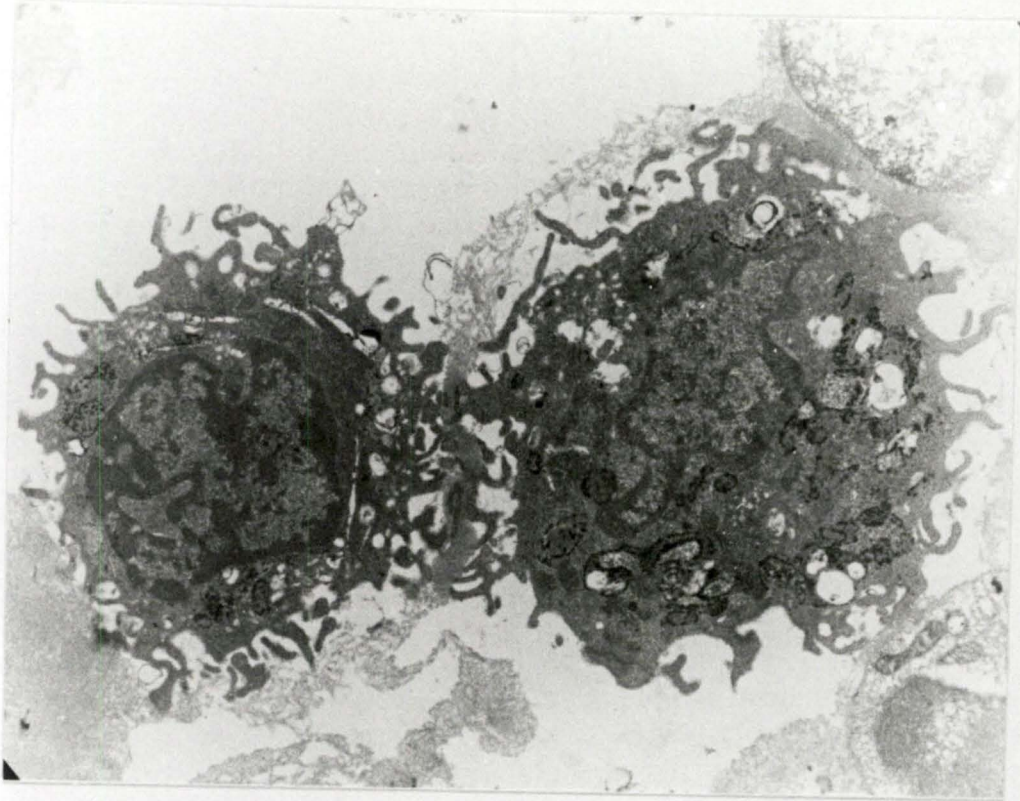


Fig. 36. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate.

Détection enzymatique, cellule témoin (Gross. 12.555)

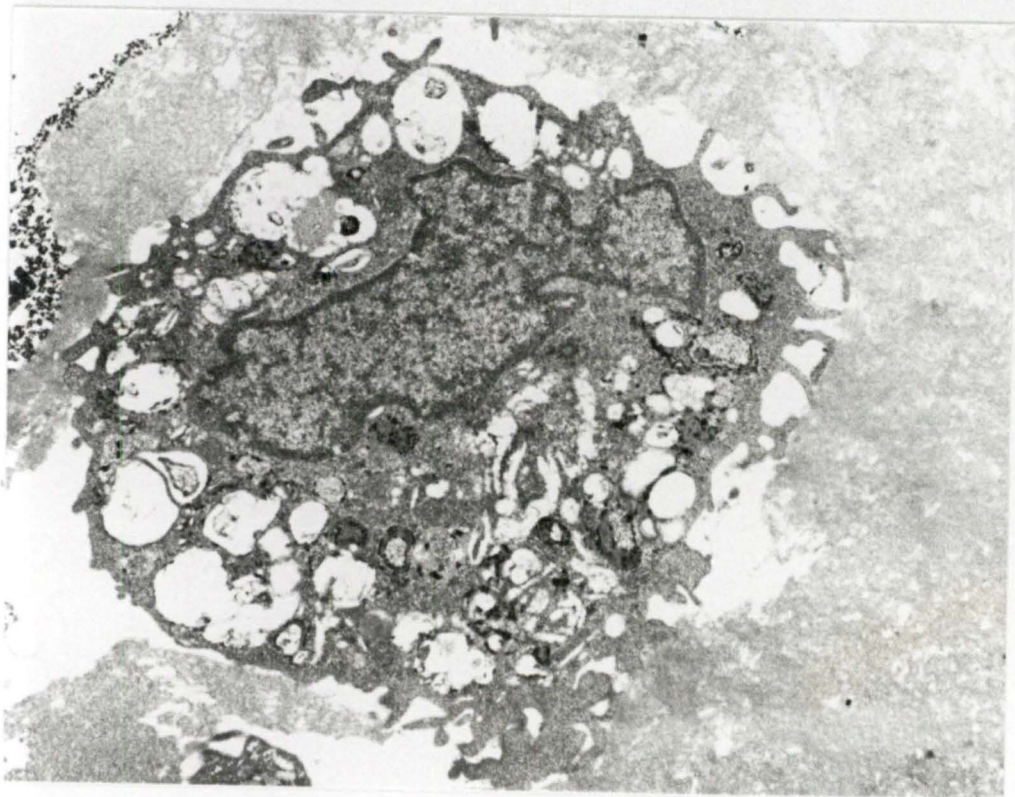


Fig. 37. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.

Détection enzymatique, cellule témoin (Gross.11.900).

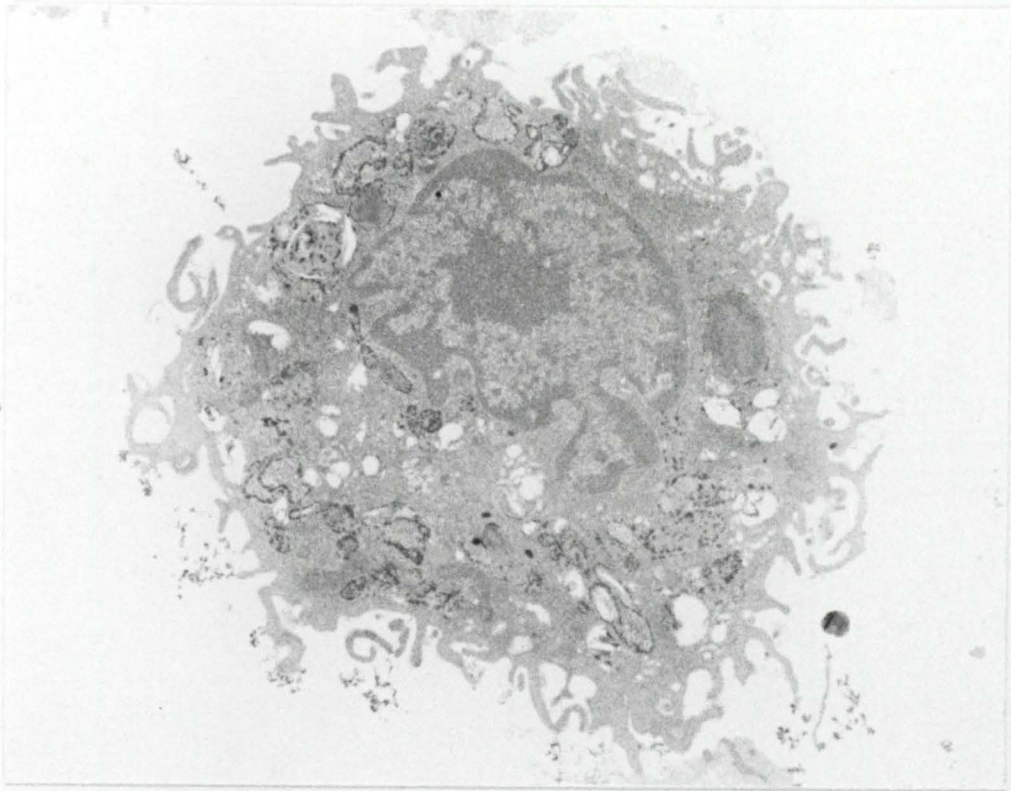


Fig. 38. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.

Détection enzymatique, cellule témoin (Gross. 11.900)

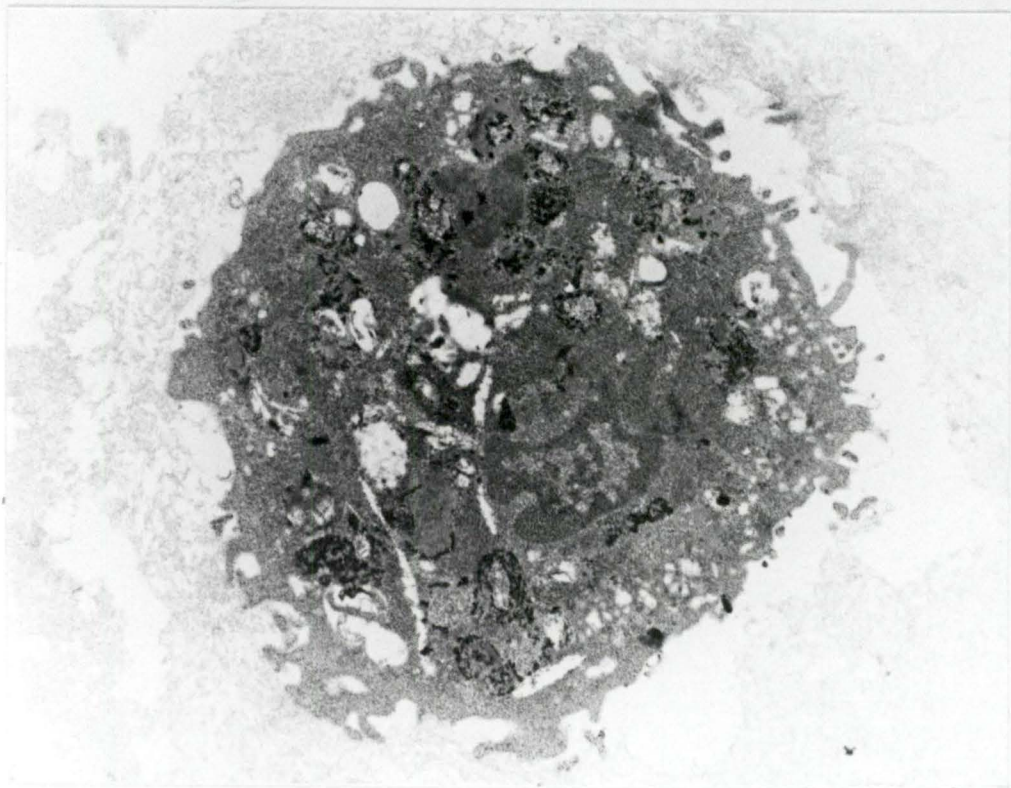


Fig. 39. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate.

Détection enzymatique, cellule témoin (Gross.14.350).

fonctionnement de l'appareil contractile de la cellule. Celle-ci devient, par conséquent, capable de développer des microvillosités et des lamellipodes.

Le sérum homologue ajouté au milieu de culture a le rôle d'activer les macrophages alvéolaires (Vray et al., 1981). Etant donné que ce sérum est issu de rats stimulés par un liquide irritant, le thioglycollate, il est qualifié de sérum inflammatoire.

Les cellules ont été incubées pendant des temps de culture de 2 h 30 et de 4 h. Ces temps sont relativement longs en raison de la quantité importante de polluants phagocytés observés chez la plupart des macrophages alvéolaires récoltés par lavage broncho-alvéolaire. En effet, notre objectif était de délivrer la cellule macrophagique de ces polluants pour pouvoir ainsi observer ultérieurement une éventuelle reformation de lysosomes primaires repérés par la localisation des phosphatases acides.

L'incubation est effectuée à la température de 37°C, sous agitation. Une fois la culture terminée, nous avons rapidement fixé les cellules et ensuite procédé à la méthode de détection enzymatique.

Culture de 2 h 30.

Nous avons constaté que les cellules possèdent, en général, un contenu cytoplasmique composé d'une quantité plus restreinte de phagolysosomes. En effet, les phosphatases sont principalement repérées au niveau de lysosomes primaires (Fig.40). Cela pourrait signifier que ces macrophages soient occupés à refaire des lysosomes primaires en vue d'une phagocytose ultérieure éventuelle.

D'autres organites sont présent dans le cytoplasme, dont des mitochondries, des ribosomes disposés en amas et du réticulum endoplasmique granulaire (Fig.40) (Fig.41). Les phagolysosomes encore présents semblent contenir du matériel moins hétérogène (Fig.40).

En ce qui concerne la forme des cellules, elle varie assez fort en raison d'une différenciation membranaire : certaines cellules ont leur membrane plasmique hérissée de microvillosités (courtes ou longues, rares ou nombreuses); d'autres développent des lamellipodes; enfin, la membrane plasmique peut former une sorte de capuchon à un pôle de la cellule (Fig.41).

Par conséquent, nous pourrions qualifier ces cellules de cellules activées.

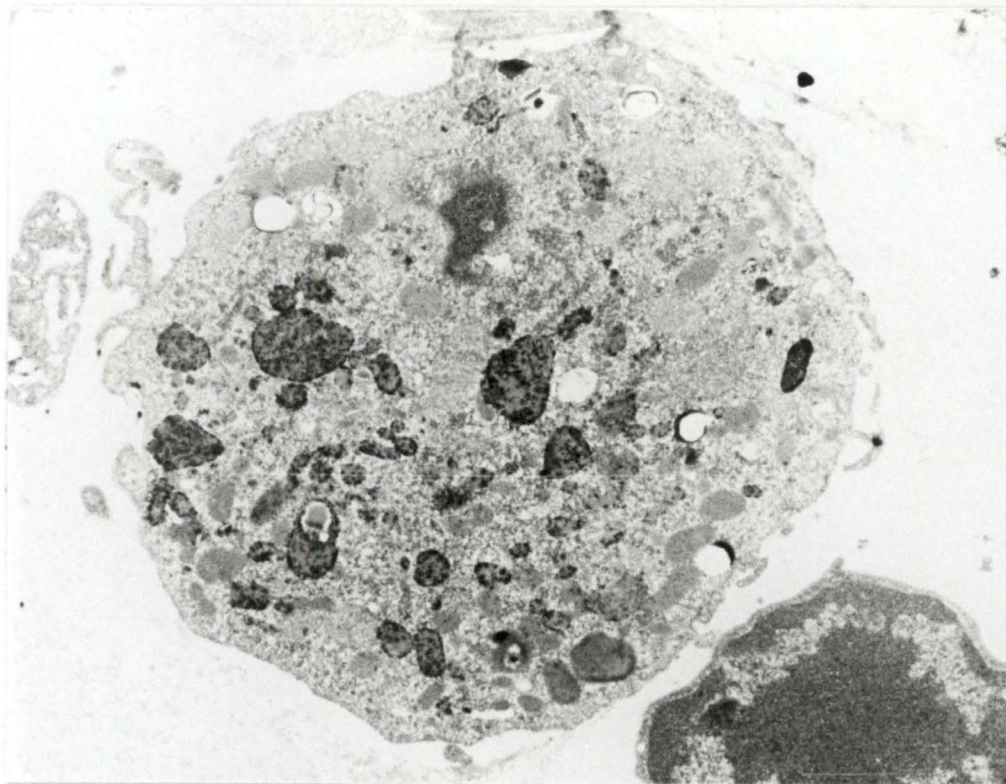


Fig. 40. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Culture de 2h30.
Détection enzymatique (Gross. 14.560)

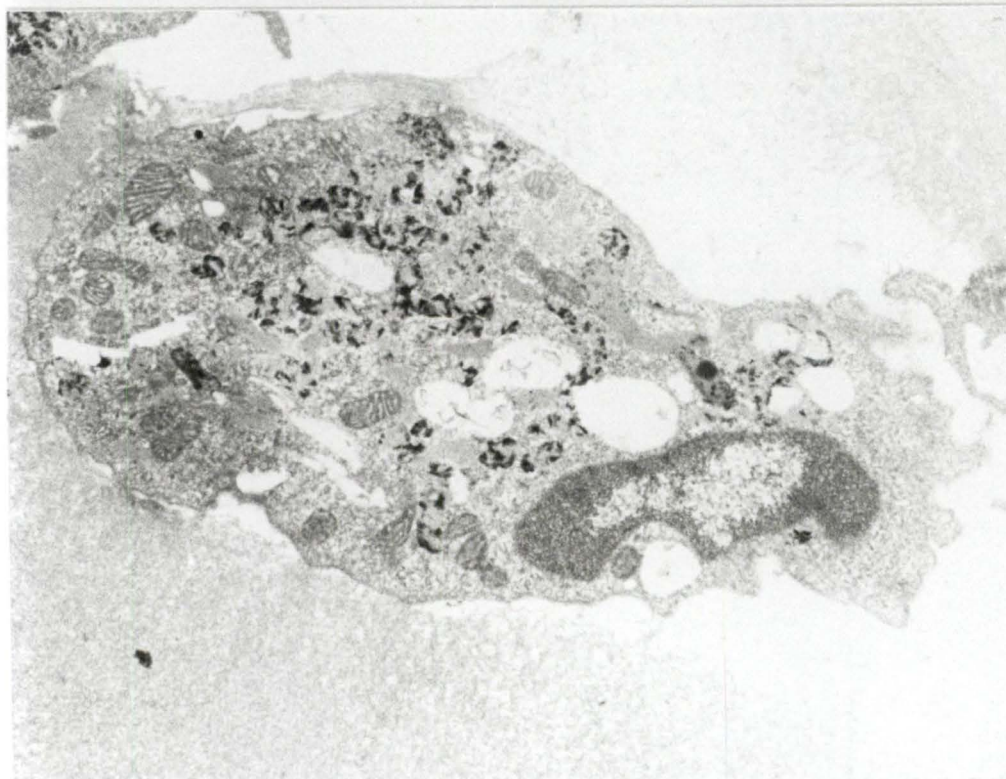


Fig. 41. Macrophage alvéolaire issus de rats stimulés par du thioglycollate. Culture de 2h30.
Détection enzymatique (Gross.15.680).

Culture de 4 h.

Nous avons remarqué que la synthèse enzymatique est moins importante que celle de la culture de 2 h 30. Cependant, nous avons observé des cellules ayant synthétisé une quantité enzymatique analogue à celle de certaines cellules de la culture de 2 h 30.

Le cytoplasme contient généralement des mitochondries, des amas de ribosomes (Fig.42) et assez bien d'enclaves lipidiques (Fig.43) (Fig.42).

Le noyau est souvent réniforme et contient une chromatine dispersée entourant un nucléole. Ce noyau paraît donc actif.

La forme des cellules est irrégulière. En effet, elles développent d'importants lamellipodes (Fig.42) qui peuvent se réunir à un pôle de la cellule pour former un capuchon (Fig.44) (Fig.45). Ces différentes observations reflètent un état d'activité cellulaire. Les cellules développant des lamellipodes seraient peut-être en train de phagocyter des éléments du milieu de culture.

C. Macrophages alvéolaires cultivés avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG.

Qu'advierait-il de la synthèse enzymatique si le macrophage alvéolaire était soumis à une activation de niveau plus élevé ?

Nous avons tenté de répondre à cette question en cultivant nos cellules dans du milieu RPMI contenant 20 % de sérum récolté chez des rats stimulés par du BCG (Bacille de Calmette et Guérin). Ce sérum est en effet très inflammatoire.

