

Université de Sherbrooke

**Caractérisation de l'activité cytotoxique
naturelle des cellules Foà-Kurloff**

**Par
Normand Pouliot B.Sc.
Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)**

Juillet 1991



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-76229-2

Canada

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	II
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Résumé.....	XI
1 Introduction.....	1
1.1 Découverte des cellules Foà-Kurloff.....	2
1.2 Stimulation de la production des cellules Kurloff.....	3
1.2.1 Effets des hormones.....	3
1.2.2 Effet de la cyclophosphamide et de la cyclosporine A.....	5
1.3 Morphologie des cellules Kurloff.....	5
1.4 Nature et composition du corps d'inclusion.....	6
1.5 Distribution tissulaire des cellules Kurloff.....	8
1.6 Classification des cellules Kurloff.....	10
1.7 Origine des cellules Kurloff.....	11
1.8 Fonctions des cellules Kurloff.....	13
1.9 Activité cytotoxique naturelle à médiation cellulaire.....	14
1.9.1 Activité NK.....	14
1.9.2 Activité NC.....	16
1.10 Objectifs du travail.....	16
2. Matériel et méthodes.....	18

2.1 Animaux.....	19
2.2 Purification des cellules Kurloff.....	19
2.3 Cellules cibles tumorales.....	21
2.4 Marquage des cellules cibles.....	21
2.5 Essai de cytotoxicité.....	22
2.5.1 Effet des lectines Con A et PHA.....	23
2.5.2 Effet du calcium et du magnésium.....	23
2.5.3 Effet du TPA et de l'ionomycine.....	24
2.5.4 Effet des inhibiteurs de protéine kinases H-7 et HA 1004.....	25
2.5.5 Effet des bloqueurs des canaux calciques vérapamil et diltiazem.....	26
2.5.6 Effet de l'ionophore carboxylique monensin.....	26
2.6 Formation de conjugués effecteur:cible.....	27
2.6.1 Effet des lectines Con A et PHA.....	28
2.6.2 Effet des agents chélateurs EDTA et EGTA.....	28
2.7 Microscopie électronique des conjugués effecteur:cible.....	28
2.7.1 Microscopie électronique à transmission.....	28
2.7.2 Microscopie électronique à balayage.....	30
2.8 Production de surnageants actifs de cellules Kurloff.....	31
2.9 Méthode de dosage du TNF.....	32
2.10 Essai de cytotoxicité des surnageants actifs de cellules Kurloff.....	33
2.10.1 Essai de cytotoxicité des surnageants fractionnés.....	33
2.10.2 Neutralisation des surnageants par des anticorps anti-TNF.....	35

2.11	Méthode de dosage des sérines estérases.....	35
2.12	Analyses statistiques.....	37
3.	Résultats.....	38
3.1	Spécificité lytique des cellules Kurloff.....	39
3.2	Effet des lectines sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff.....	39
3.3	Effet des lectines sur la formation de conjugués.....	42
3.4	Caractérisation microscopique des conjugués effecteur:cible.....	44
3.5	Effet des cations sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff....	47
3.6	Effet du TPA et de l'ionomycine sur l'activité NK des cellules Kurloff.....	50
3.7	Effet du vérapamil et du diltiazem sur l'activité NK des cellules Kurloff.....	53
3.8	Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par le monensin.....	56
3.9	Relâchement de sérine esterases par les cellules Kurloff.....	58
3.10	Activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules cibles WEHI 164.....	58
3.11	Production de TNF par les cellules Kurloff.....	64
3.12	Neutralisation de l'activité cytotoxique des surnageants de cellules Kurloff par des anticorps anti-TNF.....	66
3.13	Effet du monensin sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff.....	68
3.14	Fractionnement des surnageants de cellules Kurloff.....	68
4.	Discussion.....	72
5.	Remerciements.....	91
6.	Bibliographie.....	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Spécificité lytique des cellules Kurloff.....	40
Figure 2.	Effet de la PHA sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff.....	41
Figure 3.	Conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1 en microscopie électronique à transmission.....	45
Figure 4.	Conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1 en microscopie électronique à balayage.....	46
Figure 5.	Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par l'EDTA et l'EGTA.....	48
Figure 6.	Effet du Ca ⁺⁺ et du Mg ⁺⁺ sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff.....	49
Figure 7.	Effet du TPA et de l'ionomycine sur l'activité NK des cellules Kurloff.....	52
Figure 8.	Effet du H-7 et du HA 1004 sur l'activité NK des cellules Kurloff.....	54

Figure 9.	Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par les bloqueurs de canaux calciques vérapamil et diltiazem	55
Figure 10.	Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par le monensin.....	57
Figure 11.	Activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules cibles WEHI 164.....	61
Figure 12.	Effet du TPA et de l'ionomycine sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff.....	62
Figure 13.	Production de TNF par les cellules Kurloff.....	64
Figure 14.	Neutralisation de l'activité cytotoxique des surnageants de cellules Kurloff contre les cellules WEHI 164 par des anticorps anti-TNF.....	67
Figure 15.	Effet du monensin sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff.....	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Effet des lectines sur la formation de conjugués effecteur:cible.....	43
Tableau 2.	Effet de l'EDTA et de l'EGTA sur la formation de conjugués effecteur:cible.....	51
Tableau 3.	Relâchement de sérine estérases par les cellules Kurloff.....	59
Tableau 4.	Activité cytotoxique des surnageants de cellules Kurloff.....	65
Tableau 5.	Activité cytotoxique des surnageants fractionnés de cellules Kurloff contre les cellules cibles WEHI-164.....	70

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC:	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)
BLT:	Ester de N α -CBZ-L-lysine thiobenzyl
BSA:	Albumine sérique de boeuf (Bovine Serum Albumine)
Con A:	Concanavaline A
DMSO:	Diméthyl-sulfoxyde
DTNB:	Acide 5,5'-dithio-bis (2 nitrobenzoïque)
EDTA:	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA:	Acide éthylène glycol-bis-(β -aminoéthyl éther N,N,N'N'- tétraacétique)
FBS:	Sérum de veau foetal (Fetal bovine serum)
H-7:	1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-méthylpiperazine)
HA 1004:	1-N-(2-guanidinoéthyl-5-isoquinolinesulfonamide)

HS:	Sérum de cheval (Horse Serum)
LDCC:	Cytotoxicité cellulaire dépendante des lectines (Lectin-Dependent Cellular Cytotoxicity)
MEB:	Microcopie Électronique à Balayage
MET:	Microscopie Électronique à Transmission
NC:	Cytotoxique naturelle (Natural Cytotoxic)
NK:	Tueuse naturelle (Natural Killer)
NKCF:	Facteur cytotoxique des cellules tueuses naturelles (Natural Killer Cytotoxic Factor)
PAS:	Acide périodique Schiff (Periodic Acid Schiff)
PBS:	Tampon phosphate salin (Phosphate Buffer Saline)
PDBu:	Phorbol 12,13-dibutyrate
PHA:	Phytohémagglutinine P
PKC:	Protéine Kinase C

TNF: Facteur de nécrose des tumeurs
(Tumor Necrosis Factor)

UN: Unité neutralisante

RESUME

Les cellules Kurloff sont des cellules mononuclées spécifiques du cobaye et caractérisées par la présence d'un grand corps d'inclusion cytoplasmique. Le présent travail traite principalement de l'étude de leurs mécanismes de cytotoxicité naturelle in vitro par essai de relâchement spécifique de ^{51}Cr .

En utilisant des populations purifiées (>95%) de cellules Kurloff et diverses lignées cellulaires cibles, nous avons observé que l'activité cytotoxique NK (Natural Killer) des cellules Kurloff était sélective, démontrant une forte activité contre la cellule cible murine NK-sensible YAC-1, une activité intermédiaire contre la cellule cible humaine NK-sensible K562 et une activité minimale contre la cellule cible NK-résistante P815.

La cytotoxicité des cellules Kurloff était considérablement augmentée contre les deux cibles murines YAC-1 et P815 en présence de PHA mais n'était pas modifiée par le prétraitement des cellules effectrices avec la lectine.

L'inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par chélation du Ca^{++} ou par prétraitement avec les bloqueurs calciques, vérapamil et diltiazem, indiquent que l'activité cytotoxique des cellules Kurloff est dépendante de la présence de

Ca⁺⁺ extracellulaire et de l'influx de Ca⁺⁺ extracellulaire dans la cellule effectrice.

De plus, l'activité cytotoxique des cellules Kurloff était considérablement augmentée en présence de l'ester de phorbol TPA et partiellement inhibée par l'inhibiteur de la PKC, H-7. Ceci suggère un rôle de la PKC dans l'activation du programme lytique des cellules Kurloff.

L'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff par le monensin suggère que la lyse des cellules cibles est médiée via le relâchement de facteurs cytotoxiques par les cellules Kurloff, parmi lesquels les sérine estérases seraient possiblement impliquées.

Les cellules Kurloff ont aussi démontré une forte activité cytotoxique contre les cellules cibles TNF-sensibles WEHI 164 dans les essais de 18 heures. Une cytotoxicité moindre, mais significative était également observée après seulement 4 heures. Toutefois, nos résultats suggèrent des mécanismes de lyse différents dans les essais de 18 heures et de 4 heures.

La lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff dans l'essai de 4 heures était considérablement augmentée en présence de TPA seul ou de TPA + ionomycine tandis que l'ionomycine seule n'avait aucun effet. Au contraire, la stimulation des cellules Kurloff pendant 18 heures avec l'ionomycine seule était

suffisante pour induire le relâchement de facteur(s) TNF-like tel que démontré par bioessai de TNF en utilisant les cellules cibles TNF-sensibles, L-929. Le relâchement de ces facteurs pouvait aussi être induit par stimulation avec les cellules WEHI 164. Les surnageants de cellules Kurloff stimulées 18 heures avec le TPA et l'ionomycine étaient très cytotoxiques contre les cellules cibles WEHI 164 mais étaient inactifs contre les cellules cibles TNF-résistantes, P815. La cytotoxicité de ces surnageants était presque totalement inhibée en présence d'anticorps anti-TNF α murins. Au contraire, les surnageants de cellules Kurloff stimulées pendant seulement 4 heures n'ont démontré aucune activité TNF-like contre les cellules L-929 et n'étaient pas non plus cytotoxiques contre les cellules WEHI 164.

L'activité cytolytique des cellules Kurloff contre les cellules WEHI 164 était partiellement bloquée par le monensin dans l'essai de 4 heures et de 18 heures, quoique l'effet inhibiteur observé était plus marqué dans l'essai de 4 heures.

L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules Kurloff jouent un rôle primordial dans la défense anti-tumorale du cobaye en utilisant différents mécanismes lytiques.

Introduction

L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire porte principalement sur l'étude du mécanisme de l'activité cytotoxique de la cellule Foà-Kurloff et de son rôle dans la défense immunitaire du cobaye, en particulier contre les cellules tumorales. Nous tenterons au cours de cette introduction de décrire de façon exhaustive l'ensemble des connaissances acquises sur cette cellule depuis une centaine d'années. Parallèlement nous essaierons de mettre en évidence les similarités entre les différentes caractéristiques attribuées aux cellules Foà-Kurloff et celles des cellules tueuses naturelles ou NK (natural killer) étudiées chez l'homme et chez les modèles murins. Cette comparaison permettra au lecteur de constater l'étroite ressemblance entre ces deux types cellulaires et de comprendre par le fait même les motivations et objectifs de nos recherches.

1.1 DÉCOUVERTE DES CELLULES FOA-KURLOFF

La cellule Foà-Kurloff, communément appelée cellule Kurloff, fût décrite pour la première fois indépendamment par FOA et CARBONE à Turin et par KURLOFF à Frankfurt en 1889. Ce dernier, au cours d'études sur le sang de cobayes splénectomisés fit l'observation d'un groupe de cellules qu'il décrit comme "des cellules caractéristiques du cobaye, possédant une grande vacuole cytoplasmique ressemblant à un noyau et contenant un *SEKRETSTOFF* élaboré par la cellule ". Il estima leur proportion à 15 à 20% des leucocytes sanguins.

La même année, FOA et CARBONE qui étudiaient les types cellulaires dans la rate du cobaye en firent une description beaucoup plus détaillée, accompagnée d'illustrations, insistant sur leur morphologie typique. Au cours de la même étude, ces auteurs ont observé la présence de ces cellules au niveau du sang périphérique, de la pulpe splénique et en quantité moindre au niveau de la moelle osseuse. Toutefois, l'observation la plus importante que ces auteurs firent fût que le nombre de cellules Kurloff augmentait considérablement dans la rate des cobayes femelles durant la période de gestation. LEDINGHAM, qui à ce moment n'était pas familier avec les travaux de FOA et CARBONE, fit la même observation en 1906.

1.2 STIMULATION DE LA PRODUCTION DES CELLULES KURLOFF

1.2.1 Effet des hormones

Suite aux observations de FOA et CARBONE (1889) et de LEDINGHAM (1906), plusieurs auteurs (revue par REVELL, 1977) ont cherché à établir un lien entre l'augmentation du nombre de cellules Kurloff et la sécrétion d'hormones sexuelles chez le cobaye. Ces travaux ont permis de démontrer que la castration des animaux mâles ou femelles induisait la disparition complète des cellules Kurloff dans le sang et dans la rate (ALEXEIFF ET JOUKOFF, 1928a; ALEXEIFF ET JOUKOFF, 1928b; WADA, 1928). L'administration d'extraits d'organes sexuels

(spermine et ovaricine) à ces animaux, permettait de rétablir le niveau normal de cellules Kurloff. Les travaux de LEDINGHAM (1940) furent encore plus convaincants. Celui-ci avait noté une corrélation étroite entre les variations cycliques du nombre de cellules Kurloff présentes dans le sang de femelles normales et leur cycle de production d'estrogènes de 16 jours. Il démontra clairement par la suite, que le nombre et la taille de ces cellules augmentaient considérablement en réponse à l'injection d'estradiol chez le mâle et la femelle. L'augmentation du nombre de cellules Kurloff n'était cependant pas immédiate mais apparaissait plutôt quelques jours après l'injection d'estrogènes suggérant un effet indirect sur les cellules Kurloff. Les travaux récents de SANDBERG et HAGELIN (1986) abondent dans le même sens. Ces auteurs ont tenté sans succès d'induire la formation de cellules Kurloff in vitro à partir d'extraits de moelle osseuse, de rate et de thymus mis en présence d'estrogènes. Toutefois, LANDEMORE et coll. (1988) ont relancé le débat en démontrant la présence de récepteurs de faibles affinités pour les estrogènes dans les extraits cytosoliques de cellules Kurloff. Les mécanismes d'induction des cellules Kurloff par les estrogènes demeurent donc toujours obscurs.

Les premières recherches effectuées chez la souris ont montré que les estrogènes avaient un effet inhibiteur sur la formation des cellules NK (SEAMAN et coll., 1978; HANNA et SCHNEIDER, 1982). Cependant, des recherches plus approfondies (SCREPANTI et coll., 1987) ont montré que les estrogènes avaient

un effet biphasique sur la formation des cellules NK selon la concentration utilisée et la durée du traitement, observation que nous avons aussi faite chez les cellules Kurloff au cours de nos recherches.

1.2.2 Effet de la cyclophosphamide et de la cyclosporine A

Des études récentes menées par SEWELL et coll. (1988) et par THOMPSON et coll. (1988), ont démontré que l'administration de cyclophosphamide en combinaison avec de la cyclosporine A chez le cobaye induisait la formation de cellules Kurloff. L'étude comparative avec des rats ayant reçus le même traitement a permis d'établir une corrélation entre l'élévation du nombre de cellules Kurloff dans la rate du cobaye et celle des cellules NK chez le rat. L'analyse des antigènes de surface des cellules Kurloff retrouvées dans la rate après ce traitement a démontré que leur phénotype (CT7⁺, MSgp12⁻, CT6⁻) était analogue à une population lymphocytaire humaine capable de médier une activité NK (CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻).