Il avait effectivement été remarqué auparavant que du sérum de rat récolté quelques jours après lui avoir injecté une suspension de BCG (Pasteur) à une concentration de 5 mg/ml PBS et mis en présence avec des cellules macrophagiques, suscite chez celles-ci un activation d'un niveau très élevé.

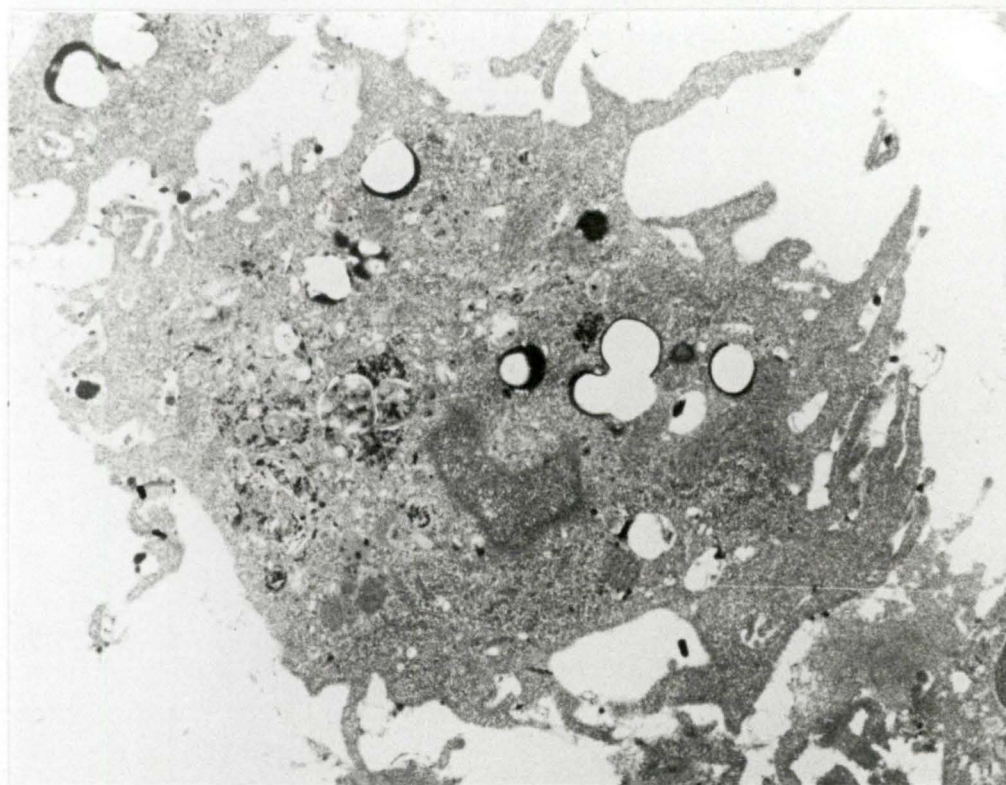


Fig. 42. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Culture de 4h.
Détection enzymatique (Gross. 14.560)

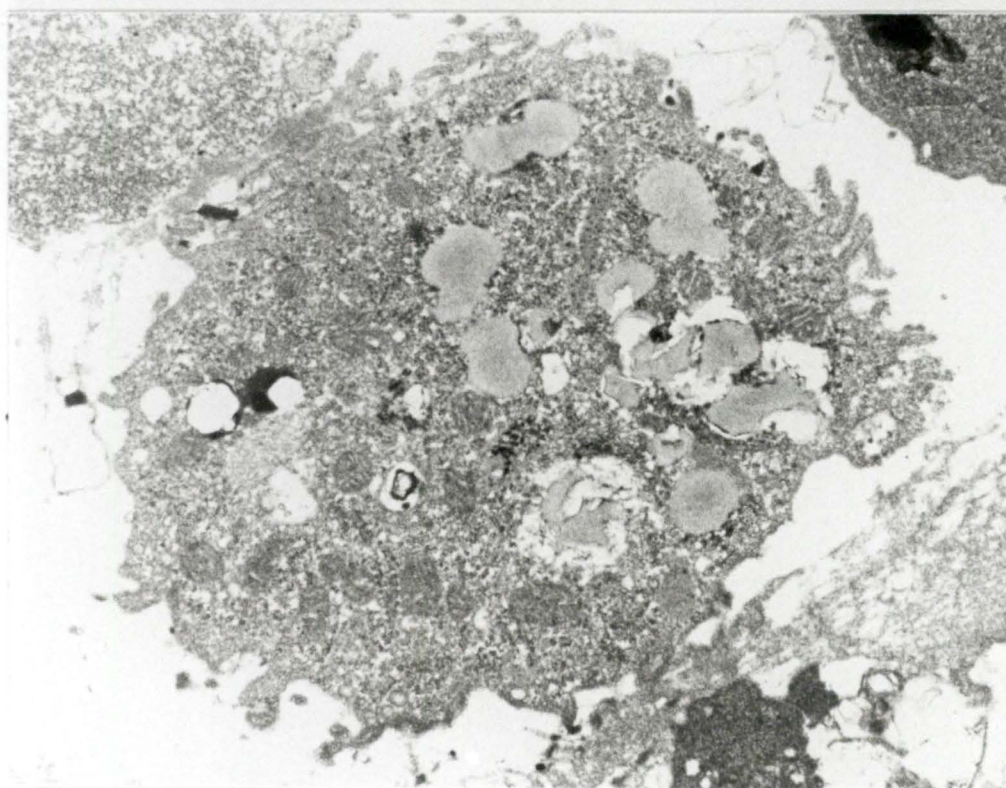


Fig. 43. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Culture de 4h.
Détection enzymatique (Gross.17.920).

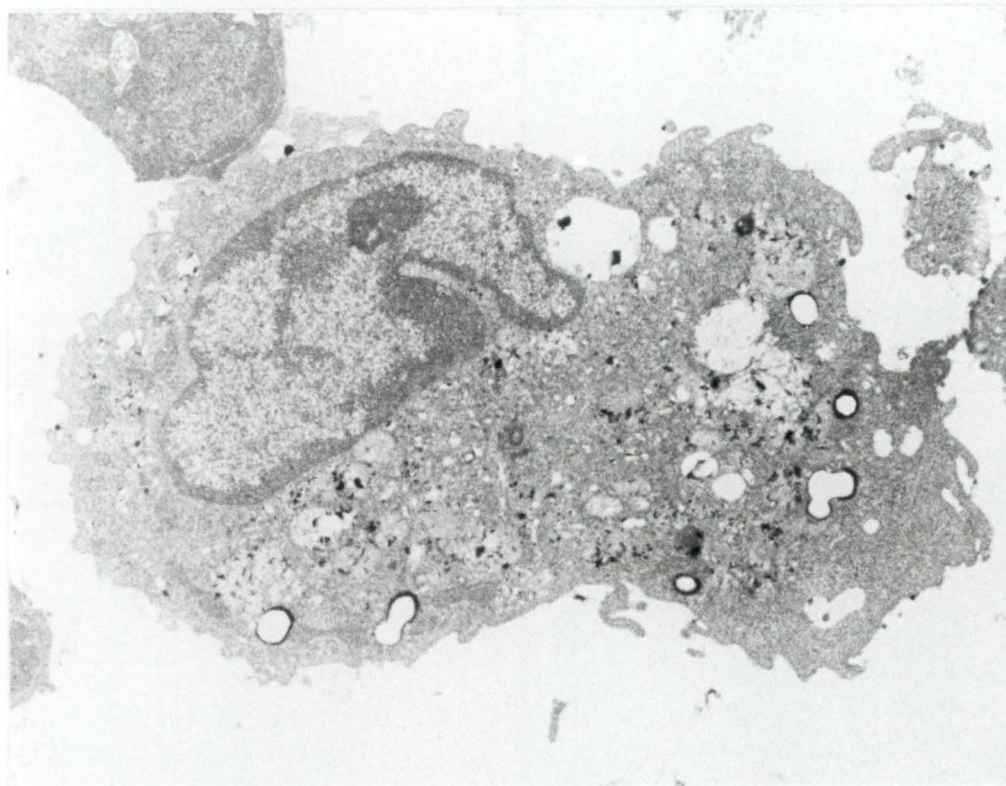


Fig. 44. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Culture de 4h.
Détection enzymatique (Gross. 10.430)

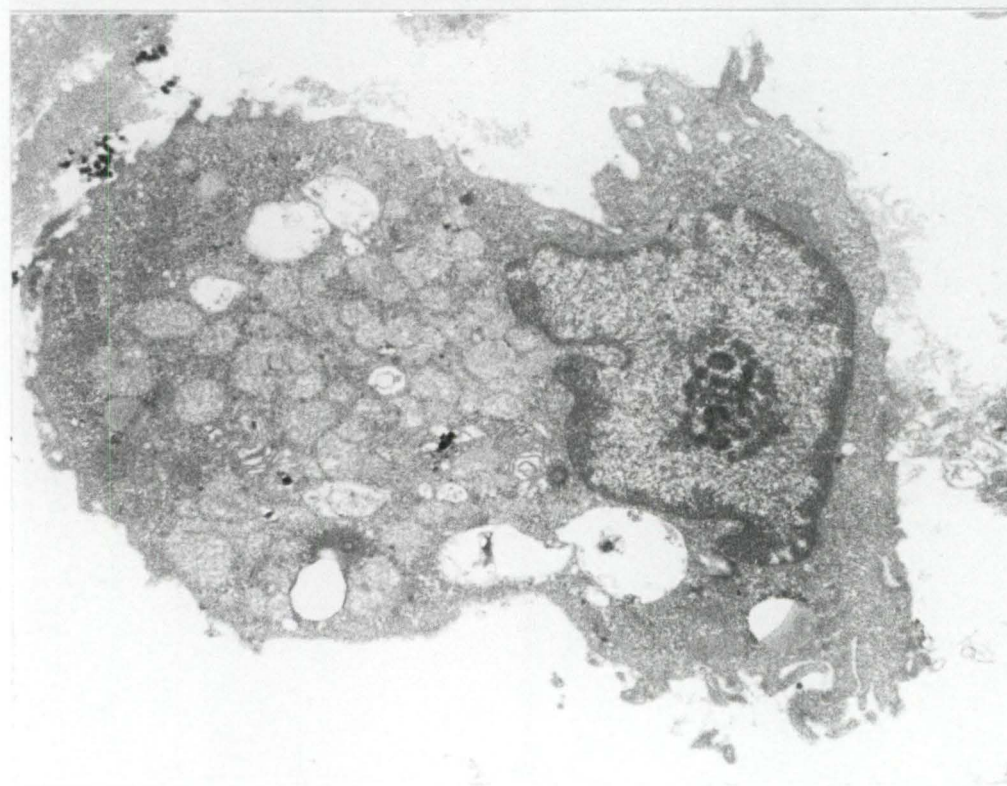


Fig. 45. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Témoin d'une culture de 4h.
Détection enzymatique (Gross.12.00).

Culture de 2 h 30.

Les cellules contiennent un taux important de phosphatases acides au sein de phagolysosomes (Fig.46) (Fig.47). Elles auraient donc été incitées à synthétiser des enzymes par un principe activant à savoir du sérum très inflammatoire.

Le cytoplasme contient également quelques mitochondries et des vacuoles renfermant probablement des éléments du milieu de culture.

La forme cellulaire est irrégulièrement ovale. En effet, les cellules développent les lamellipodes de leur membrane plasmique. Ceux-ci reflètent le bon fonctionnement de l'appareil contractile de la cellule macrophagique.

4.2.2. Phagocytose de microcoques.

Des macrophages alvéolaires appartenant à des niveaux croissants de stimulation ont été soumis à une phagocytose de microcoques (*Micrococcus lysodeikticus*). Il était, en effet, intéressant de voir si ces macrophages étaient capables de phagocyter et de mettre à profit leur équipement enzymatique pour cette fonction essentielle que représente la phagocytose.

Les cellules macrophagiques ont été incubées dans du milieu de RPMI auquel était ajouté 20 % de sérum frais homologue.

La culture requiert une température de 37°C et l'agitation des tubes contenant le milieu de suspension des cellules macrophagiques.

La phagocytose débute avec l'addition d'une suspension de microcoques à la suspension des cellules macrophagiques. Elle s'est effectuée à une température de 37°C, sous agitation, et pendant 30 minutes, après quoi les cellules ont été fixées.

A. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux".

Nous avons choisi des temps de culture de 3 h et de 4 h. Ce choix n'est pas aléatoire. En effet, la population des macrophages alvéolaires comporte toute une gamme de cellules allant des plus jeunes aux plus âgées. Ces dernières représentent des cellules qui ont séjourné le plus longtemps dans les alvéoles et qui ont, par conséquent, phagocyté un maximum de polluants divers. Or, notre

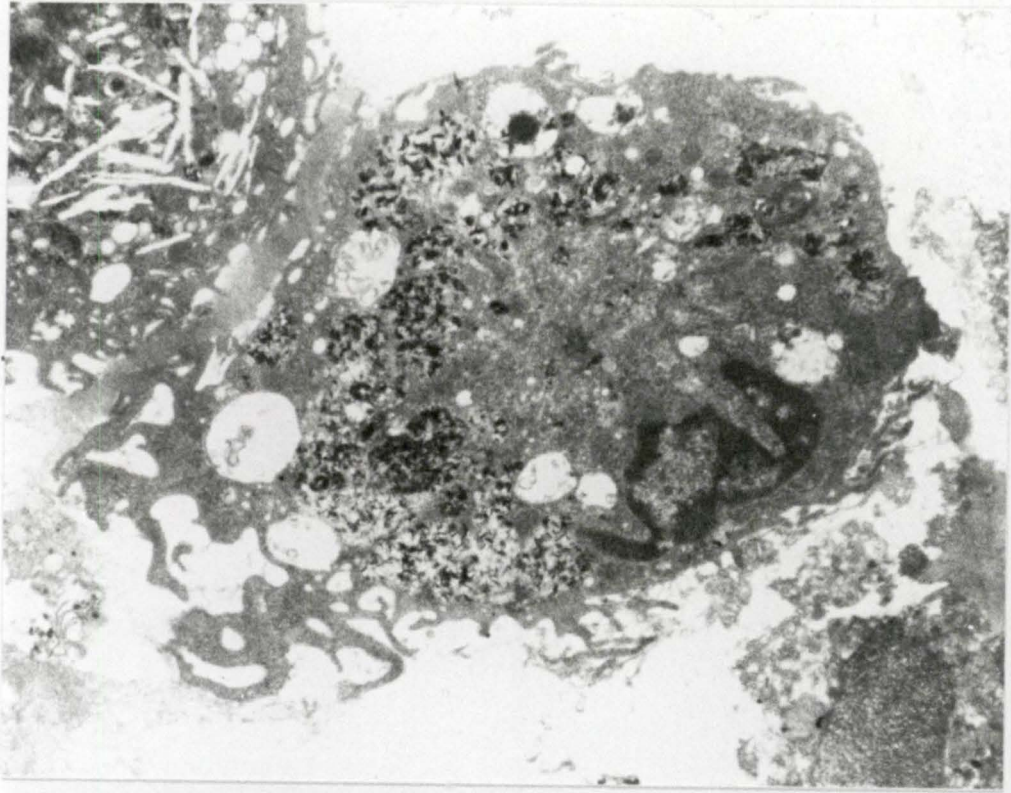


Fig. 46. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux" cultivé avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG. Culture de 2h30. Détection enzymatique (Gross. 10.000)

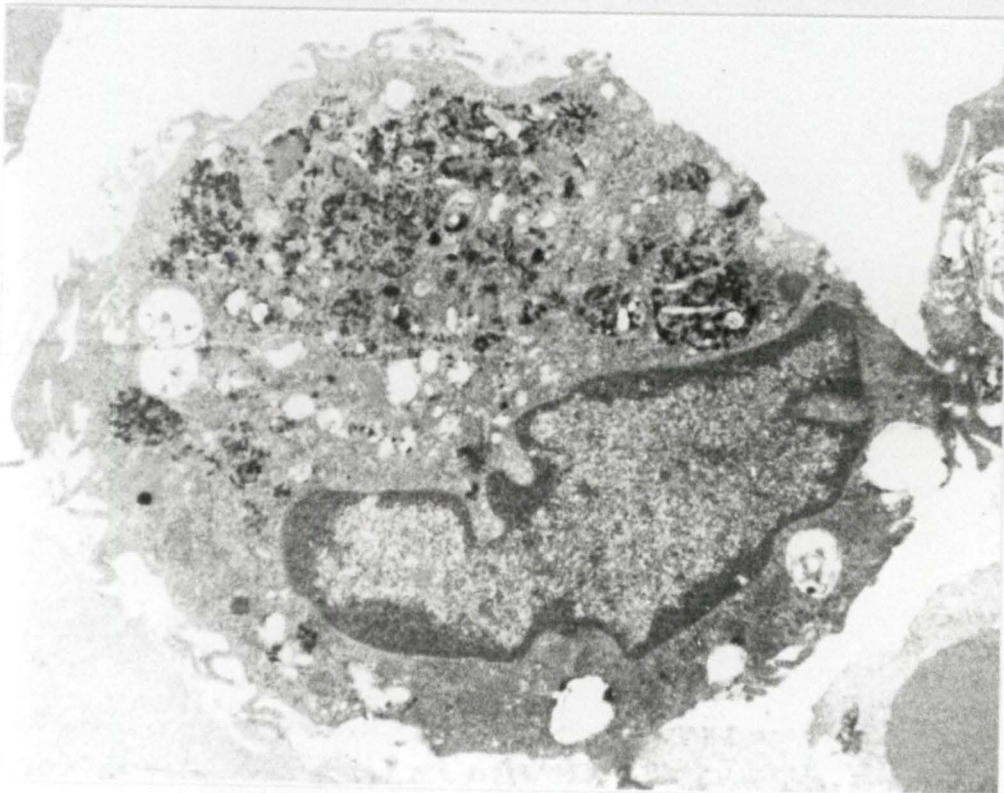


Fig. 47. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux" cultivé avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG. Culture de 2h30. Détection enzymatique (Gross. 12.350)

notre objectif était, dans un premier temps, d'obtenir des macrophages alvéolaires rendus propres (avec un nombre beaucoup plus restreint de phagolysosomes) et ensuite, de les rendre encore plus aptes à phagocyter ultérieurement (phagocytose de microcoques). En raison d'expériences préliminaires effectuées au laboratoire, des résultats satisfaisants pourraient être obtenus si nous commençons par un temps de culture plus long que pour d'autres macrophages de l'organisme.

Culture de 3 h.

Les macrophages ont une forme un peu moins sphérique que les macrophages témoins. Leur membrane plasmique est toujours hérissée de microvillosités mais celles-ci sont nettement moins nombreuses. Par contre, nous avons remarqué la présence de petits lamellipodes chez certaines cellules (Fig.48) et le développement de lamellipodes plus importants chez d'autres.

Le volume cytoplasmique a augmenté. Le cytoplasme est riche en vacuoles de tailles différentes mais assez petites pour la plupart des cellules (Fig.49). Ces vacuoles dont le contenu est pâle et homogène représenteraient des phagolysosomes renfermant des restes de bactéries lysées. Cela signifierait que ces cellules macrophagiques ne seraient pas restées indifférentes à la présence de microcoques dans le milieu de culture. D'autres vacuoles, plus rares, ont un aspect plus hétérogène. Celles-ci représenteraient plutôt des phagolysosomes contenant du matériel du milieu de culture. Des mitochondries apparaissent nombreuses et de forme variée (Fig.51). Le réticulum endoplasmique granulaire et l'appareil de Golgi sont bien développés. Les nombreux dictyosomes nous montrent leurs saccules et leurs vésicules (à différents stades de maturation) (Fig.50). Nous remarquons également la présence de fines granulations disposées en amas; elles représenteraient des ribosomes. La grande présence des divers organites que nous venons de citer signifierait que ces cellules ont tout ce qu'il faut pour stocker de l'énergie utilisée notamment dans leurs synthèses et le fonctionnement de leur appareil contractile. Le noyau a un aspect réniforme. Nous remarquons la présence d'un nucléole assez volumineux parmi une chromatine dispersée et se condensant à la périphérie nucléaire (Fig.51). Cet aspect du noyau est caractéristique d'un noyau très actif.



Fig. 48. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux". Phagocytose de microcoques après une culture de 3h.(Gross. 10.430)

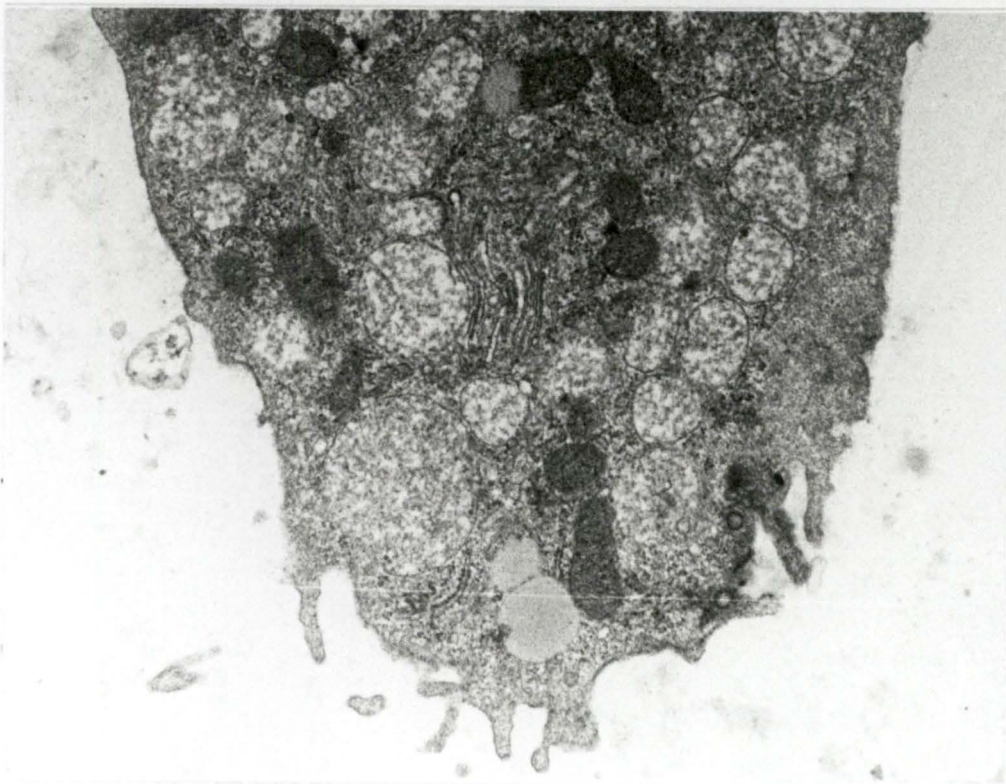


Fig. 49. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux" (détail cytoplasmique) Phagocytose de microcoques après une culture de 3h.(Gross. 15.680)

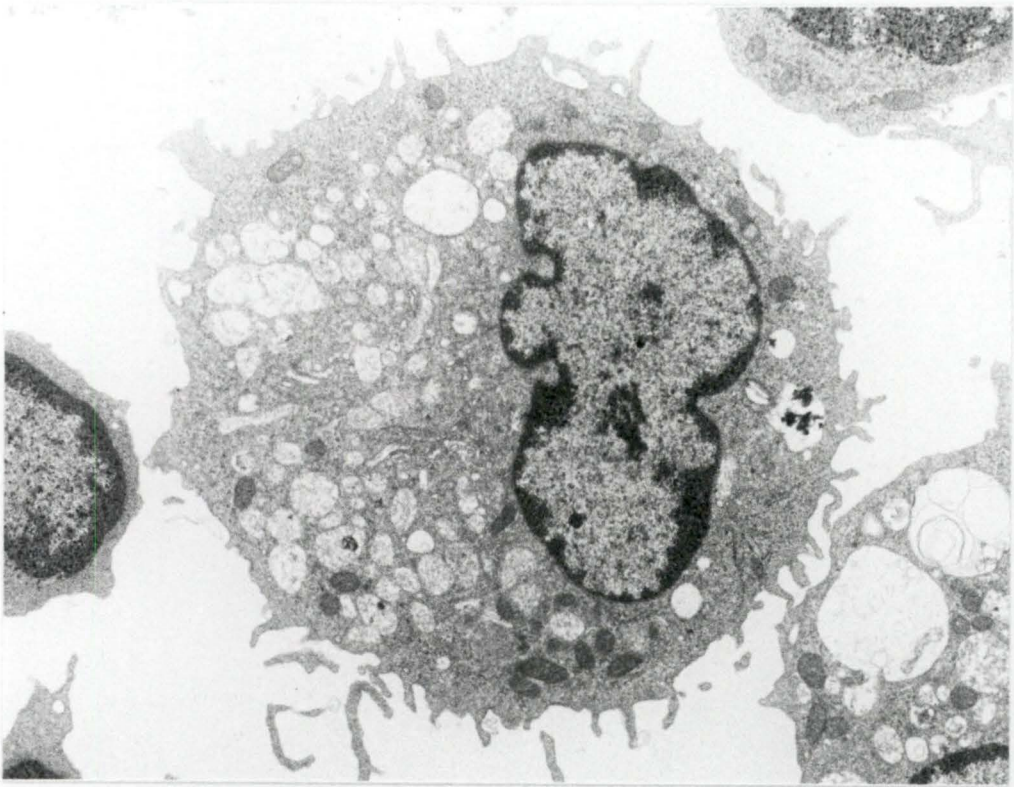


Fig. 50. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux". Phagocytose de microcoques après une culture de 3h.(Gross. 9.685)



Fig. 51. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux". Phagocytose de microcoques après une culture de 3h.(Gross. 15.680)

Culture de 4 h.

Nous observons des cellules avec quelques petites microvillosités (Fig.52). Des lamellipodes apparaissent développés et se réunissent pour former un capuchon à un pôle de la cellule (Fig.53). Le développement membranaire est plus accentué, ce qui signifierait que la cellule utilise au maximum son appareil contractile pour ingérer les bactéries.

Les cellules dont la membrane plasmique est hérissée de rares microvillosités contiennent de nombreuses vacuoles renfermant du matériel granuleux homogène. Ce seraient des restes de bactéries lysées dont l'aspect deviendrait de plus en plus pâle au fur et à mesure de la digestion (Fig.52). Ces vacuoles sont plus volumineuses que celles observées chez les cellules de la culture de 3 h. Cela témoignerait d'un plus grand nombre de bactéries phagocytées. Nous observons également des bactéries encore intactes dans des vacuoles de certaines cellules; celles-ci viendraient de les phagocyter. En effet, ces bactéries n'auraient pas encore eu le temps d'être dégradées par les enzymes lysosomales (Fig.53). Cette phase d'internalisation des bactéries est mise en évidence par le développement de lamellipodes.

Donc, nous observons un cytoplasme qui change d'aspect suivant la phase du processus d'endocytose dans lequel se trouve le macrophage alvéolaire. Le contenu cytoplasmique inclut également les lysosomes primaires, des mitochondries, des dictyosomes et du réticulum endoplasmique granulaire également bien développés et des amas de ribosomes.

La forme du noyau est variée. Nous remarquons la présence d'un nucléole et une condensation de chromatine à la périphérie nucléaire. Le centre du noyau est occupé par de la chromatine plus granuleuse. Le noyau a donc l'aspect d'un noyau très actif.

Pour cette expérience de phagocytose sur des macrophages alvéolaires issus de rats "normaux", la phagocytose s'exprimerait mieux après un temps de culture de 4 h étant donné un nombre plus élevé de bactéries phagocytées. Cependant, nous avons constaté que le temps de culture de 3 h nous a donné des résultats jugés déjà très satisfaisants : le macrophage alvéolaire possède des organites utiles à son métabolisme et phagocyte activement.

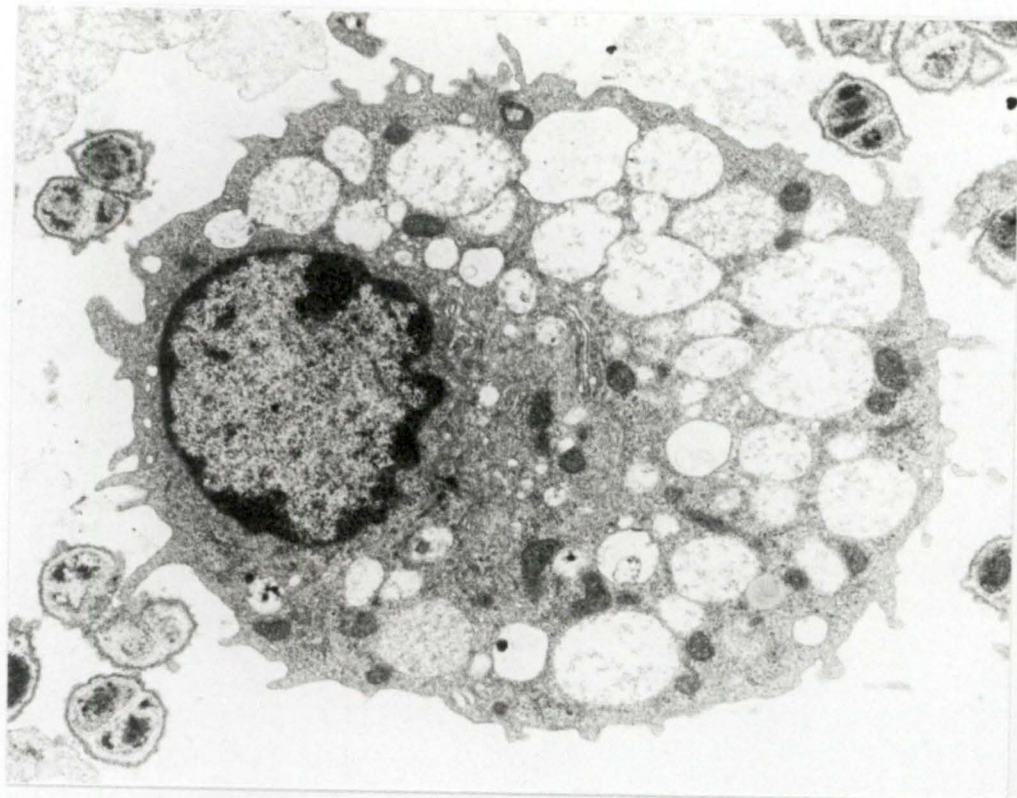


Fig. 52. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux". Phagocytose de microcoques après une culture de 4h.(Gross. 11.175)



Fig. 51. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux". Phagocytose de microcoques après une culture de 4h.(Gross. 10.000)

B. Macrophages alvéolaires issus de rats stimulés par du thioglycollate.

Nous avons mis en culture les cellules macrophagiques dans du milieu RPMI auquel a été ajouté 20 % de sérum frais.

Une première fraction de cellules a été cultivée avec du sérum frais homologue c'est-à-dire du sérum inflammatoire. Une seconde fraction a été cultivée avec du sérum normal c'est-à-dire du sérum produit à partir de rats non stimulés ("normaux").

Nous avons choisi un temps de culture de 4 h. En effet, nous avons constaté que les macrophages alvéolaires semblent mieux phagocyter après ce temps de culture. Les macrophages ont été ensuite soumis à une phagocytose de microcoques pendant 30 minutes, après quoi elles ont été fixées.

Culture avec du sérum normal.

La plupart des cellules issues de cette culture ont une forme plus ou moins sphérique.

Nous observons de courtes expansions membranaires et de petites microvillosités; celles-ci sont cependant rares (Fig.54).

Le cytoplasme contient des vacuoles qui renferment du matériel granuleux représentant probablement des restes de bactéries lysées; nous remarquons également la présence de mitochondries, d'un réticulum endoplasmique granulaire développé et des ribosomes.

Le noyau a très souvent un aspect réniforme (présence d'une échancrure nucléaire); il renferme un nucléole volumineux entouré d'une chromatine dispersée; la périphérie nucléaire est constituée d'une chromatine plus condensée.

Ce sont des cellules actives : elles possèdent des organites divers, indispensables à leur métabolisme et un noyau actif. Cependant, elles ne témoignent pas d'une grande activité de phagocytose (leur membrane plasmique ne développe pas de lamellipodes, par exemple).

Culture avec du sérum inflammatoire :

Ces cellules ont une forme beaucoup plus irrégulière que les cellules issues de la culture précédente.

La plupart des cellules ont une membrane plasmique qui présente des lamellipodes (Fig.55) assez développés chez certaines et des microvillosités de longueur variée. La membrane plasmique est donc plus différenciée que celle des cellules de la culture avec du sérum normal.

Certaines cellules ont un cytoplasme contenant un nombre impressionnant de vacuoles à contenu granuleux. Ces cellules auraient phagocyté un bon nombre de bactéries. Le contenu granuleux témoignerait du produit de leur digestion.

Le cytoplasme renferme également des mitochondries, du réticulum endoplasmique granulaire développé, des ribosomes et des petites vacuoles d'endocytose.

Le noyau a des formes diverses. La chromatine paraît plus dispersée que celle des cellules de la culture précédente; elle présente une bande plus étroite de condensation à la périphérie du noyau.

Nous constatons donc une différence d'aspect des cellules macrophagiques en relation avec la nature du sérum introduit dans leur milieu de culture (milieu de RPMI) et pour une durée de culture plus importante : du sérum inflammatoire activerait plus les macrophages alvéolaires que du sérum normal.

C. Macrophages alvéolaires issus de rats "normaux" cultivés avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG.

Nous avons cultivé des macrophages alvéolaires dans du milieu RPMI auquel était ajouté 20 % de sérum de rats stimulés par une inoculation de BCG.

Le temps de culture choisi a été de 2 h. En effet, ce sérum est très inflammatoire, plus inflammatoire que celui issu de rats stimulés par du thioglycollate. Lors de l'expérience précédente, nous avons obtenu de bons résultats (capacité de rephagocytose plus grande) concernant la culture avec du sérum inflammatoire pendant une durée de 4 h.

Il est intéressant de voir à présent si une culture d'une durée plus restreinte mais avec du sérum beaucoup plus inflammatoire n'apporte pas de résultats similaires voire encore meilleurs.

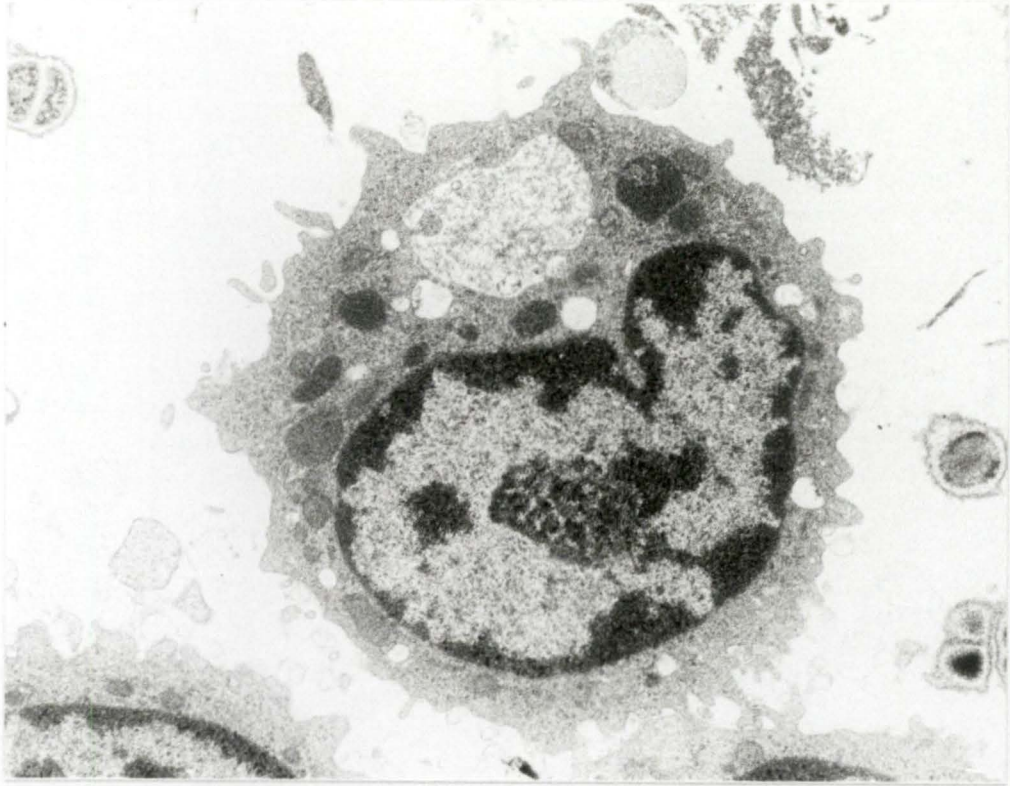


Fig. 54. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques après une culture de 4h avec du sérum normal.(Gross. 11.050)

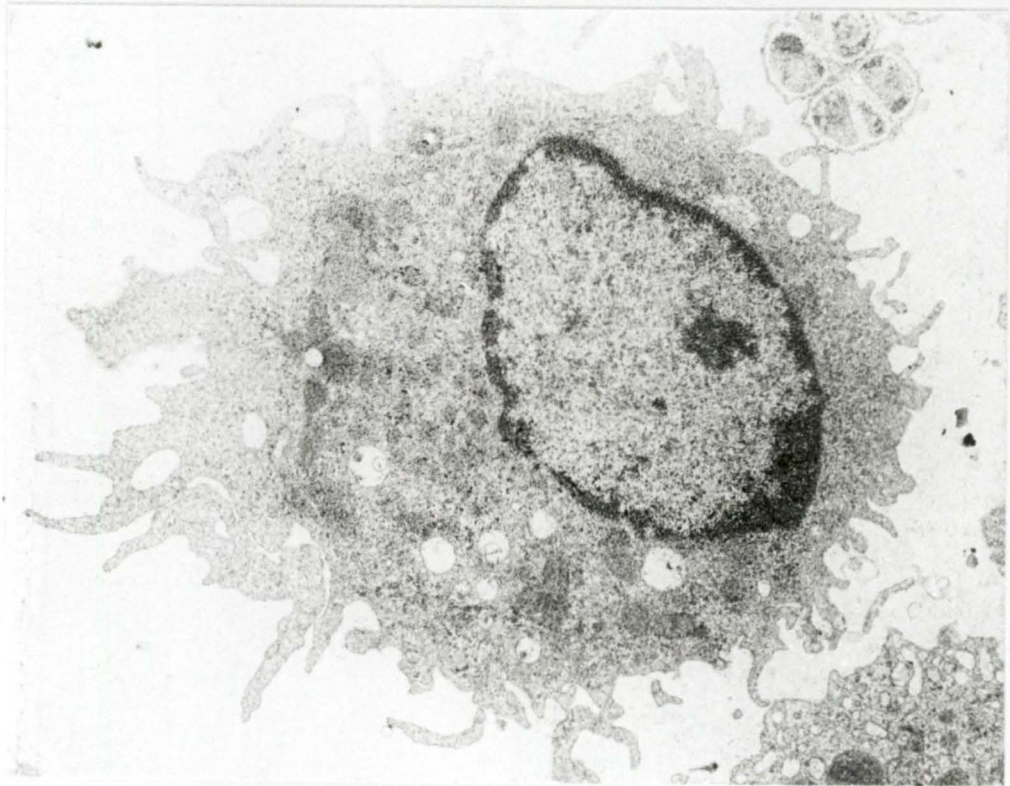


Fig. 55. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques après une culture de 4h avec du sérum inflammatoire.(Gross. 9.750)

La majorité des cellules développent d'importants lamellipodes (Fig.56). Suite à cela, la forme cellulaire est très irrégulière. Nous constatons également la présence de longues microvillosités.