1.3 MORPHOLOGIE DES CELLULES KURLOFF

En microscopie optique la cellule Kurloff se distingue principalement par la présence d'un grand corps d'inclusion occupant la presque totalité du cytoplasme et pouvant être mis en évidence par une coloration PAS (Periodic

Acid Schiff). Le noyau apparaît fréquemment déformé par le corps d'inclusion (REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976). Les principales caractéristiques observées en microscopie électronique sont; 1) le corps d'inclusion cytoplasmique dense aux électrons, 2) la présence de figures de myéline et de mitochondries situés en périphérie du corps d'inclusion, 3) un appareil de Golgi très développé et 4) une abondance de réticulum endoplasmique granulaire généralement situé entre le noyau et le corps d'inclusion ou en périphérie du cytoplasme (REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976).

1.4 NATURE ET COMPOSITION DU CORPS D'INCLUSION

De toutes les caractéristiques des cellules Kurloff, la présence d'un corps d'inclusion cytoplasmique est sans aucun doute celle qui a suscité le plus d'intérêts. Plusieurs théories ont été élaborées pour expliquer sa présence (revue par LEDINGHAM, 1940). La théorie parasitaire suggérait que le corps d'inclusion représentait des parasites intracellulaires de type spirochète, rickettsi et autres (LEDINGHAM, 1906; ROSS, 1912). Cette théorie ne reposait cependant que sur des observations microscopiques. LEDINGHAM (1940) n'a d'ailleurs jamais pu observer la formation de cellules Kurloff suite à l'infection de cobayes par des microorganismes. La théorie phagocytaire avancée par WOODCOCK (1921), stipulait que le corps d'inclusion représentait un érythrocyte phagocyté. Cette hypothèse était basée sur la détection de fer au niveau du corps d'inclusion.

Cependant, ces observations n'ont jamais pu être confirmées par d'autres auteurs. De plus, les expériences effectuées par WELSH (1966) n'ont révélé aucune évidence de phagocytose par les cellules Kurloff contrairement aux résultats obtenus avec les macrophages. La théorie nucléaire élaborée par LEINATI en 1932 (cité par LEDINGHAM, 1940), basée sur des observations microscopiques, disait que le corps d'inclusion se formait suite à une dégénérescence de la moitié du noyau. Finalement, la théorie de sécrétion avancée en premier lieu par KURLOFF (1889) stipulait que le corps d'inclusion était d'origine endocrine et sécrété par la cellule. Les travaux de LEDINGHAM (1940) sur la castration des animaux et l'induction de la formation des cellules Kurloff par des traitements à l'estradiol appuyait cette théorie. Les évidences accumulées par les travaux subséquents de plusieurs auteurs (MARSHALL et SWETTENHAM, 1959; MUIR et MARSHALL, 1961; DEAN et MUIR, 1970; LANDEMORÉ et coll., 1984; LANDEMORÉ et coll., 1986; LETAIEF et coll., 1989) ont confirmé que le corps d'inclusion provient de la synthèse interne de la cellule et est composé de complexes chondroïtine sulfate-glycosaminoglycan. Une étude comparative entre différentes espèces a permis de démontrer la présence de protéoglycans de même type chez les cellules spléniques humaines, de rats, de porcs et de moutons (DEAN et MUIR, 1971).

Plusieurs évidences ont aussi été accumulées quant à la nature lysosomale du corps d'inclusion. TIFFON et coll. (1986) et LANDEMORÉ et coll. (1987) ont

observé une forte activité phosphatase acide et triméthaphosphatase localisée au niveau du corps d'inclusion tandis que BUAT et coll. (1988) ont démontré une activité arylsulfatase en périphérie du corps d'inclusion. La présence simultanée de glycosaminoglycans et de ces enzymes est aussi en faveur de la nature lysosomale du corps d'inclusion. Une telle association a été observée dans les lysosomes primaires des leucocytes (AVILA et CONVIT, 1975); PARMLEY et coll., 1979) et plus particulièrement dans les granules de cellules NK humaines (MacDERMOTT et coll., 1985; PARMLEY et coll., 1985), où les glycosaminoglycans auraient le rôle de stocker et de prévenir l'activation prématurée des enzymes.

1.5 DISTRIBUTION TISSULAIRE DES CELLULES KURLOFF

Plusieurs études ont porté sur la distribution tissulaire des cellules Kurloff (revue par REVELL en 1977). Malgré certaines discordances concernant la proportion de cellules retrouvées dans chacun des organes étudiés, l'ensemble des travaux tendent à démontrer que les cellules Kurloff sont retrouvées dans la plupart des organes richement vascularisés et que leur nombre augmente suite à l'administration d'estrogènes. Dans le thymus, les cellules Kurloff sont localisées majoritairement au niveau du cortex, tandis que dans la rate, probablement l'organe le plus riche en cellules Kurloff, elles sont retrouvées exclusivement dans la pulpe rouge (ERNSTROM et SANDBERG, 1971; REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976). Les cellules Kurloff ont aussi été observées en grand nombre dans

les vaisseaux sanguins périphériques, dans les capillaires alvéolaires du poumon et dans les canaux vasculaires du foie (LENDRUM, 1952; REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976; KITTAS et coll., 1979). Elles sont présentes en moins grand nombre dans la moelle osseuse (REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976) et sont absentes ou en très faible quantité dans les nodules lymphoïdes (ERNSTROM et SANDBERG, 1971; LENDRUM, 1952; REVELL et coll., 1971). Chez la femelle en gestation, la présence de cellules Kurloff a été observée dans les canaux vasculaires du placenta (MARSHALL et coll., 1971; REVELL et coll., 1976; KITTAS et coll., 1979).

Parmi les différents organes étudiés, ALTMAN et RAPP (1978), ont démontré que la rate et le sang périphérique constituaient la principale source de cellules capables d'activité NK chez le cobaye. Par contre l'activité NK mesurée sur des cellules obtenues du thymus et des nodules lymphoïdes était nulle ou très faible. Il semble donc, qu'à l'exception du thymus, il existe une corrélation entre la distribution des cellules Kurloff et celle de l'activité NK chez le cobaye. Toutefois, il est intéressant de noter que les thymocytes humains mis en culture en présence d'interleukine-2 peuvent développer une activité NK (TORTEN et coll., 1982; TORIBIO et coll., 1983).

1.6 CLASSIFICATION DES CELLULES KURLOFF

La classification des cellules Kurloff parmi la lignée myéloïde ou lymphoïde est depuis longtemps sujet à controverse. Morphologiquement, la cellule Kurloff ressemble à un grand lymphocyte possédant un ratio cytoplasme/noyau élevé (IZARD et coll., 1976). Contrairement aux monocytes/macrophages, les cellules Kurloff n'adhèrent pas au plastique (NOGA et coll., 1984) et ne possèdent pas d'activité phagocytaire (WELSH, 1966). Une autre caractéristique en faveur de la lignée lymphoïde est la présence de récepteurs de surface pour les érythrocytes de lapin traités à la papaine, un marqueur de lymphocyte T chez le cobaye (WILSON et COOMBS, 1973). Par contre, la cellule Kurloff est absente ou en faible quantité dans les organes normalement associés aux cellules lymphoïdes soit, la pulpe blanche de la rate, le parenchyme du thymus et les nodules lymphoïdes (LENDRUM, 1952; REVELL et col., 1971; ERNSTROM et SANDBERG, 1971). Elle exprime aussi des récepteurs Fc pour les anticorps cytophiles (Fc γ R), une propriété commune aux monocytes et macrophages (WILSON et COOMBS, 1971).

La cellule Kurloff partage donc des propriétés associées aux deux lignées cellulaires et en ce sens, démontre certaines similarités avec les cellules NK humaines. Tout comme les cellules Kurloff du cobaye, les cellules NK humaines

possèdent des propriétés physiques et phénotypiques retrouvées chez les monocytes/macrophages et chez les lymphocytes (RODER et PROSS, 1982; TRINCHIERI, 1989). Elles sont associées à une population lymphocytaire appelée LGL (Large Granular Lymphocyte) caractérisées par un ratio cytoplasme/noyau élevé et par la présence de granules cytoplasmiques (TIMONEN et coll., 1981; TIMONEN et coll., 1982). Elles n'adhèrent pas au plastique et ne possèdent pas d'activité phagocytaire (HERBERMAN et coll., 1979; HERBERMAN et ORTALDO, 1981). Elles expriment le récepteur Fc γ R et environ 50% forment des rosettes de faible affinité avec les érythrocytes de mouton, un marqueur de lymphocytes T chez l'homme (HERBERMAN et coll., 1979; HERBERMAN et ORTALDO, 1981; RODER et PROSS, 1982).

1.7 ORIGINE DES CELLULES KURLOFF

L'organe d'origine des cellules Kurloff n'a toujours pas été identifié. Une origine thymique a été proposée par BIMES et coll., (1964) et par RUTH et coll. (1964) suite à l'observation de colonies de cellules Kurloff dans les jonctions corticomédullaires du thymus. ERNSTROM et SANDBERG (1971) ont effectué une étude comparative du contenu cellulaire des vaisseaux afférents et efférents de la rate, du thymus et des nodules lymphoïdes. Contrairement aux résultats obtenus pour le thymus et les nodules lymphoïdes, ces auteurs ont noté que le nombre de cellules Kurloff était plus élevé dans les canaux efférents de la rate que

dans les canaux afférents, suggérant la formation de ces cellules au niveau de la rate. Malgré ces évidences expérimentales, il est peu probable que le thymus et la rate soient impliqués dans la formation des cellules Kurloff puisqu'il a été démontré que le taux de formation des cellules Kurloff n'était pas influencée par thymectomie des cobayes et était même augmentée suite à une splénectomie (HEINLE et HEYDINGER, 1944; RANLOV et coll., 1970).

KITTAS et coll. (1979) ont suggéré que les cellules Kurloff trouvaient origine dans la moelle osseuse. Ces auteurs ont observé que suivant l'administration d'exoestrol pour une période de 1 à 10 semaines, le nombre de cellules Kupffer du foie augmentait durant la première semaine. Par contre, lorsque le traitement était maintenu (jusqu'à 10 semaines), ils observaient une diminution de leur nombre au cours des dernières semaines et une augmentation simultanée du nombre de cellules Kurloff. Parallèlement, ils ont observé que chez la souris (ne possédant pas de cellules Kurloff) ayant reçu le même traitement, le nombre de cellule Kupffer augmentait progressivement de 1 à 10 semaines de traitement. Ces résultats suggéraient donc, une relation entre ces deux types cellulaires chez le cobaye et les auteurs ont proposé que les cellules de Kupffer et Kurloff dérivait probablement de la même cellule progénitrice au niveau de la moelle osseuse.

Quant à l'origine des cellules NK chez l'homme ou la souris, les

expériences d'irradiation et de transplantation de moelle osseuse ont clairement démontré qu'elles sont formé au niveau de cet organe (HALLER et coll., 1977; ROONEY et coll., 1986; LUM, 1987).

1.8 FONCTION DES CELLULES KURLOFF

Le rôle précis des cellules Kurloff n'a toujours pas été établi de façon claire. La présence de récepteurs de surface (Fc γ R) pour les anticorps cytophiles démontrée par WILSON et COOMBS (1971), suggère un rôle possible dans les réactions allergiques.

MARSHALL et coll. (1970) et MARSHALL et coll. (1971) ont proposé un rôle possible dans la défense contre le rejet immunologique du placenta. L'observation de gouttelettes fluorescentes (par immunofluorescence indirecte dirigée contre les protéoglycans du corps d'inclusion) entourant les cellules Kurloff dans les canaux vasculaires du placenta, suggérait l'exocytose du corps d'inclusion. Des évidences d'exocytose ont aussi été rapportées par LANDEMORE et coll. (1983). De plus, des études *in vitro* ont démontré que la fraction mucopolysaccharidique du corps d'inclusion pouvait exercer un effet cytotoxique sur les macrophages *in vitro* (MARSHALL et coll., 1970, MARSHALL et coll., 1971), et que les protéoglycans du corps d'inclusion pouvaient inhiber leur migration (REVELL et coll., 1972; DEAN et MUIR, 1975).

L'exocytose des protéoglycans a aussi été rapportée chez les cellules NK humaines (MacDERMOTT et coll., 1985; SCHMIDT et coll., 1985). Des études récentes suggèrent également un rôle possible des cellules NK dans la défense immunologique du placenta (Parr et coll., 1990).

Récemment, plusieurs évidences ont été accumulées quant au rôle des cellules Kurloff dans la défense anti-tumorale. EREMIN et coll. (1980a) ont démontré leur activité cytotoxique dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity). Une activité cytotoxique de type NK lui a aussi été attribuée (EREMIN et coll., 1980b). Depuis le développement de méthodes de purification des cellules Kurloff par gradient de densité, (LANDEMORE et coll., 1984; NOGA et coll., 1984; DEBOUT et coll., 1984; MAGHNI et coll., 1991) l'activité NK a été démontrée sur des populations purifiées de cellules Kurloff (DEBOUT et coll., 1984).

1.9 ACTIVITE CYTOTOXIQUE NATURELLE A MEDIATION CELLULAIRE

1.9.1 Activité NK

La cytotoxicité naturelle à médiation cellulaire joue un rôle crucial dans la défense anti-tumorale (HERBERMAN et HOLDEN, 1978; HANNA et BURTON, 1981; PUCETTI et coll., 1980). A cet égard, les cellules NK ont reçu beaucoup

d'attention. Contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL), leur activité cytotoxique s'exerce indépendamment de la présence d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (HERBERMAN et coll., 1975; KIESSING et coll., 1978) et ne nécessite pas de présensibilisation (HERBERMAN et GAYLORD, 1973). Leur action est rapide (<4 heures) et a été observée in vitro contre des cellules tumorales (TAKASUGI et coll., 1973), des cellules normales (TIMONEN et coll., 1979) et des cellules infectées par un virus (ROLA-PLESZCZYNSKI, 1980; FITZGERALD et coll., 1983). Les lignées cellulaires K 562 dérivant de leucémie érythrocytaire et YAC-1 dérivant de lymphome induit par le virus de Maloney chez des souris A/Sn sont les prototypes de cellules cibles utilisées pour mesurer l'activité NK in vitro chez l'homme et le rat ou la souris respectivement.

Le mécanisme d'action des cellules NK a été étudié par plusieurs auteurs (revue par YOUNG et COHN, 1987; TRENCHIERI 1989). Suite à la liaison à une cellule cible, la cellule NK activée subit plusieurs changements morphologiques tels que; la réorientation du cytosquelette, de l'appareil de Golgi et des granules cytoplasmiques vers la cellule cible (CARPEN et SAKSELA, 1988), conduisant à l'exocytose des facteurs cytotoxiques contenus dans les granules, NKCF (Natural Killer Cytotoxic Factors), perforine, et sérine estérases (FREY et coll., 1982; WRIGHT et coll., 1983; SASHCHENKO et coll., 1988; ATKINSON et coll., 1990). Subséquemment, la lyse de la cellule cible s'effectue indépendamment de la présence de cellule effectrice (HISERODT et coll., 1982).