Le cytoplasme contient des mitochondries, du reticulum endoplasmique granulaire et un appareil de Golgi (amas de dictyosomes bien visibles) très développés, beaucoup de ribosomes et des phagolysosomes de toutes tailles et de contenu très varié. Certains de ceux-ci renferment des corps lamellaires, d'autres contiennent de la substance granuleuse (restes de lyse bactérienne) mais ceux-ci n'apparaissent pas beaucoup. Cela pourrait peut-être s'expliquer par une endocytose rapide des bactéries suivie du rejet tout aussi rapide (exocytose) des restes des substances lysées. Le sérum très inflammatoire augmenterait la vitesse des processus de phagocytose de la part des macrophages qui seraient qualifiés, pour cette raison, de macrophages très activés.

4.2.3. Analyse quantitative de la phagocytose.

En réalisant des expériences de phagocytose de particules fluorescentes par des macrophages alvéolaires en culture in vitro, nous espérons pouvoir évaluer quantitativement la phagocytose de ces phagocytes.

Nous avons étudié cette phagocytose sur des macrophages alvéolaires issus de rats stimulés au thioglycollate afin de tester la phagocytose sur des macrophages stimulés. Ces macrophages sont par conséquent de tout âge.

Ils ont d'abord été soumis à une phagocytose de microcoques fluorescéinés; par la suite, nous avons décidé de réaliser la phagocytose avec des billes de latex fluorescéinées (Polysciences) en raison de problèmes apparus avec la phagocytose des bactéries.

Afin de pouvoir espérer obtenir des résultats convaincants, nous avons dû avant tout déterminer les conditions optimales de phagocytose : milieu de culture approprié (RPMI), pourcentage de sérum ajouté à ce milieu (20 %), température d'incubation (37°C), incubation sous agitation et rapport du nombre de particules par macrophage.

Nous avons donc soumis les cellules macrophagiques à différents temps de culture avant de les exposer à la phagocytose. Des témoins négatifs ont également été réalisés. Ils comportent des cellules au

temps zéro, fixées directement après le lavage broncho-alvéolaire. Ils nous permettent de distinguer l'autofluorescence naturelle des cellules (cellules n'ayant pas phagocyté de particules fluorescentes) de la véritable fluorescence (cellules ayant phagocyté des particules fluorescentes).

A. Phagocytose de microcoques fluorescés.

La phagocytose a été réalisée avec une concentration de 50 microcoques par macrophage. En effet, lors d'expériences préliminaires effectuées au département sur des macrophages péritonéaux, il a été remarqué que, sous ce rapport, la sensibilité du FACS était la meilleure.

Le temps de phagocytose a été de 30 minutes.

Nous avons commencé par des temps de culture de 15, 30, 60, 90 et 120 minutes. Par ce choix de temps relativement courts, nous avons voulu mettre en évidence une caractéristique importante des macrophages alvéolaires à savoir leur besoin d'un temps assez long pour "récupérer" (se débarrasser de leur déchets de matériel phagocyté dans le compartiment alvéolaire). Ainsi, nous nous attendions à observer un début de fluorescence (par la phagocytose de microcoques-FITC) seulement à partir du temps 2 h.

Le FACS, au moyen d'un dispositif d'analyse informatisé, permet de sélectionner une sous-population cellulaire. Nous nous sommes intéressés à la sous-population des grandes cellules macrophagiques. Ce sont des cellules qui, contenant une quantité importante de déchets, ont besoin de "récupérer" si elles sont confrontées à une phagocytose ultérieure importante.

En ce qui concerne l'analyse des cellules du témoin négatif, le FACS a révélé que sur 10000 cellules analysées, 1500 grandes cellules étaient fluorescentes de la même manière.

Après une culture de 2 h, 1200 grandes cellules seulement étaient fluorescentes.

Habituellement, du lysozyme est ajouté après la fixation des cellules pour éliminer l'excès de bactéries fluorescentes. En ce qui nous concerne, nous n'avons pas ajouté du lysozyme. Pour le témoin négatif, nous avons ajouté des bactéries fluorescentes après la fixation des cellules.

Comment expliquer une diminution du nombre des grandes cellules fluorescentes ?

Une première explication serait que le temps de 2 h n'est pas suffisant pour qu'un grand nombre de cellules soit capable de phagocyter à nouveau (elles se libèrent encoure de tout leur matériel phagocyté au préalable dans les alvéoles).

La fluorescence des grandes cellules du témoin négatif pourrait également être due à une autofluorescence naturelle renforcée par une quantité importante de phagolysosomes.

Lorsque nous avons regardé le témoin négatif et les cellules ayant en principe phagocyté les bactéries fluorescentes au microscope à fluorescence, nous n'avons pas observé un contraste net entre l'autofluorescence naturelle des cellules macrophagiques (cellules n'ayant pas phagocyté) et la fluorescence des bactéries phagocytées.

Nous avons réalisé une seconde expérience avec des temps de culture de 2 h, 3 h et 4h.

Les résultats se sont avérés identiques à ceux de l'expérience précédente : les cellules observées au microscope à fluorescence ne présentaient aucun contraste. Les microcoques pouvaient peut-être avoir perdu leur fluorescence initiale.

Nous avons alors effectué une troisième expérience avec de nouveaux microcoques-FITC. En effet, nous avons pensé que les molécules de FITC sont peut-être instables. Les résultats n'ont pas évolué : peut-être que les molécules de FITC sur la paroi bactérienne sont encore plus facilement dégradables que nous le pensions.

C'est ainsi que nous avons décidé prendre des particules d'une nature différente à savoir des billes de latex. En effet, des expériences préliminaires ont révélé que la fluorescence des billes de latex est plus fiable.

Nous avons également regardé cette phagocytose au microscope électronique à transmission. Les cellules du témoin négatif auxquelles des microcoques avaient été ajoutés après la fixation des cellules macrophagiques, sont entourées de microcoques fluorescents (Fig.31).

Cela pourrait peut-être expliquer la fluorescence des cellules du témoin négatif.

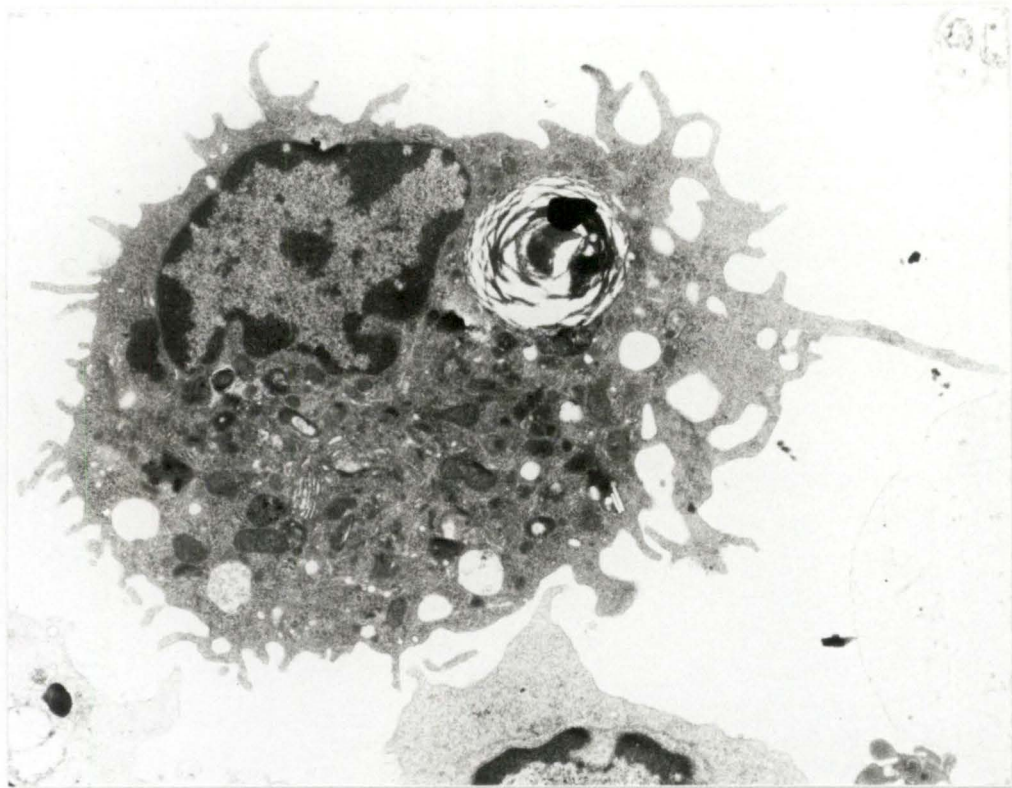


Fig. 56. Macrophage alvéolaire issu de rats "normaux" cultivé avec du sérum obtenu à partir de rats stimulés par du BCG. Phagocytose de microcoques après une culture de 2h (Gross. 9.180)

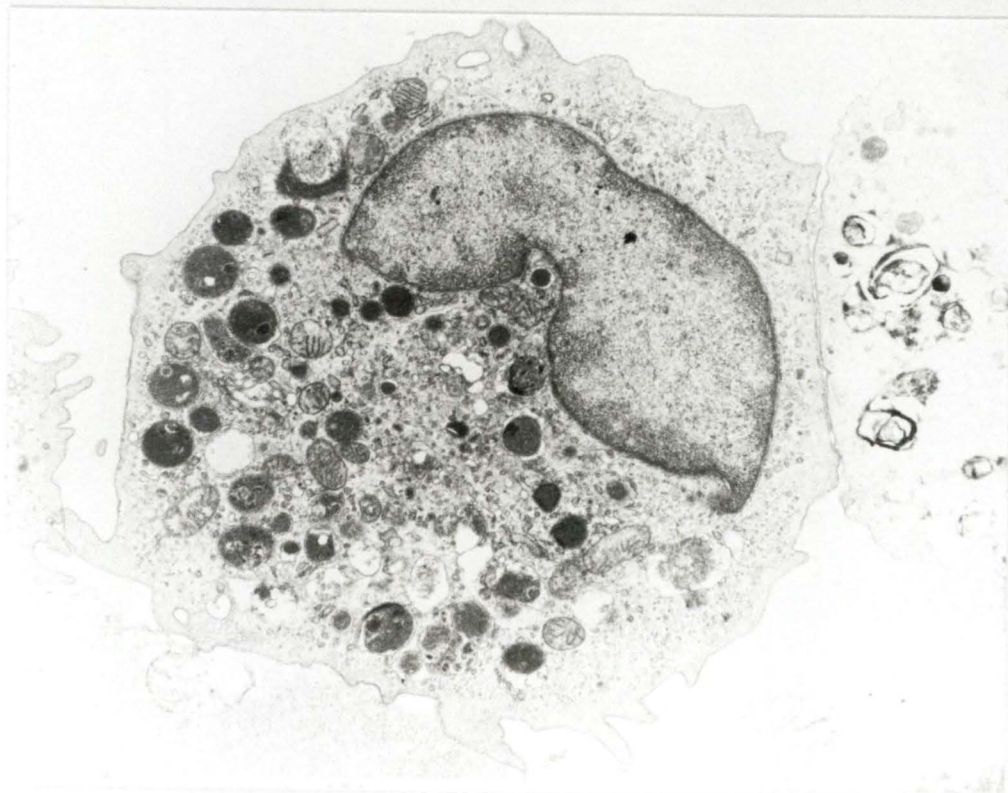


Fig. 57. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques fluorescents après une culture de 30'.(Gross. 10.260)

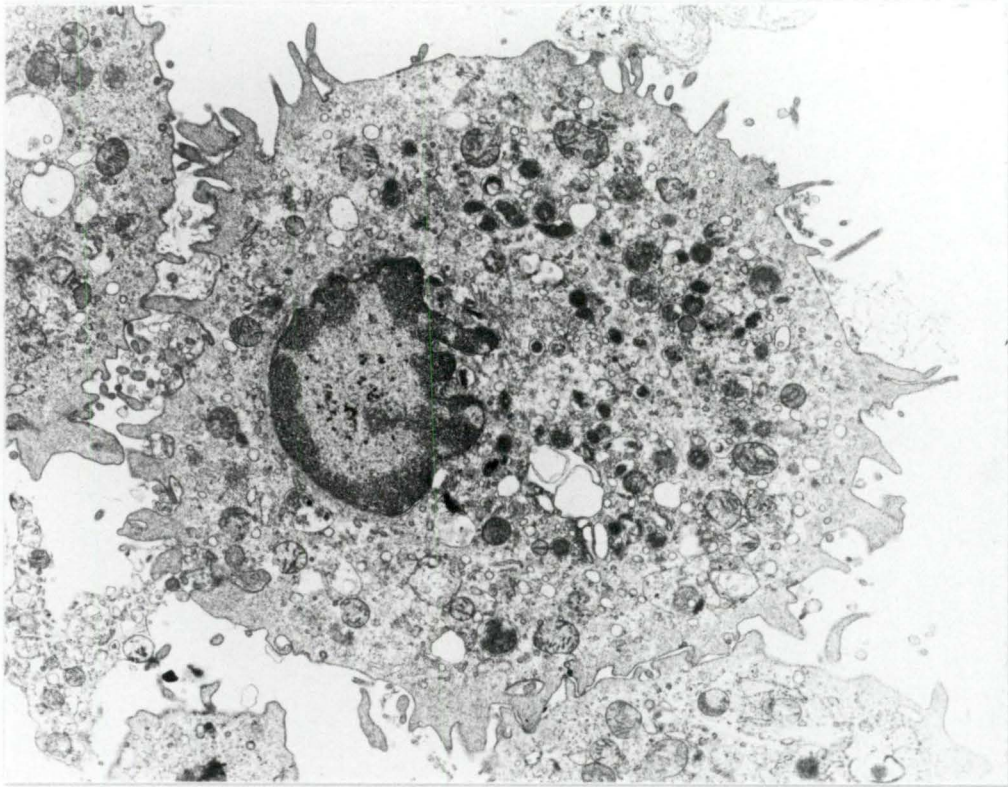


Fig. 58. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques fluorescents après une culture de 1h (Gross. 8.500)

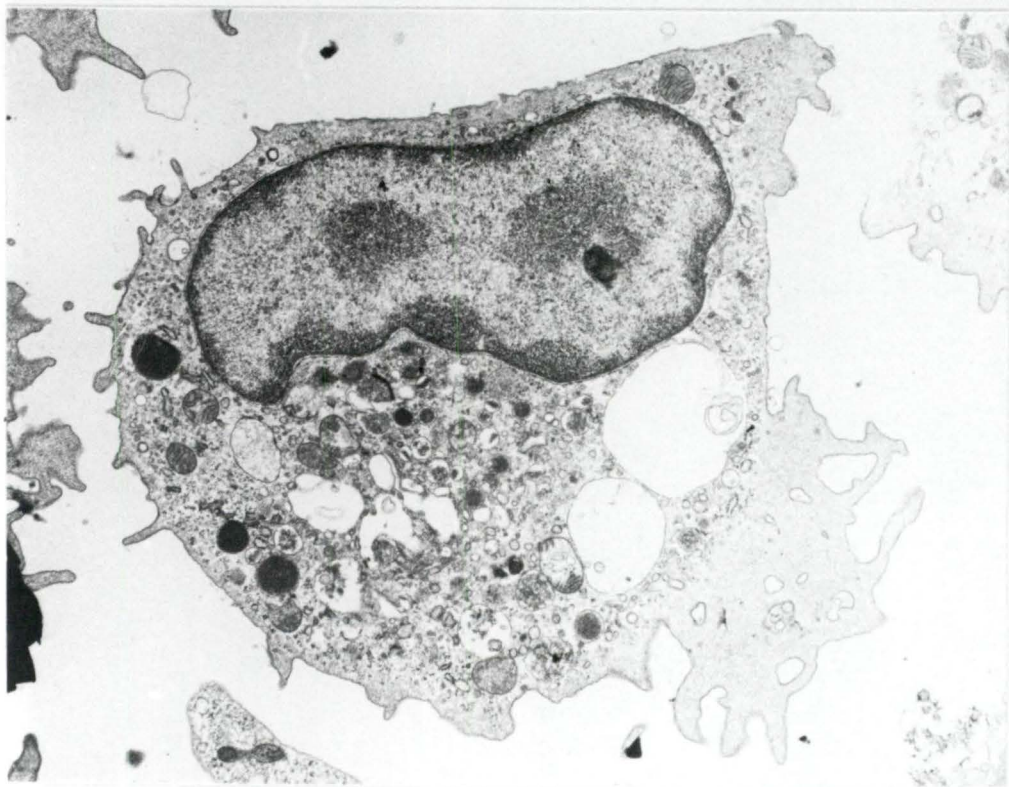


Fig. 59. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques fluorescents après une culture de 2h. (Gross. 9.120)

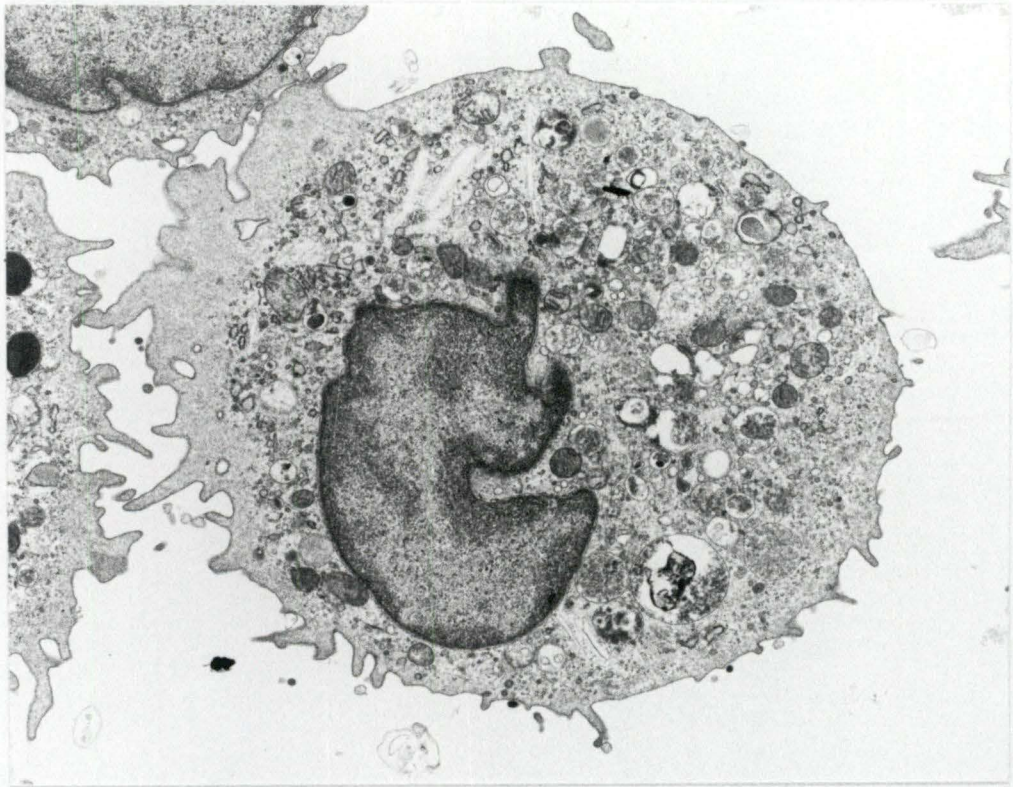


Fig. 60. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques fluorescents après une culture de 3h (Gross. 8.000)