1.9.2 Activité NC

Les cellules NC (Natural Cytotoxic) représentent une deuxième composante de l'immunité à médiation cellulaire. Quoique ces cellules partagent plusieurs similarités avec les cellules NK, elles diffèrent par divers aspects tels que leur sélectivité envers les cellules cibles, leur cinétique de lyse et leur sensibilité aux facteurs de régulation (interleukine-2, interleukine-3, et interféron) (PAIGE et coll., 1978; STUTMAN et coll., 1978; STUTMAN et coll., 1980; DJEU et coll., 1983; PATEK et coll., 1987). La cellule cible standard utilisée pour mesurer l'activité NC *in vitro* est la cellule WEHI 164 dérivée d'un fibrosarcome murin induit par le 3-méthylcholanthrène. Contrairement à l'activité NK, l'activité NC nécessite une période d'incubation d'environ 18 heures pour une détection optimale (PATEK et coll., 1987). Les études visant à élucider leur mécanisme d'action ont révélé que l'activité lytique des cellules NC est médiée par un facteur soluble, le facteur de nécrose des tumeurs ou TNF (Tumor Necrosis Factor) (ORTALDO et coll., 1986; PATEK et coll., 1987).

1.10 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les connaissances scientifiques accumulées depuis la découverte des cellules Kurloff, nous ont révélé que ces cellules ressemblent en plusieurs points aux cellules NK classiques étudiées chez l'humain, le rat et la souris

(morphologie, phénotype, distribution tissulaire, nature et composition du corps d'inclusion cytoplasmique, médiation d'activité ADCC et NK). Cependant, la rapidité avec laquelle les connaissances concernant les mécanismes d'action des cellules NK humaines et murines se sont accumulées ont fait du cobaye un modèle très peu étudié. Quoique l'activité NK ait déjà été démontrée chez le cobaye (ALTMAN et RAPP, 1978), les cellules responsables de cette activité cytotoxique ainsi que leur mécanisme d'action n'ont jamais été clairement définis. Par conséquent, l'objectif premier de ce travail est de caractériser le mécanisme cytotoxique des cellules Kurloff du cobaye contre des cellules tumorales, par des essais *in vitro*. Plus précisément les étapes d'adhésion à la cellule cible, d'activation des cellules Kurloff et de production de facteurs cytotoxiques seront étudiées.

En deuxième lieu, nous chercherons à établir s'il y a lieu, une corrélation entre les mécanismes cytotoxiques employés par les cellules Kurloff du cobaye et les cellules NK et NC impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire chez l'homme, la souris et le rat.

MATERIEL ET METHODES

2.1 ANIMAUX

Les cobayes femelles Dunkin-Hartley pesant entre 300 et 400 g ont été obtenus du laboratoire d'élevage Charles River (Charles River Canada Inc., St-Constant, Qué.). Tous les cobayes utilisés ont reçu 3 injections intrapéritonéales de 17- β -estradiol 3 benzoate, (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO) à raison de 1mg/semaine dissout dans 1 ml de solution saline. Une semaine après la dernière injection, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

2.2 PURIFICATION DES CELLULES KURLOFF

La rate de cobaye prétraité aux estrogènes est prélevée et triturée mécaniquement dans du PBS (tampon phosphate salin) composé de KCl (0.2 g/l), Na₂HPO₄ (1.15 g/l), et de KH₂PO₄ (0.2 g/l), dissout dans 1 litre de solution saline 0.9% et supplémenté de 0.5% d'albumine sérique de boeuf (BSA) (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO). La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur filtre de nylon (100 μ M) et centrifugée 10 minutes à 800 X g. Le culot de cellules est soumis à un choc osmotique sur glace pour lyser les érythrocytes par l'ajout de 10 ml de solution de NaCl 0.2% pendant 20 secondes. Le volume est complété à 20 ml avec une solution de NaCl 1.6% et les cellules sont centrifugées 10 minutes à 800 X g.

Les étapes de purification subséquentes sur gradient continu de Percoll (50%) sont effectuées telles que décrites par MAGHNI et coll. (1991). Brièvement, la dilution appropriée de Percoll est préparée en mélangeant une solution cocktail (0.9 g de NaCl, 1 ml de PBS 100X, 9.0 ml d'eau distillée) avec une solution commerciale de Percoll (Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfé, Qué.) (1.13:13.87). Cette solution stock (10 ml) est mélangée à 10 ml de PBS supplémenté de 0.5% de BSA et centrifugée à 20 000 X g pendant 15 minutes à 4 °C pour former le gradient continu. La suspension cellulaire (80-90 X 10⁶ cellules/ 10 ml) est déposée sur le gradient et centrifugée à 360 X g pendant 30 minutes à 20 °C.

Les cellules Kurloff (>95%) sont prélevées du culot avec une pipette et lavées une fois dans 50 ml de PBS supplémenté de 0.5% de BSA et une fois dans 30 ml de PBS sans BSA pour éliminer le Percoll, et sont resuspendues à 2.5 X 10⁶/ml dans un milieu RPMI 1640 (Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.) contenant 2.0 g/l de NaHCO₃, 80 U/ml de pénicilline-G (Glaxo Lab., Montréal, Qué.), 100 µg/ml de streptomycine (Glaxo Lab., Montréal, Qué.) et supplémenté de 10% v/v de sérum de veau foetal (FBS) (Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.). Ce milieu de culture sera par la suite appelé milieu standard. La viabilité des cellules était toujours supérieure à 95% tel qu'observé par exclusion du bleu de Trypan.

2.3 CELLULES CIBLES TUMORALES

Les cellules cibles utilisées pour les essais de cytotoxicité *in vitro* sont les suivantes: La lignée cellulaire K 562 (sensible à l'activité NK) dérivée de leucémie myéloblastique humaine, la lignée murine YAC-1 (sensible à l'activité NK) dérivée d'un lymphome induit par le virus Maloney chez des souris A/Sn, la lignée P 815 (résistante à l'activité NK) dérivée d'un mastocytome de souris DBA/2 et la lignée cellulaire WEHI 164 (sensible au TNF) dérivée d'un fibrosarcome induit par le 3-méthylcholanthrène. Ces lignées cellulaires sont des cellules non-adhérentes cultivées dans des flacons de 25 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) dans le milieu standard à 37 °C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂, et sont diluées 1:10 2 à 3 fois par semaine.

2.4 MARQUAGE DES CELLULES CIBLES

Les cellules cibles en phase exponentielle de croissance sont resuspendues dans 1 ml de milieu RPMI 1640 et incubées pendant 1 à 2 heures à 37 °C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂, en présence de 200 µCi de Na⁵¹CrO₄ (Amersham, Cambridge, MA). Les cellules marquées sont lavées 3 fois dans 10 ml de PBS et ajustées à une concentration de 5X10⁴ cellules/ml dans le milieu standard juste avant l'essai de cytotoxicité.

2.5 ESSAI DE CYTOTOXICITE

L'activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules tumorales est mesurée par essai de relâchement de ^{51}Cr tel que décrit par DEBOUT et coll. (1984). Les cellules Kurloff préstimulées ou non selon le cas, sont distribuées en triplicata (100 μl /puit) dans des microplaques de 96 puits à fonds plats (Costar, Cambridge, MA). Cent microlitres de cellules cibles (5×10^3 /puit) sont ensuite ajoutés et chaque puit est complété à 300 μl par l'ajout de 100 μl de milieu standard seul ou contenant des agents modulateurs. Les ratios finaux cellules effectrices:cellules cibles utilisés pour les essais de cytotoxicité sont de 50:1, 25:1, 12.5:1 et 6.25:1. Les microplaques sont ensuite centrifugées 5 minutes à 150 X g et incubées 4 ou 18 heures à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 . Après l'incubation, 150 μl de surnageant sont recueillis et la radioactivité provenant du ^{51}Cr relâché par les cellules cibles mortes est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Beckman Gamma 5500). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{RE} - \text{RS}}{\text{RT} - \text{RS}} \times 100$$

où RE représente le relâchement de ^{51}Cr (en cpm) par les cellules cibles en présence de cellules effectrices; RS représente le relâchement spontané de ^{51}Cr par les cellules cibles incubées en absence de cellules effectrices et RT, représente les

cpm totaux, mesurés sur 100 μ l de cellules cibles marquées (variant entre 1 500 et 3 000 selon les cellules cibles utilisées). Les valeurs de RS étaient approximativement de 15 à 20% de RT et n'étaient pas affectées par les agents modulateurs utilisés.