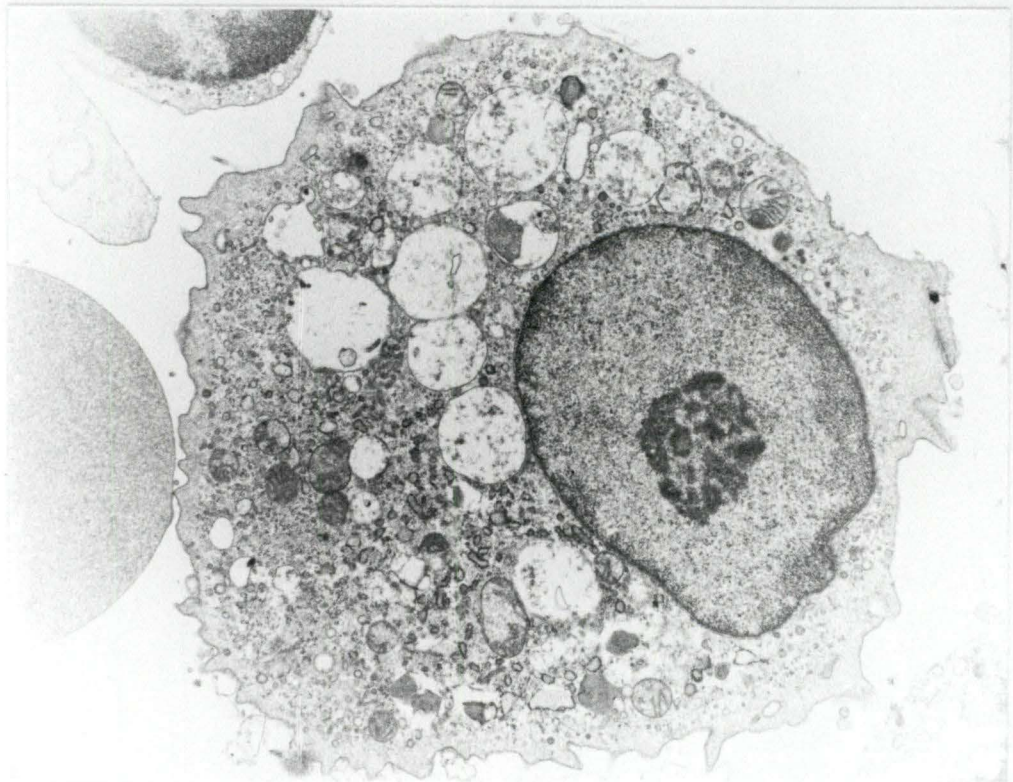


Fig. 61. Macrophage alvéolaire issu de rats stimulés par du thioglycollate. Phagocytose de microcoques fluorescents après une culture de 4h. (Gross. 10.830)

Les cellules cultivées et soumises ultérieurement à la phagocytose développent des lamellipodes (principalement pour des cellules ayant été cultivées longtemps) (Fig.57 - 61). Le cytoplasme des cellules de la culture de 4 h présente assez bien de vacuoles à contenu floconneux (restes de bactéries lysées). Cela signifierait que ces cellules ont phagocyté et que cette phagocytose serait plus manifeste après un temps de récupération plus long.

B. Phagocytose de billes de latex fluorescées.

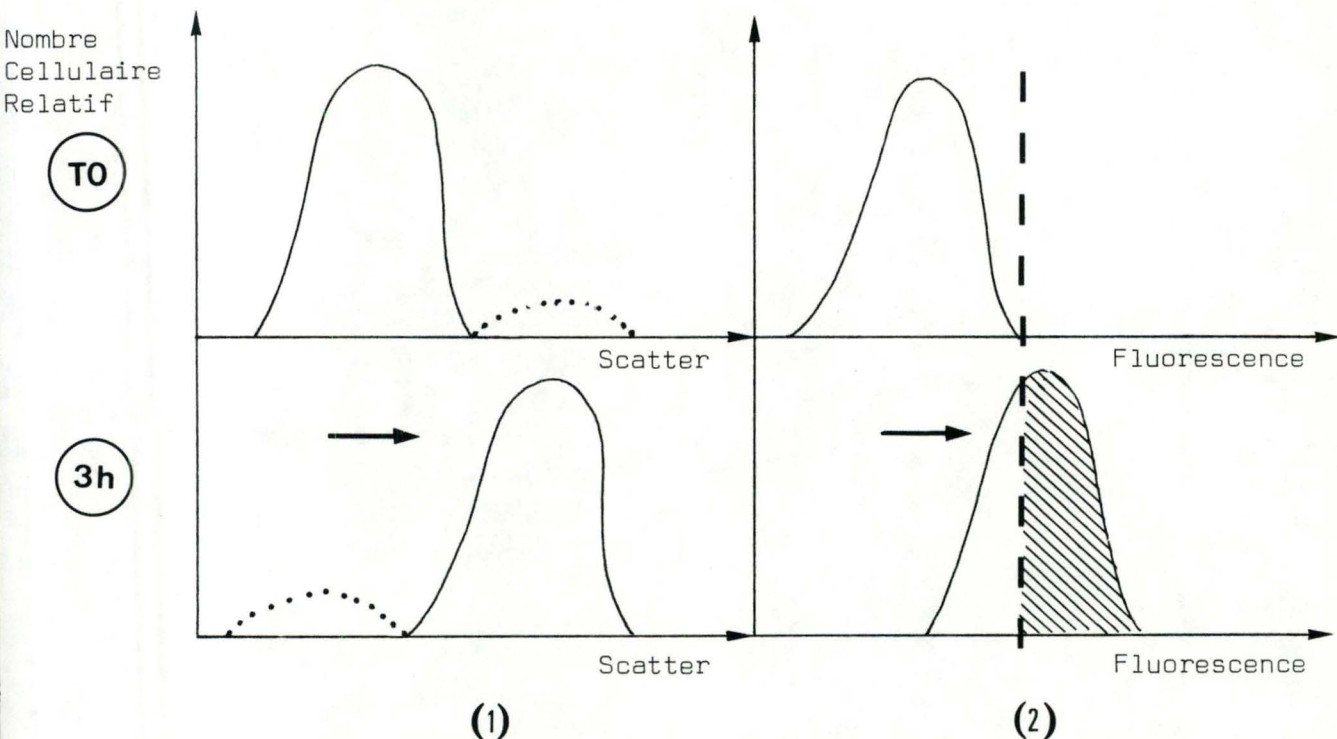
Nous avons réalisé les phagocytoses avec une concentration de 10 billes de latex de 0,1 micron de diamètre par macrophage, excepté pour la première expérience où la concentration a été de 100 billes de latex par macrophage.

Toutes les phagocytoses ont duré 15 minutes en raison de la rapidité avec laquelle le macrophage endocyte ce genre de particule.

La première expérience a donné les résultats suivants :

Différents temps de culture.	Nombre de grandes cellules fluorescentes. (analyse sur 5000 grandes cellules).
témoin négatif	795
1 h	3760
2 h	3736
3 h	4633

Ces résultats peuvent être convertis en deux histogrammes. Ceux-ci rendent mieux compte de ce qu'il se passe :



En guise de rappel, le scatter représente l'intensité de la fluorescence diffusée par la cellule frappée par la source lumineuse. Il est relatif à la taille cellulaire.

Nous observons une nette différence entre le T0 et le temps 3 h. La phagocytose (pour autant qu'elle soit proportionnelle à l'intensité de fluorescence) semble s'être réalisée et augmenter avec la longueur du temps de culture. Il semblerait que le temps de 2 h n'ait pas été suffisant pour accélérer la phagocytose. Par contre, après un temps de 3 h, nous observons une brusque augmentation de la phagocytose.

Il est normal que le scatter évolue parallèlement à l'intensité de la fluorescence puisque l'ingestion de particules augmente la taille de la cellule macrophagique. Cependant, comme une concentration trop importante de billes de latex par macrophage entravait le bon fonctionnement du FACS, nous nous sommes résignés à utiliser une concentration de 10 billes de latex par macrophage.

Lors d'une seconde expérience, nous avons réalisé des temps de culture de 1 h, 2 h, 3 h et 4 h.

Aucune différence n'a été observée entre le témoin négatif et le temps de 4 h. Nous devons souligner que dans la fraction cellulaire du témoin négatif, nous avons ajouté des billes de latex. Cependant,

celles-ci ne devaient pas être phagocytées étant donné que les cellules macrophagiques avaient été fixées avant l'addition des billes de latex. Or, une fois encore, nous ne constatons aucune différence entre la fluorescence du témoin négatif (fluorescence plus grande que celle des témoins précédents) et celle due à des molécules de FITC liées aux billes de latex.

Comment expliquer ces résultats ?

Les billes de latex pourraient être collées sur la membrane du macrophage. Cela expliquerait la forte fluorescence des cellules du témoin négatif.

Nous avons réalisé une dernière expérience qui semblerait renforcer cette dernière hypothèse. Nous avons effectué des temps de culture de 2 h et de 5 h suivis évidemment d'une phagocytose de 15', ainsi que deux témoins négatifs (témoin négatif avec billes de latex et témoin négatif sans billes). Les résultats sous forme d'histogrammes, révèlent une nette différence entre le témoin négatif avec billes de latex (T0 + billes) et le témoin négatif sans billes de latex (T0o). Les histogrammes de la figure A nous montrent un déplacement du scatter (augmentation du scatter) pour le témoin négatif avec billes par rapport à celui du témoin négatif sans billes. Cette augmentation de la taille s'expliquerait par une agglutination des billes de latex sur la membrane du macrophage alvéolaire (Fig.62). Le déplacement du scatter de la part du témoin négatif avec billes correspond à une augmentation de l'intensité de fluorescence. Cela semble assez logique. L'intensité de la fluorescence est identique que ce soit après une culture de 2 h ou après une culture de 5 h (Fig.B) (Fig.63) (Fig.64).

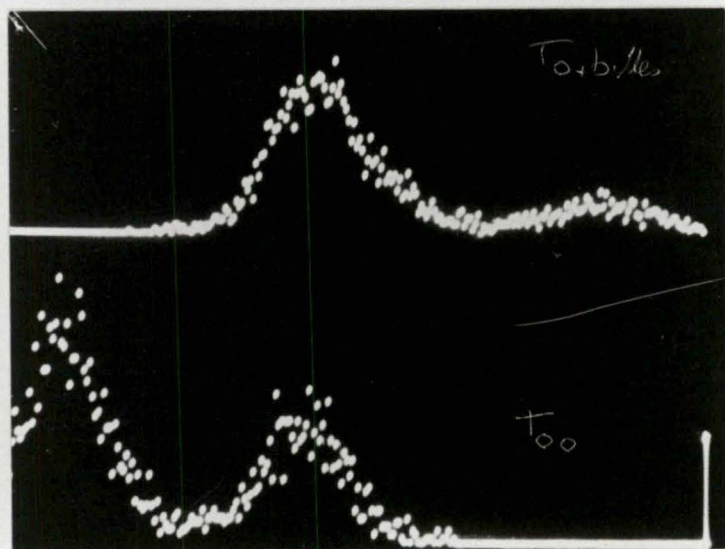


Fig. A. Histogramme représentant le scatter en fonction du nombre relatif cellulaire.

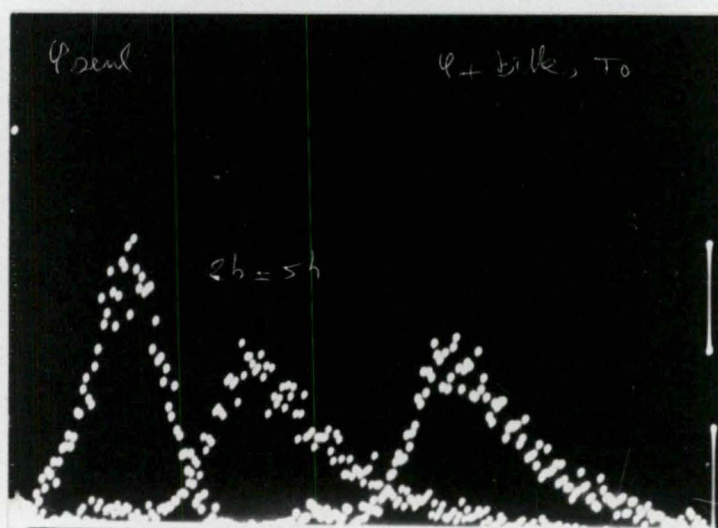


Fig. B. Histogramme représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre relatif cellulaire.

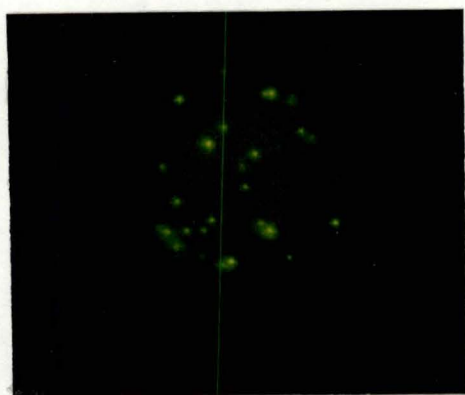


Fig. 62.

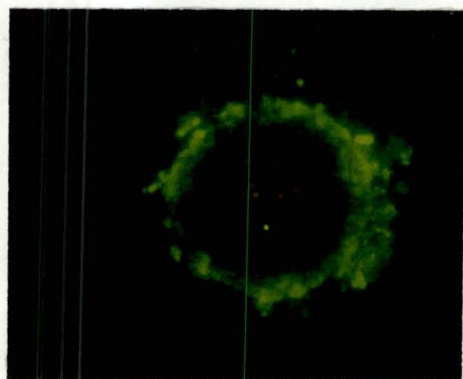


Fig. 63.

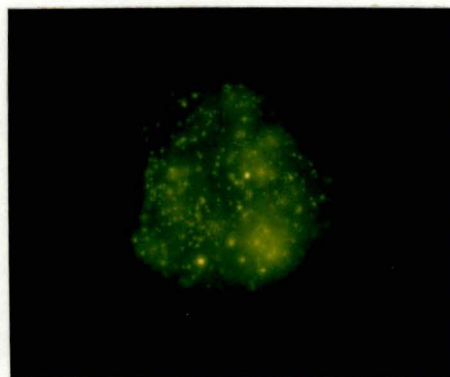


Fig. 64.

Fig. 62. Témoin négatif d'une phagocytose de billes de latex fluorescées.(Gross. 100)

Fig. 63. Phagocytose de billes de latex fluorescées après une culture de 2 h.(Gross. 100)

Fig. 64. Phagocytose de billes de latex fluorescées après une culture de 5 h.(Gross. 100)

5. RESULTATS DE L'ETUDE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS.

Nous avons reçu des macrophages alvéolaires humains issus de différents cas pathologiques. Ils ont été récoltés par des lavages broncho-alvéolaires (100 ml environ de liquide physiologique injecté et aspiré) au moyen d'un fibroscope bloqué dans le lobe inférieur ou dans le lobe moyen du poumon droit du patient. Nous les avons soumis à des temps de culture différents suivis d'une phagocytose de microcoques (*Micrococcus lysodeikticus*).

1. Patiente victime d'une brûlure des poumons.

Les cellules macrophagiques resuspendues dans du milieu de Hanks, ont été séparées en deux fractions : une fraction représente le témoin négatif (cellules fixées directement après leur obtention par lavage broncho-alvéolaire); l'autre fraction représente une lot de cellules qui est mis en culture pendant une durée de 1 h 30 et qui sont soumises ultérieurement à une phagocytose de microcoques de 30 minutes.

La culture des cellules s'est effectuée dans du RPMI auquel était ajouté 20% de sérum homologue (sérum de la patiente).

Témoin négatif :

Les cellules ne présentent pas un aspect de cellules bien vivantes. En effet, nous n'observons pas d'organites caractéristiques du métabolisme cellulaire. Ces cellules sembleraient avoir été activées en raison d'une membrane plasmique déformée. Ces cellules sont peut-être incapables de reformer de nouveaux organites (Fig.65) (Fig.66).

Phagocytose après une culture de 1 h 30 :

Les organites sont présents (mitochondries très développées, réticulum endoplasmique granulaire) (Fig.67). La forme cellulaire est irrégulière. Les cellules ont leur membrane plasmique hérissée de longues microvillosités. La phagocytose est apparente : nous observons des vacuoles d'endocytose contenant des microcoques (Fig.68).

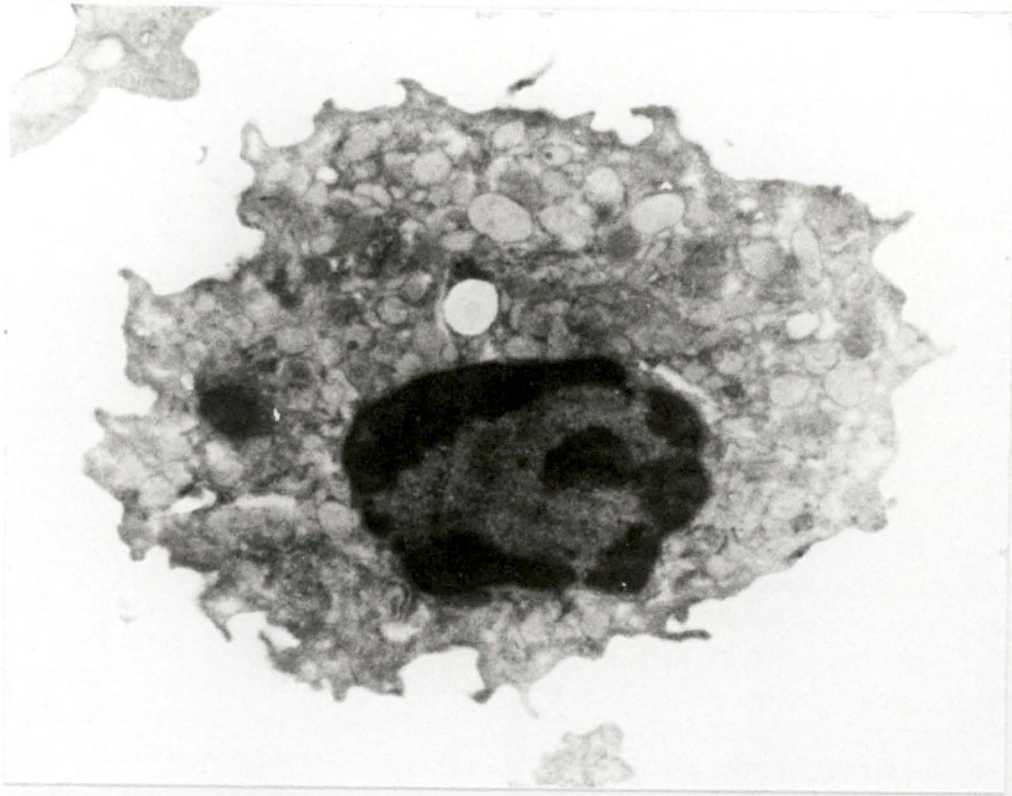


Fig. 65. Macrophage alvéolaire issu d'une patiente victime d'une brûlure des poumons, témoin négatif. (Gross. 21.000)

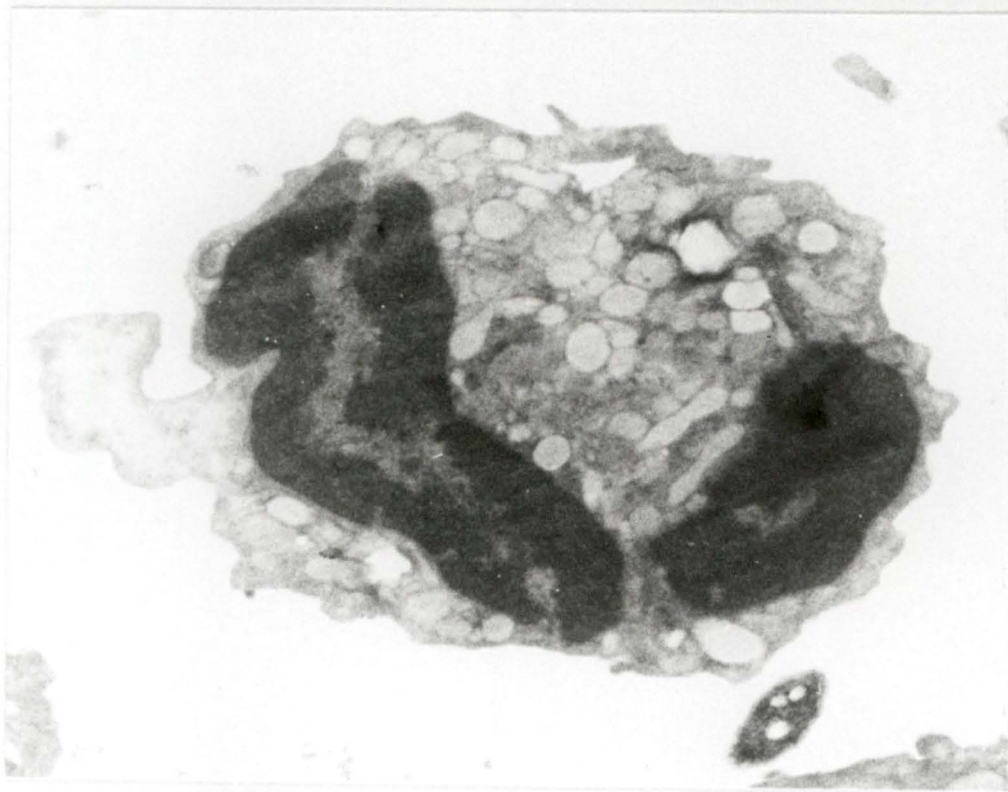


Fig. 66. Macrophage alvéolaire issu d'une patiente victime d'une brûlure des poumons, témoin négatif. (Gross. 23250)

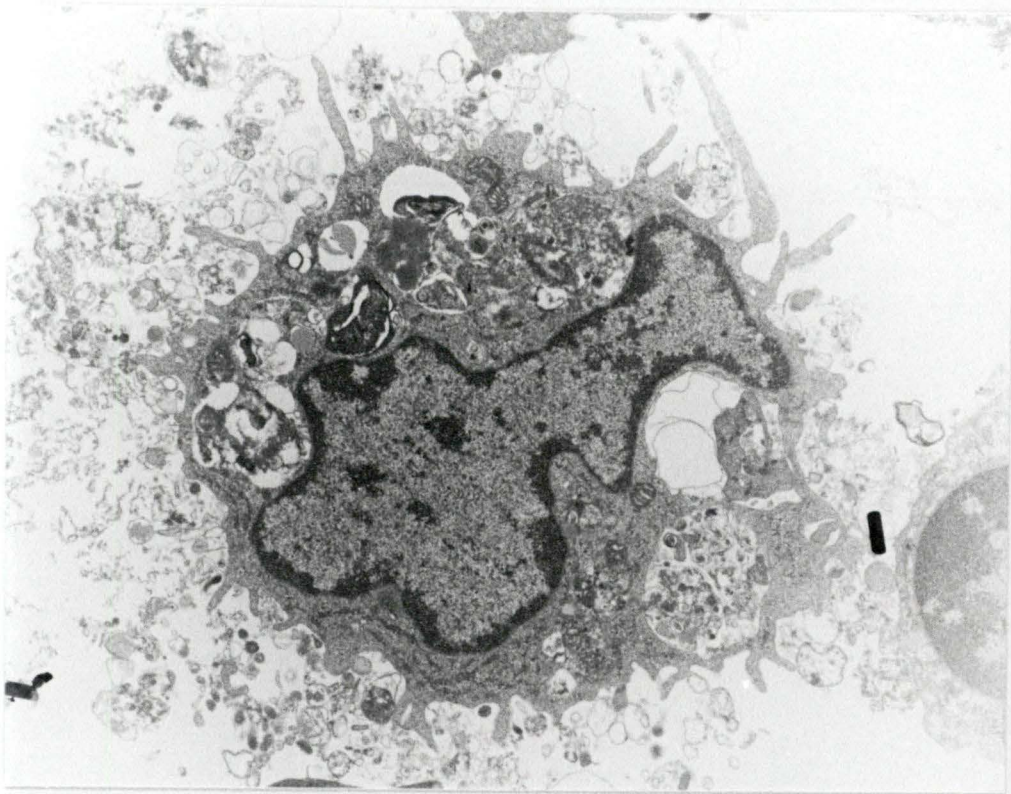


Fig. 67. Macrophage alvéolaire issu d'une patiente victime d'une brûlure des poumons. Phagocytose de microcoques après une culture de 1h30.(Gross.10695)

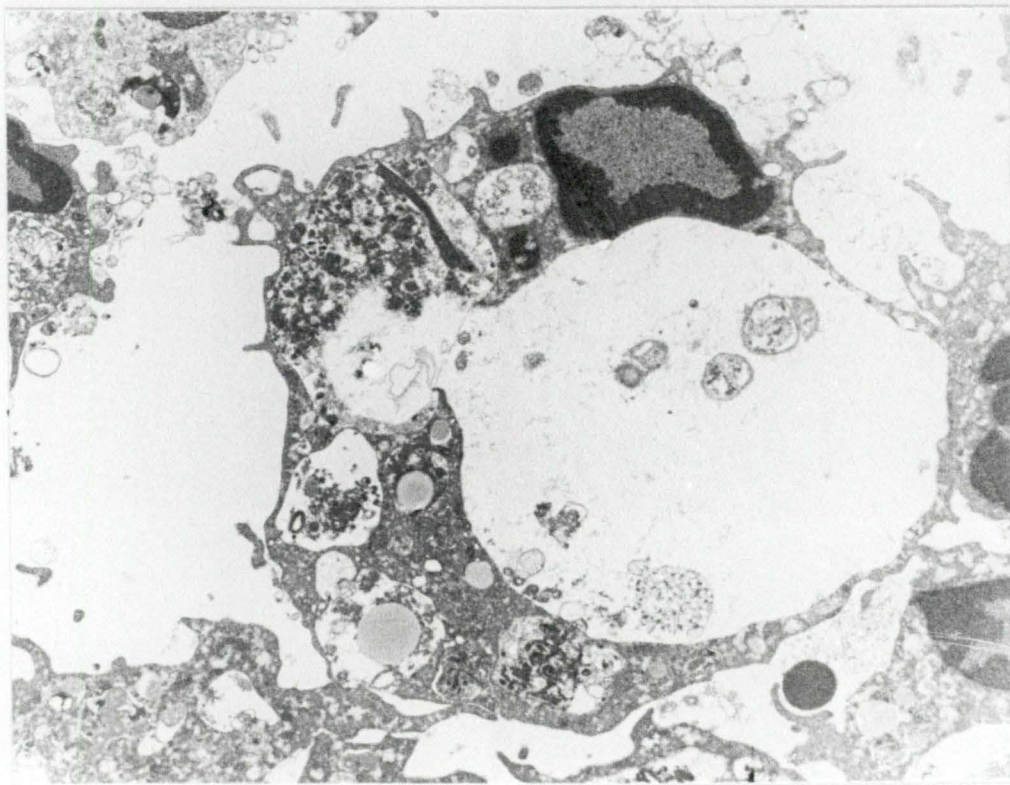


Fig. 68. Macrophage alvéolaire issu d'une patiente victime d'une brûlure des poumons. Phagocytose de microcoques après une culture de 1h30.(Gross.9150)

Les cellules semblent en meilleur état que celles du temps zéro : elles sont capables de reformer de nouveaux organites et de phagocyter.

2. Même patiente que précédemment mais deux semaines après son accident.

Témoin négatif :

Nous remarquons la présence d'organites : du réticulum endoplasmique granulaire très développé, des mitochondries, des ribosomes, un noyau réniforme avec une chromatine périnucléaire très condensée. La forme cellulaire est variée. La membrane plasmique n'est pas hérissée de microvillosités.

En ce qui concerne le contenu cytoplasmique en phagolysosomes, il varie très fort d'une cellule à l'autre : certaines cellules en contiennent un grand nombre (Fig.69); d'autres n'en contiennent quasi pas (Fig.70).

Ces cellules sembleraient avoir un peu récupéré (présence d'organites) à moins que l'aspect de ces cellules ne témoigne d'un apport de nouvelles cellules macrophagiques depuis l'accident.

3. Intoxication au CO.

Témoin négatif :

Les cellules ne présentent pas de microvillosités. Le cytoplasme contient des mitochondries et présente de larges plages granuleuses blanchâtres (Fig.71). Ces cellules ne semblent pas très fonctionnelles du moins, en ce qui concerne une phagocytose de matériel siégeant dans le compartiment alvéolaire.

Phagocytose après une culture de 1 h 30 :

Nous observons des cellules de forme irrégulière (Fig.72) contenant des vacuoles renfermant des bactéries qui sont digérées. Les cellules ont été capables de phagocyter les microcoques après avoir été mises en culture.

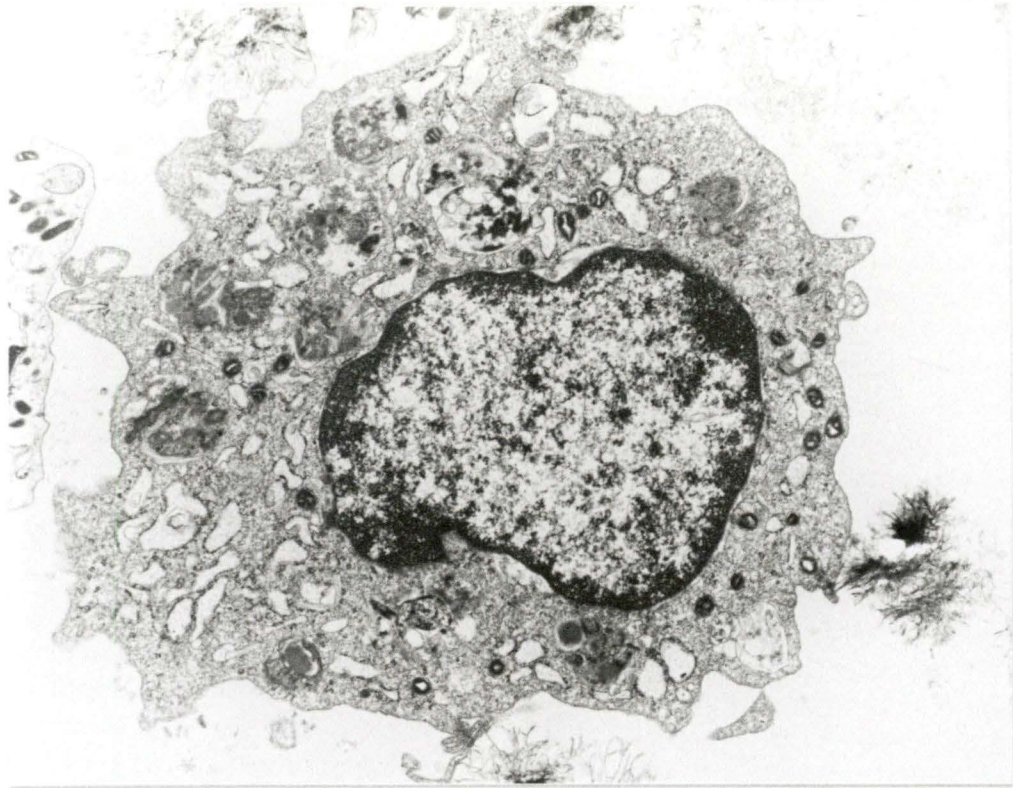


Fig. 69. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente victime d'une brûlure des poumons, deux semaines après l'accident. Témoin négatif.(Gross.13300)

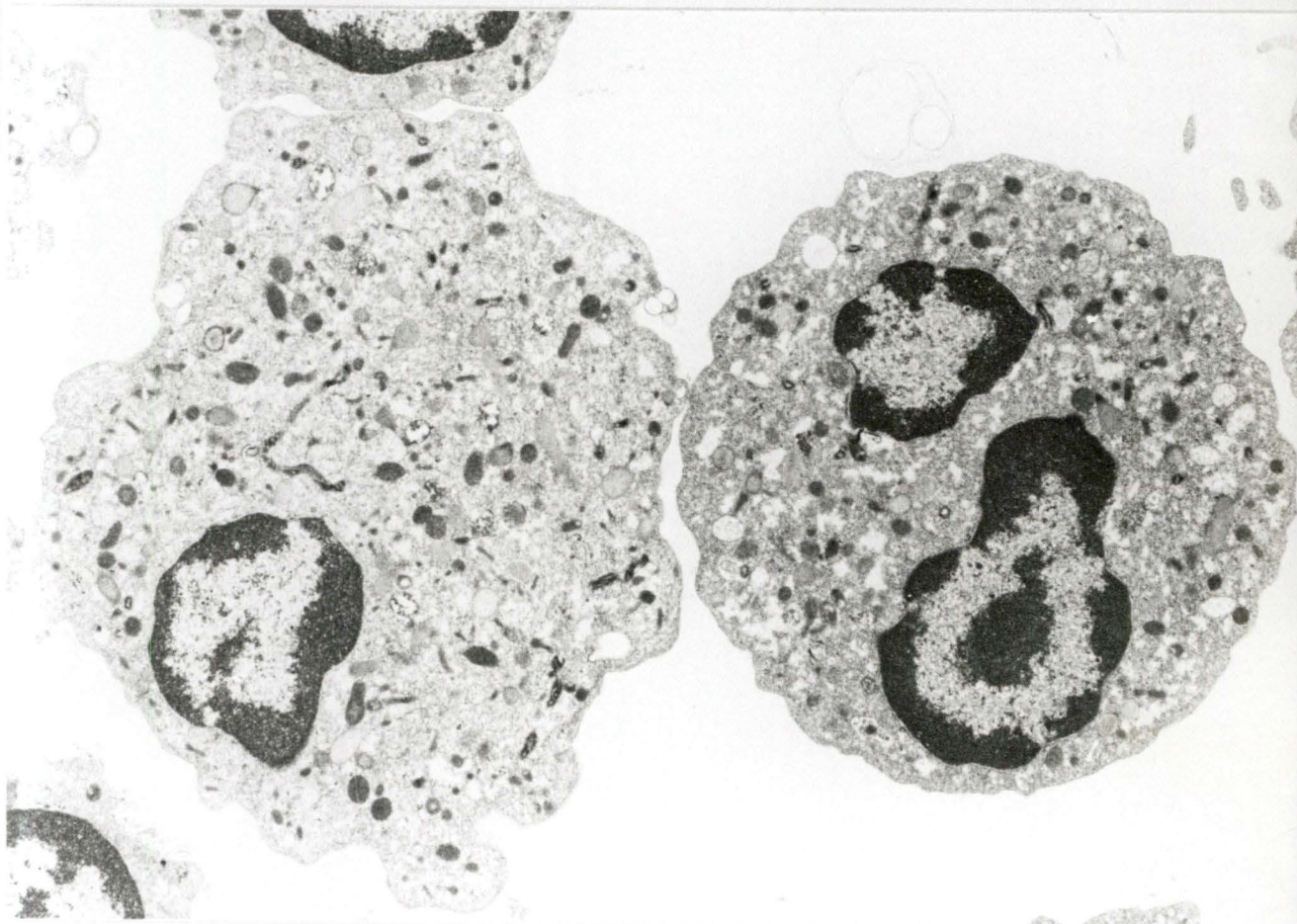


Fig. 70. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente victime d'une brûlure des poumons, deux semaines après l'accident. Témoin négatif.(Gross.11625)

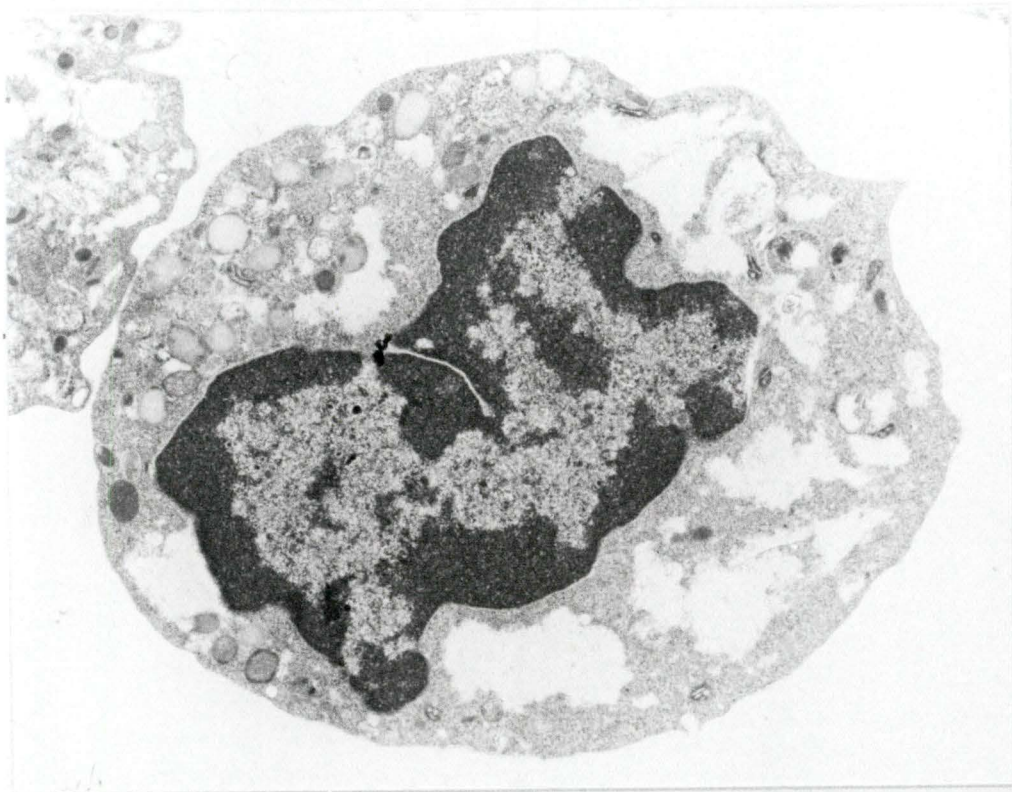


Fig. 71. Macrophage alvéolaire issu d'une personne intoxiquée au CO. Témoin négatif.(Gross.16100)



Fig. 72. Macrophage alvéolaire issu de la même personne intoxiquée au CO. Phagocytose de microcoques après une culture de 1h30.(Gross.12600)

Phagocytose après une culture de 2 h 30 :

Les organites sont bien présents (mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique granulaire très développé) (Fig.73). Le cytoplasme contient certaines vacuoles renferment des microcoques intacts (non encore digérés) et d'autres renfermant des restes de bactéries lysées (contenu vacuolaire plus floconneux).