2.5.1 Effet des lectines ConA et PHA

Les solutions stocks de concanavaline A (ConA) (Calbiochem Co., San Diego, CA) et de phytohémagglutinine P (PHA) (Difco Lab., Détroit, MI) sont préparées à 10 mg/ml et 1 mg/ml respectivement dans un milieu RPMI 1640 et diluées dans le milieu standard pour les essais de cytotoxicité. Ces lectines mitogéniques sont utilisées directement durant l'essai de cytotoxicité ou en prétraitement (2 heures à 37°C) des cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) suivi de 2 lavages dans du PBS à des concentrations finales de 10, 5 et 1 μ g/ml pour la ConA et de 100, 10 et 5 μ g/ml pour la PHA.

2.5.2 Effet du calcium et du magnésium

L'importance des ions Ca^{++} et Mg^{++} dans l'activité cytotoxique des cellules Kurloff est déterminée en utilisant les agents chélateurs EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) et EGTA (acide éthylène glycol-bis-(β -aminoéthyl éther N,N,N',N'-tétraacétique) (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). Les solutions

stocks sont préparées dans le milieu standard à 6.0 mM et sont diluées dans les microplaques à des concentrations variant de 0 à 6 mM dans un volume de 100 μ l. Les concentrations finales varient de 0 à 2 mM après l'ajout de 100 μ l de cellules effectrices (2.5×10^6 /ml) et 100 μ l de cellules cibles (5×10^4 /ml). Les valeurs de RS sont mesurées sur les cellules cibles en présence de concentrations équivalentes d'EDTA et d'EGTA à celles des échantillons RE.

Des essais de cytotoxicité sont aussi effectués dans un milieu exempt de calcium et de magnésium auquel diverses concentrations de CaCl_2 et de MgCl_2 sont ajoutées. Pour ces essais, les cellules effectrices (2.5×10^6 /ml) et cibles (5×10^4 /ml) sont resuspendues dans un milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.) contenant 0.35 g/l de NaHCO_3 , 80 U/ml de pénicilline-G (Glaxo Lab., Montréal, Qué.) et 100 μ g/ml de streptomycine (Glaxo Lab., Montréal, Qué.) et les solutions de CaCl_2 et de MgCl_2 sont préparées dans le même milieu à des concentrations finales variant de 0 à 10 mM.

2.5.3 Effet du TPA et de l'ionomycine

Les solutions stocks de TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) et d'ionomycine (Calbiochem Co. San Diego, CA) sont préparées dans du diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (Fisher Scientific Fairlawn, NJ)

à des concentrations de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 200 μM respectivement et diluée dans le milieu standard juste avant les essais de cytotoxicité. Ces produits sont ajoutés directement dans les microplaques (100 $\mu\text{l}/\text{puit}$) à des concentrations finales de 10 ng/ml (TPA) et 1.0 μM (ionomycine). Les valeurs de RS sont mesurées sur les cellules cibles en présence de concentrations équivalentes de TPA et d'ionomycine à celles des échantillons RE.

2.5.4 Effet des inhibiteurs de protéine kinases H-7 et HA 1004

L'inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) H-7 (1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-méthylpipérazine) est obtenu de la compagnie Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO) et dissout (10 mM) dans l'eau stérile. L'inhibiteur des protéines kinases dépendantes des nucléotides cycliques HA 1004 (hydrochlorure de 1-N-(2-guanidinoéthyl-5-isoquinolinesulfonamide) est obtenu de la compagnie Seikagaru Kogyo Co. Ltd (Ninongashi-honco, Chuo-Ku, Tokyo) et dissout (10 mM) dans le DMSO. Cinq microlitres de ces inhibiteurs sont ajoutés à 1 ml de cellules Kurloff ($2.5 \times 10^6 / \text{ml}$) (concentrations finales de 50 μM). Les cellules sont prétraitées 45 minutes à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 , avec agitation et sont utilisées directement, sans lavage, pour les essais de cytotoxicité en présence ou absence de concentrations variables de TPA. L'effet de ces inhibiteurs sur le relâchement spontané

de ^{51}Cr par les cellules cibles est déterminé en ajoutant 100 μl de H-7 ou HA 1004 (50 μM) dans les triplicata de cellules cibles incubées en absence de cellules Kurloff et en présence de concentrations de TPA équivalentes à celles des échantillons RE.

2.5.5 Effet des bloqueurs de canaux calciques vérapamil et diltiazem

Les solutions stocks (100 mM) de vérapamil et de diltiazem (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) sont préparées dans du DMSO et diluées dans le milieu standard avant chaque essai. Ces produits sont utilisés en prétraitement de 45 minutes à 37 °C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 , avec agitation à des concentrations variant de 0 à 1×10^{-4} M. Les cellules prétraitées (2.5×10^6 /ml) sont utilisées directement sans lavage pour les essais de cytotoxicité. Les valeurs de RS des cellules cibles sont mesurées en présence de concentrations de bloqueurs équivalentes à celles des échantillons RE.

2.5.6 Effet de l'ionophore carboxilique monensin

Le monensin (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) est dissout à une concentration de 10 mg/ml dans l'éthanol 100% et dilué dans du milieu standard avant chaque essai. Les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) sont prétraitées 60 minutes avec agitation à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 avec

des concentrations de monensin variant de 0 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Après l'incubation, les cellules Kurloff sont lavées 2 fois dans 10 ml de PBS et réajustées à une concentration de $2.5 \times 10^6 / \text{ml}$ dans du milieu standard avant l'essai de cytotoxicité.

2.6 FORMATION DE CONJUGUES EFFECTEUR:CIBLE

La méthode utilisée pour les essais de formation de conjugués est une modification de celle décrite par HENKART et coll. (1986). Cent microlitres de cellules Kurloff ($1.25 \times 10^6 / \text{ml}$) sont mis en présence de 100 μl de cellules cibles ($2.0 \times 10^6 / \text{ml}$) dans des tubes de 5 ml en polystyrène (Falcon, Beckman Dickinson, Oxnard, CA). Cent microlitres de milieu standard contenant différents agents à étudier sont ajoutés aux cellules et les tubes sont incubés 10 minutes à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 . Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à $600 \times \text{g}$ et le culot de cellules est resuspendu doucement avec une pipette Pasteur. Un compte cellulaire est effectué sur un hématimètre et le pourcentage de conjugués est évalué en comptant au moins 200 cellules Kurloff selon la formule suivante:

$$\% \text{ conjugués} = \frac{\text{Nombre de conjugués}}{\text{Nombre total de cellules Kurloff}} \times 100$$

2.6.1 Effet des lectines ConA et PHA

Les lectines ConA et PHA sont dissoutes dans le milieu standard à 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Cent microlitres sont ajoutés aux cellules Kurloff (100 μl) et aux cellules cibles (100 μl) pour obtenir des concentrations finales de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ConA) et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PHA).

2.6.2 Effet des agents chélateurs EDTA et EGTA

La concentration d'EDTA et d'EGTA est ajustée à 3.0 mM dans du milieu standard et 100 μl sont ajoutés aux cellules effectrices (100 μl) et cibles (100 μl) pour obtenir une concentration finale de 1.0 mM. Pour ces essais, les cellules sont centrifugées avant l'incubation pour permettre la formation d'un plus grand nombre de conjugués.