Le noyau est réniforme et sa chromatine centrale est très dispersée, signe d'un noyau très actif.

4. Patiente ayant fait un poumon de choc suite à un accident de la route ayant occasionné un polytraumatisme très important.

Il s'agit d'une patiente dont le bilan lésionnel à son entrée à l'hôpital était très important. Cette personne présentait des signes d'ARDS (poumon de choc); le prélèvement des cellules macrophagiques s'est effectué le lendemain de l'apparition de ces signes.

Nous avons effectué des cultures avec deux sortes de sérum : sérum homologue (sérum inflammatoire de la patiente) et sérum normal (sérum issu de personnes ayant le même groupe sanguin que celui de la patiente).

Témoin négatif :

Les cellules contiennent de nombreux organites (mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique granulaire, phagolysosomes). Le cytoplasme renferme également d'énormes vacuoles à contenu finement granuleux. Les cellules ont une forme irrégulière (Fig.74).

Phagocytose après une culture de 2 h avec du sérum normal :

Les cellules macrophagiques ont leur membrane plasmique hérissée de quelques longues microvillosités. Le cytoplasme nous montre des mitochondries et des phagolysosomes (Fig.75).

Phagocytose après une culture de 3 h avec du sérum normal :

Nous remarquons la présence d'un plus grand nombre de longues microvillosités ainsi que des lamellipodes.



Fig. 73. Macrophage alvéolaire issu de la même personne intoxiquée au CO. Phagocytose de microcoques après une culture de 2h30.(Gross.18900)

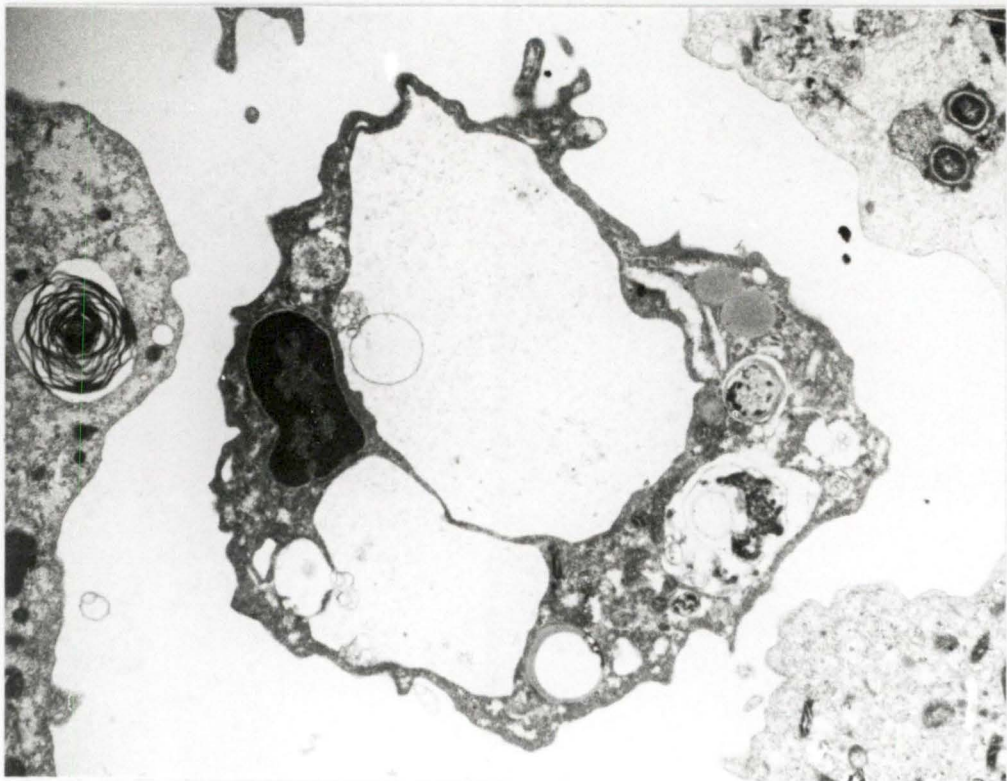


Fig. 74. Macrophage alvéolaire issu d'une patiente ayant fait un poumon de choc (ARDS).
Témoin négatif.(Gross.12320)

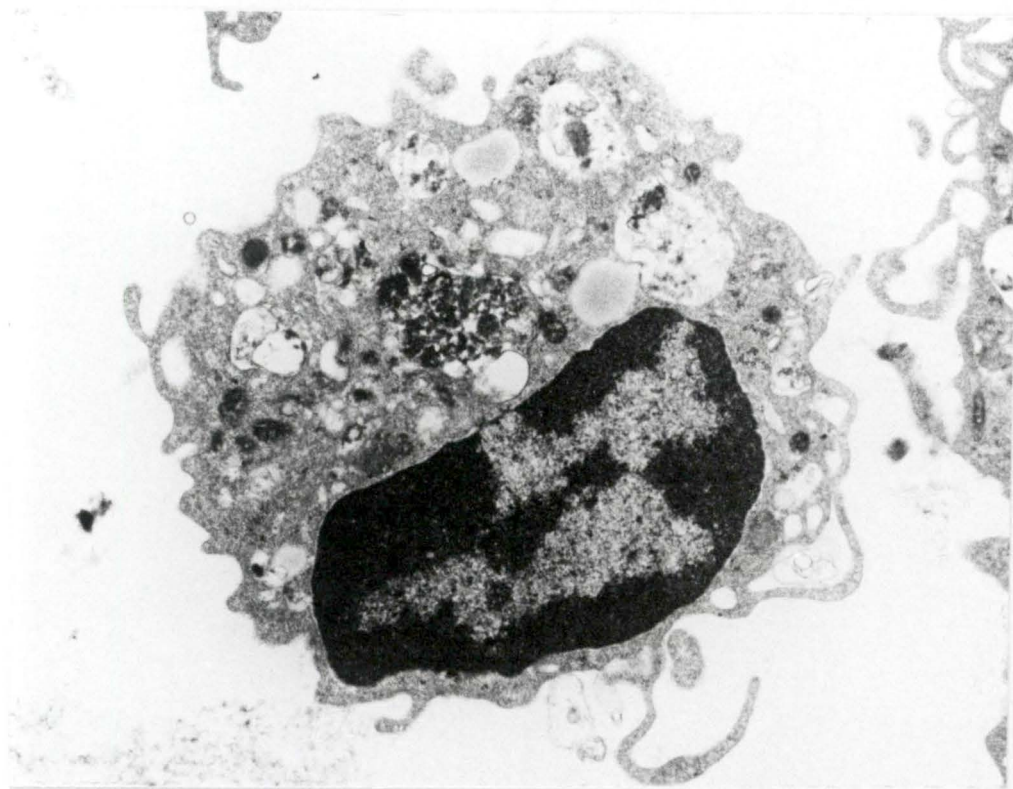


Fig. 75. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente ayant fait un poumon de choc. Phagocytose de microcoques après une culture de 2h avec du sérum normal. (Gross.15680)

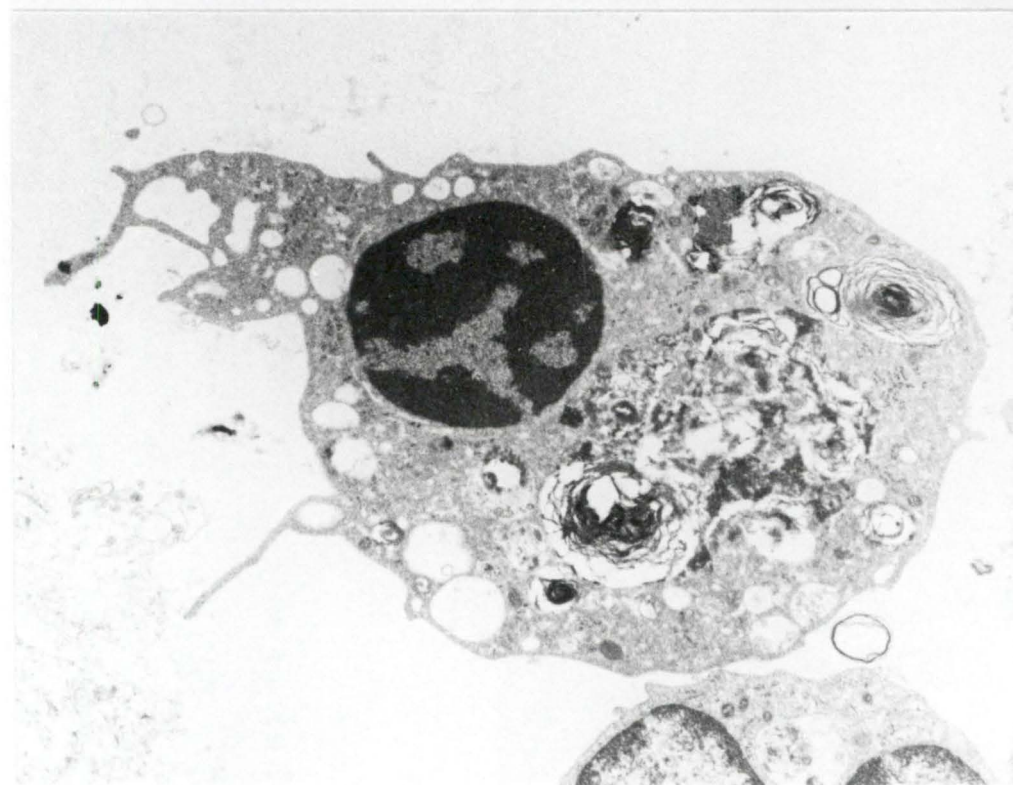


Fig. 76. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente ayant fait un poumon de choc. Phagocytose de microcoques après une culture de 3h avec du sérum normal. (Gross.9750)

Le cytoplasme contient des vacuoles à contenu lamellaire, des vacuoles à contenu granuleux (restes de bactéries lysées). Du reticulum endoplasmique granulaire semble très développé. Des mitochondries sont également présentes (Fig.76).

Phagocytose après une culture de 2 h avec du sérum inflammatoire :

Les organites sont présents : nous observons un appareil de Golgi, des mitochondries. La plupart des cellules ont une forme sphérique. Leur membrane plasmique n'est pas hérissée de microvillosités (Fig.77).

Phagocytose après une culture de 3 h avec du sérum inflammatoire :

La membrane plasmique des cellules est hérissée de très longues microvillosités. Le cytoplasme renferme beaucoup de phagolysosomes (éléments du milieu de culture ou restes de bactéries lysées) (Fig.78). Ces cellules semblent donc assez actives.

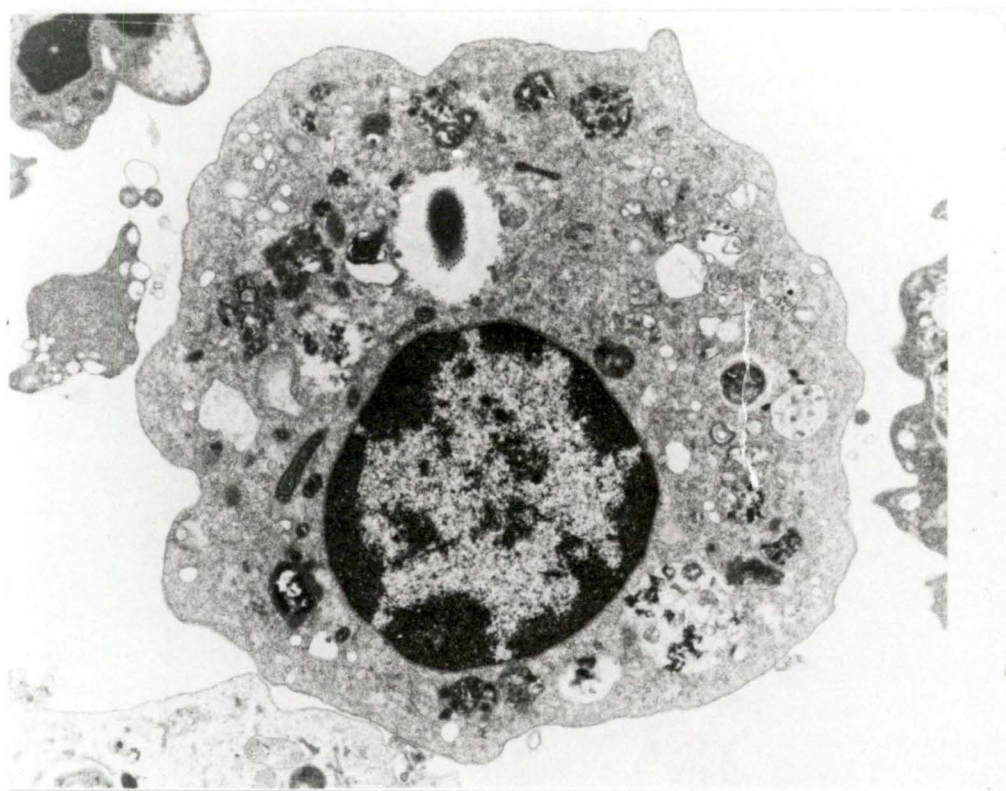


Fig. 77. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente ayant fait un poumon de choc. Phagocytose de microcoques après une culture de 2h avec du sérum inflammatoire. (Gross. 10.695)

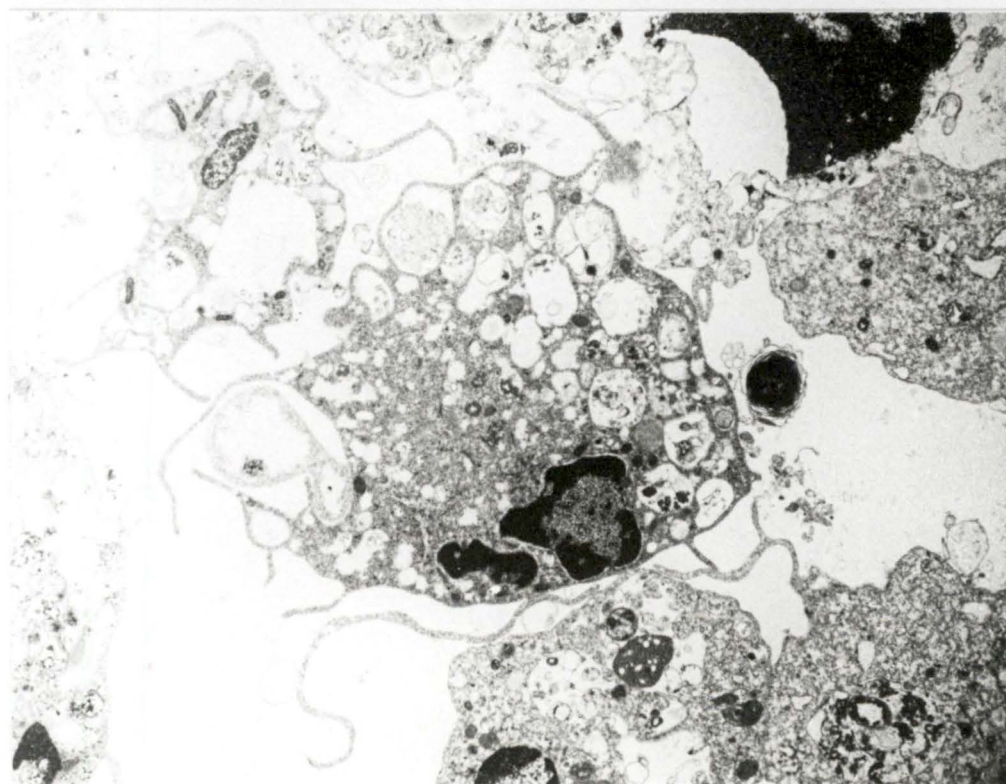


Fig. 78. Macrophage alvéolaire issu de la même patiente ayant fait un poumon de choc. Phagocytose de microcoques après une culture de 3h avec du sérum inflammatoire. (Gross. 8.195)

6. DISCUSSION.

Chaque fois que nous avons effectué des lavages broncho-alvéolaires de poumons de rats "normaux", de souche Wistar, nous avons obtenu une population macrophagique hétérogène. Cette hétérogénéité est le fait de l'occupation du compartiment alvéolaire par des cellules macrophagiques de tout âge et, par conséquent, présentant une morphologie de cellule plus ou moins active.

Cette observation a orienté nos expériences. En effet, nous avons soumis les macrophages alvéolaires à des cultures à court terme dans le but de voir si, ayant déjà phagocyté activement dans les alvéoles, ils peuvent à nouveau exercer leurs fonctions de phagocytose et de synthèses. Le choix de la constitution du milieu dans lequel ont été cultivés les macrophages ainsi que celui de leurs temps de culture, s'est avéré déterminant.

Des macrophages alvéolaires non stimulés (issus de rats "normaux") cultivés en présence de sérum très inflammatoire (issu de rats stimulés par du BCG) ont témoigné d'une activité très intense pour un temps de culture relativement court (2h). Cela signifierait que ce sérum inflammatoire accélère le métabolisme cellulaire c'est-à-dire la formation de nouveaux organites et la synthèse d'enzymes lysosomales supplémentaires pour être capables d'éventuelles phagocytoses ultérieures. Cependant, de tels macrophages ont été cultivés avec du sérum normal, pendant une durée de culture plus importante (4h) : dans ces conditions, les cellules phagocytent déjà très bien.

Afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules macrophagiques par lavage broncho-alvéolaire, nous avons provoqué l'exsudation de monocytes sanguins en injectant à des rats "normaux" du thioglycollate par voie intrapéritonéale, quatre jours avant leur sacrifice. Cette population macrophagique grossie devrait comprendre, en plus des cellules résidentielles, assez bien de cellules d'aspect monocytaire (cellules jeunes n'ayant pas encore eu l'occasion de développer leur capacité fonctionnelle). Ce sont des cellules que nous avons qualifié de cellules stimulées.

Cependant, nous avons constaté que la population de macrophages alvéolaires issue de rats stimulés par du thioglycollate comprend un nombre encore très élevé de cellules résidentielles (repérées par la quantité de phagolysosomes observés dans leur cytoplasme) par rapport au nombre de cellules nouvellement arrivées par le phénomène de la

diapédèse. Celle-ci se serait manifestée faiblement. Pourquoi ? L'endroit où l'injection du liquide irritant a été effectuée est peut-être trop éloigné de l'appareil pulmonaire pour y susciter des réactions immunitaires à médiation cellulaire.

En général, les macrophages alvéolaires ayant déjà eu l'occasion d'exercer leurs fonctions de phagocytose et de synthèse ont besoin d'un temps de culture plus long pour "récupérer" par rapport à des macrophages péritonéaux étudiés auparavant au laboratoire. Cette "récupération" leur permet de rephagocyter aisément lorsque l'occasion leur est donnée.

Ce besoin de temps pour se débarrasser de tous leurs déchets est probablement en relation avec la localisation de ces macrophages dans l'organisme : ils sont continuellement sollicités par une très grande variété de polluants qui ne leur donne que peu de répit. Ils sont, par conséquent, sans cesse remplis de matériel phagocyté puisque qu'une exocytose est très rapidement suivie d'une endocytose.

Dans le but d'effectuer une analyse quantitative de la phagocytose, nous avons expérimenté une technique se basant sur la fluorescence des particules destinées à être ingérées. Nous avons utilisé le FACS qui est un appareil d'une très grande précision : il trie et analyse rapidement les cellules que nous lui soumettons.

Cet appareil nous a permis de sélectionner une sous-population cellulaire sur laquelle il nous a paru intéressant d'effectuer cette analyse quantitative de la phagocytose. Nous avons choisi de connaître l'évolution des grandes cellules lorsque celles-ci sont soumises à une phagocytose après des temps de culture de plus en plus élevés. Les phagocytoses ont été réalisées au départ avec des microcoques fluorescéinés afin de standardiser toutes nos expériences concernant la phagocytose. Cependant, le contraste entre l'autofluorescence naturelle des cellules macrophagiques et leur véritable fluorescence (par l'ingestion de microcoques fluorescéinés) n'était pas net. Comment expliquer qu'un bon nombre de grandes cellules du témoin négatif aient déjà présenté une certaine fluorescence ? Le matériel phagocyté auparavant dans les alvéoles est peut-être d'une composition telle que l'autofluorescence naturelle des cellules s'en soit renforcée. Nous avons également remarqué, grâce à la microscopie électronique, que lorsque nous avons mis les

cellules macrophagiques en présence de microcoques fluorescés, certains de ceux-ci paraissaient adsorbés sur la membrane des macrophages.

Nous avons alors décidé d'effectuer nos expériences de phagocytose avec des billes de latex fluorescées. Encore une fois, le contraste entre le témoin négatif et les cellules soumises à la phagocytose était très faible. Nous avons même été étonné de voir parfois une fluorescence plus élevée de la part de cellules témoins par rapport à celle de cellules ayant pu phagocyter des billes de latex fluorescées. Grâce au microscope à fluorescence, nous avons pu constater que la membrane des cellules macrophagiques était recouverte de billes fluorescentes (nous avons ajouté des billes de latex dans le milieu de suspension des cellules témoins après la fixation de ces dernières); par conséquent, il était normal que le témoin négatif témoigne d'une certaine fluorescence. Cela s'est confirmé lorsque nous avons comparé un témoin négatif avec billes de latex à un témoin négatif sans billes de latex : la fluorescence du premier a été nettement plus élevée que celle du second.

Nous avons essayé d'éliminer un maximum de billes de latex du milieu en procédant, d'une part, à une série de centrifugations et d'autre part, en soumettant les cellules macrophagiques aux ultrasons. Nos efforts ont été vains : nous avons toujours remarqué la présence de billes de latex sur la membrane plasmique des cellules macrophagiques. Comment expliquer cet "accrochage" des billes de latex à la membrane du macrophage alvéolaire ? Une suggestion intéressante réside dans la constitution tout à fait particulière de cette membrane. Le macrophage alvéolaire posséderait peut-être à sa surface des glycoprotéines particulières qui le protégeraient contre des agressions parfois violentes du milieu extérieur.

Il nous a semblé très intéressant d'effectuer une étude sur des macrophages alvéolaires humains issus de différents cas pathologiques. Comme ces macrophages ont été terriblement sollicités, il était intéressant d'essayer de voir s'ils étaient capables d'être à nouveau fonctionnels. En effet, les témoins négatifs des différents cas pathologiques ne présentent pas une morphologie de cellules bien fonctionnelles : celles-ci paraissent comme momifiées. Cependant, il leur a suffi d'une stimulus pour les rendre de nouveau actives. Ce stimulus est leur culture à court terme dans un milieu de RPMI en

présence de sérum homologue (sérum inflammatoire). Nous avons constaté que ces macrophages alvéolaires n'avaient pas besoin d'un temps de culture très long pour manifester à nouveau leurs activités. La nature du sérum ajouté au milieu de culture y est sans doute pour quelque chose. Plus il est inflammatoire, plus la durée de la culture est écourtée.

7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES D'AVENIR.

Grâce à des cultures à court terme, nous avons réussi, par des niveaux croissants de stimulation, à rendre le macrophage alvéolaire ayant déjà eu des activités métaboliques diverses, capable d'exercer à nouveau ses fonctions dont notamment la phagocytose et les synthèses enzymatiques : ces cultures lui ont en effet permis de refaire de nouveaux organites cellulaires et de s'équiper d'enzymes nouvelles dont certaines sont impliquées dans la fonction de phagocytose. L'importance de la phagocytose varie dans une même population macrophagique étant donné que celle-ci est formée de cellules très différentes les unes des autres. Cette hétérogénéité est le reflet de la diversité et de la présence continuelle de polluants contenu dans l'air inhalé.

Les macrophages alvéolaires humains que nous avons reçu ouvrent des perspectives d'avenir dans l'étude du macrophage alvéolaire. En effet, les macrophages alvéolaires, en dehors de leur fonction de phagocytose, peuvent également sécréter des enzymes ou d'autres substances mettant en cause l'intégrité de l'organisme : les macrophages alvéolaires des fumeurs sécrètent une élastase qui enlève au poumon sa constitution élastique. Plus indirectement, ils sont responsables d'importants dégâts pulmonaires, notamment en libérant un facteur chimiotactique pour les polymorphonucléaires neutrophiles qui vont, à leur tour, libérer des protéases.

Nous avons également évoqué, précédemment, que les macrophages pourraient être capables de neutraliser des composants carcinogéniques. Etant donné la fréquence des cancers à l'heure actuelle, cette hypothèse va sans doute intéresser beaucoup de chercheurs travaillant sur le problème.

Il serait également très intéressant d'effectuer une étude morphologique et histochimique approfondie sur des macrophages alvéolaires issus de poumons atteints d'ARDS. Cette étude devrait être réalisée aux différentes phases de développement de l'ARDS chez un même patient. Etant donné que les macrophages alvéolaires sont capables de libérer un facteur stimulant la prolifération des fibroblastes, on pourrait se demander s'ils ne sont pas impliqués dans l'installation de la fibrose pulmonaire qui est le stade ultime vers lequel évolue un ARDS. Si c'est le cas, n'y aurait-il pas un moyen d'inhiber ou de freiner la libération de ce facteur ? L'analyse de

macrophages alvéolaires issus d'un patient qui se trouve dans cette phase irréversible pourraient nous donner des renseignements très précieux.

Il est probable que l'étude du macrophage alvéolaire humain suscite à l'avenir beaucoup d'intérêt étant donné la fréquence des diverses pathogénies dans lequel il pourrait être impliqué.

- ADAMS, D.
Molecules, membranes and macrophages activation
Imm. Today, 29 (1982)
- AUZEPEY, Ph.
"Pour la pratique...on retiendra..."
R.P., 33,5 : 239-240 (1983)
- BACHOFEN, M., WEIBEL, E.R.
Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory
distress
syndrome
Clinics in Chest Medicine 3,1 : 35-36 (1982)
- BARRIOS, R., INOUE, S., HOGG, J.C.
Intercellular Junctions in "Shock Lung"
A freeze-fracture study
Laboratory investigation 36, 6 : 628-63 (1977)
- BLUSSE VAN OUD ALBAS, A., VAN FURTH, R.
Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the
normal steady state
J. Exp. Med. 149 : 1504-1518 (1979)
- BOWDEN, H. DRUMMOND
The alveolar macrophage
Environmental Health Perspectives, 55 : 327-341 (1984)
- BOWDEN, D.H., ADAMSON, I.Y.R.
Role of monocytes and interstitial cells in the generation of
alveolar macrophages-Kinetics studies of normal mice
Lab. Invest., 42 : 511-517 (1980)
- BRAUN, J.
Receptor cytoskeleton interaction in the lymphocyte
Imm. today 4,1 : 21-25 (1983)
- CARLET, J.
Historique, définition, classification et symptomatologie du syndrome
de détresse respiratoire de l'adulte
R.P. 33,5 : 183-189 (1983)
- CARVALHO, A.C.A.
Blood Alterations in ARDS
In : Acute Respiratory Failure
Edité par Zapol, W.M. et Falke, K.J.
New-York, 24 : 304 (1985)
- COHEN, ALLEN B., BATRA, GOPAL K.
Bronchoscopy and lung lavage induced bilateral neutrophil influx and
blood leukocytosis in dogs and monkeys
Am. rev. of respir. dis. 122 : 239-247 (1980)

COHEN, A.B., ROSSI, M.

Neutrophils in Normal lungs

Am. Rev. Respir. Dis. 127 : 53-59 (1983)

DEBRY, C., DEBY-DUPONT, G., PINCEMAIL

Lipid peroxidation and free radicals in ARDS

In : Intensive Care Symposium in Namur

Adult Respiratory Distress Syndrome (1985)

DEPELCHIN, A.

Immunologie fondamentale

Syllabus de cours, FNDP NAMUR (1985)

DEMLING, R.H.

The pathogenesis of respiratory failure after trauma and sepsis

Surg. Clin. of N. Am. 60, 6 : 1373-1390 (1980)

DIVERTIE, M.B., PETTY, T.L.

Adult respiratory distress syndrome

Current concepts, Upjohn (1979)

FAUCI, A.S.

Host-defense mechanisms against infection

Current concepts, Upjohn (1978)

GAIL, D., LENFANT, C.

Cells of the lung : biology and clinical implications

State of the Art : 366-386 (1982)

GOLDE, D.W., FINLEY, T.N., CLINE, M.J.

The pulmonary macrophage in acute leukemia

N.Engl. J. Med., 290 : 875-878 (1974)

GOLDSTEIN, I.M.

Complement in infectious diseases

Current concepts (1980)

HAMMERSCHMIDT, D.E., WEAVER, J.L., HUDSON, L.D., CRADDOCK, P.R.,
JACOB, H.S.

Association of complement activation and elevated plasma-C5a with
adult

respiratory distress syndrome

The lancet : 947-950 (1980)

HAMMOND, G.L.

Acute respiratory failure

Surgical Clinics of North America 60,5 : 1133-1149 (1980)

HARADA, RUTH N., VATTER, ALBERT E., REPINE, JOHN E.

Macrophage effector function in pulmonary oxygen toxicity . Hyperoxia
damages and stimulates alveolar macrophages to make and release
chemotoxins for polymorphonuclear leukocytes

J. of Leukocyte Biology, 35 : 373-385, (1984)

HARRIS, J.O., SWENSON, E.W., JOHNSON, J.E.
Human alveolar macrophages : comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers
The journal of clinical investigation, 49 (1970)

HASLAM, P.L.
Bronchoalveolar Lavage
Sem. in Resp. Med. 6, 1 : 55-70 (1984)

HAUMONT, S.
Histologie générale
Ed. ACCO (1976)

HENSON, P.M., McCARTY, K., LARSEN, G.L., WEBSTER, R.O., GIELAS, P.C.,
DREISIN, R.B., KIVIG, T.E., SHAW, J.O.
Complement fragments, alveolar macrophages, and alveolites
Am. J. Pathol., 97 : 93-110 (1979)

HOCKING, W.G., GOLDE, D.W.
The pulmonary alveolar macrophage
N. Engl. J. Med., 301 : 580 et 639 (1979)

HOIDAL, J.R., FOX, R.B., LEMARBRE, P.A., TAKIFF, H.E., REPINE, J.E.
Oxidative metabolism of alveolar macrophages from young asymptomatic cigarette smokers. Increased superoxide anion release and its potential consequences
Chest 77, 2 : 270-271 (1980)

HOOD, L.E., WEISSMAN, I.L., WOOD, W.B.
Immunology
Ed. Hall, J. cop. by The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC (1978)

HUBER, G.L., DRATH, D., DAVIES, P., HAYASHI, M., SHEA, J.
The alveolar macrophage as a mediator of tobacco-induced lung injury
Chest 77, 2 : 272 (1980)

HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., CRYSTAL, R.
Mechanism by which cigarette smoke attracts polymorphonuclear leukocytes to lung
Chest 77, 2 : 273 (1980a)

HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., KAWANAMI, O., FERRANS, V.J., CRYSTAL, R.G.
Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease : evaluation by bronchoalveolar lavage
Am. J. Pathol., 97 (1979)

HUNNINGHAKE, G.W., GADEK, J.E., SZAPIEL, S.V., STRUMPF, I.J., KAWANAMI, O., FERRANS, V.J., KEOGH, B.A., CRYSTAL, R.G.
The human alveolar macrophage
Methods in cell biology, 21(A) : 95-112 (1980)

JANOFF, A., WHITE, R., CARP, H., HAREL, S., DEARING, R., LEE, D.
Lung injury induced by leukocytic proteases
Am. J. Pathol., 97 : 111-136 (1979)

KIMBEL, P.
Proteolytic lung damage
Chest 77, 2 : 274-275 (1980)

KORNITZER, M., KITTEL, F.
Un cancer sur trois est dû au tabac
In : Dr Danthine, E., La revue de la médecine générale
Bruxelles, 58 : 31 (1980)

LASSER, A.
The Mononuclear Phagocytic System
In : Le, T., Les maladies histiocytaires,
Bulletin de la société liégeoise de dermatologie
Vol.9, Liège (1984)

LESLIE, R.G.Q.
Macrophage handling of soluble immune complexes
Imm. today (1980)

MARBAIX, J.
Rôle des radicaux libres de l'O₂ dans le syndrome de détresse
respiratoire aiguë
Projet I.R.S.I.A. (1984-1985)

MATAMIS, D., CARLET, J., LEMAIRE, F., RAPIN, M.
L'oedème pulmonaire lésionnel
Mise au point 7, 16 : 935-951 (1982)

MATON, J.P.
Le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte
Louvain Méd. 97 : 451-459 (1978)

McGUIRE, W., SPRAGG, R., COHEN, A., COCHRANE, C.
Studies on the pathogenesis of the adult respiratory
distress syndrome
J. Clin. Invest. 69 : 543-553 (1982)

NEWMAN, J.H.
ARDS : New insights and unsolved problems
Intensive Care Med. 9 : 303-306 (1983)

PETTY, T.L., FOWLER, A.A.
Another look at ARDS
today's practice of cardiopulm. medicine : 98-104 (1982)

POLICARD, A.
Le poumon-Structures et mécanismes à l'état normal et pathologique
Ed. Masson et Cie. Paris (1955)

POLICARD, A., GALY, P.

L'appareil broncho-pulmonaire-Structures et mécanismes à l'état normal et pathologique

Ed. Masson et Cie. Paris (1970)

PONTOPPIDAN, H., GREFFIN, B., LOWENSTEIN, E.

Acute respiratory failure in the adult

(First of Three Parts)

The new england journal of medicine 287, 14 : 690-751 (1972)

PRAKASH, O.

Applied Physiology in Clinical Respiratory Care

Chap.2 : 20 (1982)

PRATT, S.A., SMITH, M.H., LADMAN, A.J., FINLEY, T.N.

The ultrastructure of alveolar macrophages from human cigarette smokers

and nonsmokers

Laboratory investigation 24, 3 : 331-338 (1971)

PRATT, P.C.

Pathology of adult respiratory distress syndrome : implications regarding therapy

Seminars in Resp. Med. 4, 2 : 79-85 (1982)

RABINOVITCH, M.

Phagocytic Recognition

In : Mononuclear phagocytes

Ed. Furth, R., Oxford, Blackwell, 299 (1979)

RATLIFF, N.B.

The alveolar wall in the shock lung

Pathob. of cell membr. 2, chap. 8 : 345-374 (1980)

READ, C.E., de SHAZO, R.

Aspects immunologiques des pneumopathies granulomateuses et interstitielles

JAMA-edition belge, 25 : 57-71 (1984)

RENNARD, S.I., HUNNINGHAKE, G.W., BITTERMAN, P.B., CRYSTAL, R.G.

Production of fibronectin by the human alveolar macrophage : mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites to tissue injury in interstitial lung diseases

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 11 : 7147-7151 (1981)

REPINE, J.E.

Neutrophils, oxygen radicals, and acute pulmonary edema

In : Acute Respiratory Failure

Ed. Zapol, W.M., Falke, K.J. New-York, 24, chap.10 : 347-351 (1985)

REYNOLDS H. Y.

Lung inflammation : role of endogenous chemotactic factors in attracting polymorphonuclear granulocytes

Am. Rev. Resp. Dis., 127 : 516-525 (1983)

RIEDE, U.N., MITTERMAYER, CH., FRIEDBURG, H., WYBITUL, K., SANDRITTER, W.

Morphologic Development of Human Shock Lung
Path. Res. Pract. 165 : 269-286 (1979)

SAID, S.I.

Metabolic and endocrine functions of the lung
Current Concepts : 3-14 (1979)

SHAW, J.O., WETSEL, R.A., KOLB, W.P.

Complement in the lung

In : Acute Respiratory Failure

Ed. Zapol, W.M., Falke, K.J., New-York, 24, 12 : 417-425 (1985)

SIBBALD, W.J.

The adult respiratory distress syndrome.

Etiology, Pathophysiology and Management

Current hospital topics : 5-12 (1983)

STAUB, N.C.

Pulmonary edema due to increased microvascular permeability

Am. Rev. Med., 32 : 291-312 (1981)

STOSSEL, Th.

Lung defense, injury and repair

Conference Summary : 100-103 (1983)

SUTTORP, N., SIMON, L.M.

Decreased bactericidal function and impaired respiratory burst in lung macrophages after sustained in vitro hyperoxia

Am. Rev. Resp. Dis., 128 : 486-490 (1983)

TENAILLON, A., SALMONA, J.P., BURDIN, M., SEROR, B.

Physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aigüe de l'adulte (SDRA)

R.P. 33, 5 : 191-203 (1983)

UNGEWICKELL, E., BRANTON, D.

Triskelions : the building block of clathrin coats

Elsevier Biom. Press. (1982)

VAN FURTH, R.

The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice

In : Mononuclear Phagocytes, Ed. Van Futh, R., Oxford

Blackwell, 151 (1970)

VAN FURTH, R.

Cells on the mononuclear system. Nomenclature in terms of sites and conditions

In : Mononuclear Phagocytes-Functionnal Aspects, 1-30

Ed. Van Furth, R., Martinus Nijhoff Publishers. The Hague (1980)

VELLUTI, G., CAPELLI, O., LUSUARDI, M., BRAGHIRDI, A., AZZOLINI, L.
Bronchoalveolar lavage in the normal lung
Respiration, 46 : 1-7 (1984)

VOISIN, C., AERTS, C., FOURNIER, E., FIRLIK, M.
Acute effect of tobacco smoke on alveolar macrophages cultured in gas
phase
Eur. J. Resp. Dis., 66, 139 : 76-81 (1985)

VRAY B.
La fonction phagocytaire des macrophages
Ann. Biol. Clin., 42 : 95-99 (1984)

VRAY, B., SAINT-GUILLAIN, M., LELOUP, R., HOEBEKE, J.
Kinetic and morphologic studies on rat macrophage phagocytosis
J. Reticuloend. Sol., 29,4 :307-319 (1981)

WEISS, L.
The cells and tissues of the immune system-Structure, Functions,
Interactions
Ed. Weiss, L., Osler, A.J., New-York (1982)
Foundations of immunology series

WEISBART R. H., GOLDE D. W., CLARK S. C., WONG G. G., GASSOU J. C.
Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is a neutrophil
activator
Nature, 314 : 361-363, 1985

WERB, Z.
How the macrophage regulates its extracellular environment
The American J. of Anatomy, 166 : 237-256 (1983)

ZAPOL, W.M., RIE, M.A., FRIKKER, M., SMIDER, M.T., QUINN, D.A.
Pulmonary circulation during ARDS
In : Acute Respiratory Failure
Ed. Zapol, W.M., Falke, K.J., New-York, 24, 7 : 246 (1985)

ZIMMERMAN, G.A., RENZETTI, A.D., HILL, H.R.
Circulating polymorphonuclear leukocyte activity in patients with the
ARDS-Implications for pulmonary vascular injury
Lung defense injury and repair : 87-88 (1983)