2.7 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES CONJUGUES EFFECTEUR:CIBLE

2.7.1 Microscopie électronique à transmission (MET)

La procédure de préparation des échantillons de conjugués effecteur:cible pour la MET est basée sur la méthode décrite par PELÉ et coll. (1989). Suite à la

préparation des conjugués, la suspension cellulaire (3×10^6 cellules) totales est fixée deux fois dans 10 ml de milieu standard contenant 5% de glutaraldéhyde pendant 20 minutes et 60 minutes respectivement. Les cellules sont lavées 2 fois dans du tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4 (BDH Ltd, Poole, Angleterre) à 4°C et fixées dans le même tampon contenant 1% de tétraoxyde d'osmium. Les cellules sont ensuite centrifugées 10 minutes à 800 X g et fixées à nouveau pendant 60 minutes à 4°C dans la même solution. Après la fixation, les cellules sont lavées 2 fois dans une solution d'acétate de sodium 2% pH 6.3 à 25°C et incubées pour la nuit à 4°C dans une solution d'acétate de sodium contenant 25% d'acétate d'uranyle. Le jour suivant, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 800 X g et le culot est solidifié par l'ajout de 2 gouttes de solution d'agarose (40 mg/ml). Les cellules sont ensuite déshydratées successivement dans l'acétone 30, 50, 70 et 90% (5 minutes/solution à 4°C) suivi de 2 déshydratations dans l'acétone 100% et 2 déshydratations dans l'oxyde de propylène 100% pendant 10 minutes. Après les étapes de déshydratation, le culot de cellules est placé dans une solution épon:oxyde de propylène (1:1) pendant 1 heure à 25°C puis pour la nuit à 25°C dans une solution épon:oxyde de propylène (4:1). Le jour suivant, le culot est rincé 2 fois pendant 1 heure dans l'épon pure (résine JEMBED 812) et immergé 48 heures à 60°C. Des coupes de 800 Å sont effectuées avec un microtome, colorées avec une solution de citrate de plomb (6%) pH 10 et observées sur un microscope

électronique Philips modèle EM 300, sous une tension d'accélération de 10 à 20 KV.

2.7.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La préparation des échantillons de conjugués effecteur:cible pour la MEB est effectuée selon la méthode de BOYDE et coll. (1972). Brièvement, les étapes de fixation à la glutaraldéhyde et à l'oxide d'osmium sont effectuées de la même façon qu'en MET. Après la fixation, les cellules sont lavées 3 fois dans un tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4 et déposées ($1 \times 10^5/0.2$ ml) sur des lamelles de verre (12 mm) prétraitées pendant 1 heure avec une solution (0.01% dans l'eau distillée) de poly-L-lysine 50 000 daltons (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). L'étape d'adhésion des cellules aux lamelles est effectuée pendant 14 heures dans une chambre humidifiée pour éviter la déshydratation des cellules. Les lamelles sont ensuite lavées 2 fois dans de l'eau bidistillée et 1 fois dans du tampon cocodylate 0.1 M pH 7.4. Les cellules sont par la suite déshydratées successivement dans 30, 50, 70, 90 et 100% d'éthanol (5 minutes/étape) et séchées par la méthode de séchage par point critique en présence de CO₂ (Ladd critical point dryer). Les lamelles sont placées sur des porte-échantillons et métallisées avec de l'or déposé par la méthode de pulvérisation en couche (Edwards sputter coater, modèle S 150B). Le dépôt d'or est d'environ 200 Å d'épaisseur. Les échantillons sont

finale^{ment} examinés sur microscope électronique à balayage (Cambridge Sterioscan 120) sous une tension d'accélération de 10 à 20 KV.

2.8 PRODUCTION DE SURNAGEANT ACTIFS DE CELLULES KURLOFF

La production de surnageants actifs permet de déterminer la capacité des cellules Kurloff de libérer des facteurs cytotoxiques solubles en réponse à divers stimuli. Pour produire ces surnageants, les cellules Kurloff sont resuspendues à 2.5×10^6 /ml de milieu standard dans des tubes de polystyrène. Les cellules sont ensuite incubées 24 heures à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ en présence ou absence de divers stimuli. A la fin de la période d'incubation, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 800 X g et les surnageants sont recueillis avec une pipette et congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour les essais de cytotoxicité contre les cellules tumorales cibles, et le dosage de TNF.

Les stimuli utilisés sont les cellules cibles Wehi 164 ou le TPA et l'ionomycine. Les cellules cibles sont préalablement ajustées à 10×10^6 /ml de milieu standard et 20 µl sont ajoutés à 2.0 ml de cellules Kurloff pour obtenir un ratio final cellules Kurloff: cellules cibles de 50:1. Le TPA et l'ionomycine sont préparés dans du milieu standard tel que décrit à la section 2.5.3 et sont utilisés à des concentrations finales de 10 ng/ml et 1 µM respectivement.

2.9 METHODE DE DOSAGE DU TNF

La quantité de TNF contenue dans les surnageants de cellules Kurloff est déterminée par bioessai basé sur la sensibilité de la lignée cellulaire L-929 à l'effet cytotoxique du TNF (FLICK et GIFFORD, 1984). Ces cellules sont des fibroblastes dérivés d'un fibrosarcome de souris C3H/HeN. Elles sont cultivées dans des flacons de 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) dans un milieu MEM (Minimal Essential Medium, Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.) contenant 2.2 g/l de NaCO₃ et 80 µg/ml de gentamicine (Schering Canada Inc., Pointe-Claire, Qué.) et est supplémenté de 10% (v/v) de sérum de cheval (HS) (Gibco).

Lorsque les cellules ont atteint la confluence, elles sont détachées avec 5 ml de solution versène (EDTA disodique 5X10⁻⁴ M) contenant 0.05% de trypsine (Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.). Les cellules sont ensuite centrifugées 10 minutes à 800 X g et le culot est resuspendu à 5 X 10⁵ /ml de milieu MEM 10% HS. Les cellules sont déposées dans des microplaques de 96 puits à fond plats (100 µl/puit) et incubées 24 heures à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂, pour permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. Le milieu est alors décanté et remplacé par 100 µl de dilutions sériées (facteur 2) de surnageants de cellules Kurloff, en duplicata. Le volume de chaque puit est complété à 200 µl en ajoutant 0.1 ml de milieu MEM 10% HS contenant 5 µg/ml

d'actinomycine D (Merck Frosst Canada Inc., Kirkland, Qué.). Cet inhibiteur permet d'augmenter la sensibilité de l'essai en bloquant la synthèse de protéines nécessaires à la résistance des cellules au TNF. Les cellules sont incubées 20 à 37°C heures, les surnageants sont décantés, et les cellules sont colorées 5 à 10 minutes avec 50 μ l de solution de crystal violet 0.05% (1:4, méthanol:eau v/v). Les plaques sont ensuite rincées doucement à l'eau courante et l'absorbance est lue à 595 nm avec un spectrophotomètre de type ELISA (Biorad 3550 microplate reader).

Les résultats sont exprimés en unités de TNF/ml et sont calculés sur un logiciel PROBIT (Sette et coll., 1986) par comparaison avec une courbe standard de TNF recombinant humain (Endogen Inc., Boston, MA). Une unité de TNF correspond à l'inverse de la dilution requise pour lyser 50% des cellules L-929.

2.10 ESSAI DE CYTOTOXICITE DES SURNAGEANTS ACTIFS DE CELLULES KURLOFF

2.10.1 Essai de cytotoxicité des surnageants fractionnés

Pour ces essais de cytotoxicité, les échantillons de surnageants actifs de cellules Kurloff sont préalablement fractionnés par filtration sur des filtres centricon (Amicon Canada Ltd., Oakville, Ont.) permettant de concentrer les

molécules de poids moléculaire supérieurs à 3Kd (centricon-3), à 10 Kd (centricon-10), ou à 30 Kd (centricon-30) selon la taille des pores de chacun des filtres. La procédure de fractionnement se décrit comme suit. Les surnageants stock (2 ml) sont d'abord concentrés sur des filtres centricon-3 par centrifugation à 5000 X g pendant 50 minutes à 20°C dans un rotor fixe de 33° (IEC International, Needham, MA). Les surnageants concentrés sont ensuite regroupés et filtrés à nouveau sur des filtres centricon-10 à 3 000 X g pendant 12 minutes à 20°C ou sur des filtres centicon-30 à 1000 X g pendant 7 minutes a 20°C. Les facteurs de concentration obtenus par cette procédure sont approximativement de 4X pour les filtres centricon-3 et de 2X pour les filtres centricon-10 et centricon-30. L'activité cytotoxique des concentrés et filtrats de surnageants de cellules Kurloff est mesurée en triplicata en incubant 100 μ l de surnageant et 100 μ l de cellules cibles (5×10^4 / ml de milieu standard) dans des microplaques de 96 puits à fonds plats pendant 18 heures à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. A la fin de la période d'incubation, les microplaques sont centrifugées 5 minutes à 150 X g et 100 μ l de surnageant sont prélevés. La quantité de ⁵¹Cr relâchée par les cellules cibles est mesurée à l'aide d'un compteur gamma et le pourcentage de cytotoxicité est calculé en utilisant la formule décrite à la section 2.5.

2.10.2 Neutralisation des surnageants par des anticorps anti-TNF.

Les surnageants actifs de cellules Kurloff concentrés sur des filtres centricon-3 sont distribués en triplicata de 100 μ l dans des microplaques de 96 puits à fonds plats. Ces surnageants sont dilués en série (facteur 2) dans du milieu standard et prétraités 30 minutes à 20°C avec 200 ou 600 unités neutralisantes (UN) d'anticorps anti-TNF $_{\alpha}$ murin (lapin anti-souris, IP 400, Genzyme Corp., Markham, Ont.). Le volume de chaque puit est complété à 200 μ l par l'ajout de 100 μ l de cellules cibles marquées au ^{51}Cr , (5×10^4 /ml de milieu standard). Les microplaques sont ensuite incubées 18 heures à 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO $_2$, et sont centrifugées 5 minutes à 150 X g. Cent microlitres de surnageant sont prélevés et la radioactivité est mesurée dans un compteur gamma. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé en utilisant la formule décrite à la section 2.5.

2.11 METHODE DE DOSAGE DES SERINE ESTERASES

Pour cet essai, les surnageants actifs de cellules Kurloff sont produits de la façon suivante. Les cellules Kurloff (1.25×10^6 /ml) sont distribuées en triplicata dans des microplaques de 96 puits à fonds plats en présence ou absence de TPA (10 ng/ml) et d'ionomycine (1 μ M) dans un volume final de 200 μ l de milieu standard. Les microplaques sont incubées 4 heures à 37°C sous une atmosphère

humidifiée contenant 5% de CO₂ et sont centrifugées 10 minutes à 150 X g. Vingt microlitres de surnageant sont ensuite prélevés pour effectuer le dosage de sérine estérases.

Le dosage colorimétrique des sérine estérases (OSTERGAARD et CLARCK, 1989) s'effectue comme suit. Vingt microlitres de surnageants de cellules Kurloff sont distribués dans des microplaques de 96 puits à fonds plats en triplicata. Cent quatre vingts microlitres de solution BLT sont ensuite ajoutés. Cette solution est composée de 0.2 mM de BLT (N_α-CBZ-L-lysine thyobenzyl ester (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) et de 0.11 mM de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2 nitrobenzoïque) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solubilisés dans du PBS. Les microplaques sont incubées 30 minutes à 20°C et la densité optique est mesurée à 412 nm dans un spectrophotomètre de type ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de relâchement spécifique de sérine estérases et sont calculés en utilisant la formule suivante;

$$\% \text{ de relâchement spécifique} = \frac{S - N}{T} \times 100$$

où S = densité optique (D.O) des surnageants de cellules Kurloff stimulées, N = D.O. des surnageants de cellules Kurloff non stimulées et T = D.O. du relâchement total de sérine estérases déterminé ou solubilisant 100 μl de cellules Kurloff dans 0.1% de Nonidet P-40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La valeur de D.O.

obtenu sur les échantillons de milieu standard seul sont soustraites de toutes les valeurs S, N et T.

2.12 ANALYSES STATISTIQUES

La significativité des différences entre les résultats a été déterminée par le test T de Student pour données pairées et par analyse de variance (test Fisher PLSD) pour comparaisons multiples. Les valeurs dont le coefficient de probabilité est de $p < 0.05$ sont considérées comme significatives. Pour les résultats, les valeurs de $p < 0.05$ et $p < 0.01$ sont marquées d'un ou de deux astérisques respectivement.

RESULTATS

3.1 Spécificité lytique des cellules Kurloff

L'activité NK des cellules Kurloff contre les cellules NK-sensibles humaines K562 a déjà été démontrée par DEBOUT et coll. (1984). Dans le but de vérifier si les cellules Kurloff pouvaient aussi exercer une activité de type NK contre des cellules cibles murines, les cellules Kurloff ont été incubées 4 heures en présence de différentes cellules cibles et leur activité cytotoxique a été mesurée par essai de relâchement spécifique de ^{51}Cr . Les résultats présentés à la figure 1 démontrent une sensibilité beaucoup plus grande des cellules NK-sensibles murines YAC-1 à l'activité lytique des cellules Kurloff en comparaison avec la sensibilité des cellules NK-sensibles humaines K562. Par contre, les cellules NK-résistantes murines P815 résistantes à l'activité NK ont démontré une résistance presque complète à la lyse par les cellules Kurloff.

3.2 Effet des lectines sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff

Lorsque la PHA était ajoutée juste avant l'essai de cytotoxicité et présente durant les 4 heures d'incubation (fig.2a), l'activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les 2 cibles murines YAC-1 et P815 était fortement augmentée et ce, proportionnellement à la concentration de PHA utilisée. Par contre, la lyse des cellules cibles humaines K562 n'était pas affectée même à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PHA.

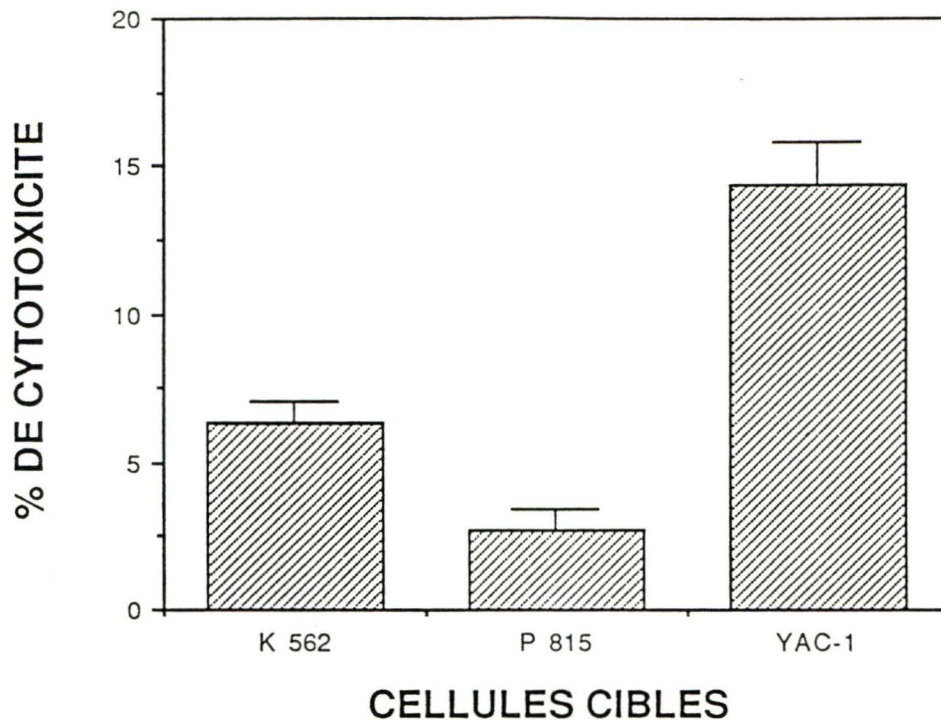


Figure 1: Spécificité lytique des cellules Kurloff. Les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) ont été incubées 4 heures à 37°C en présence de cellules cibles (5×10^4 /ml) et le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr par les cellules cibles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 4 à 6 expériences.

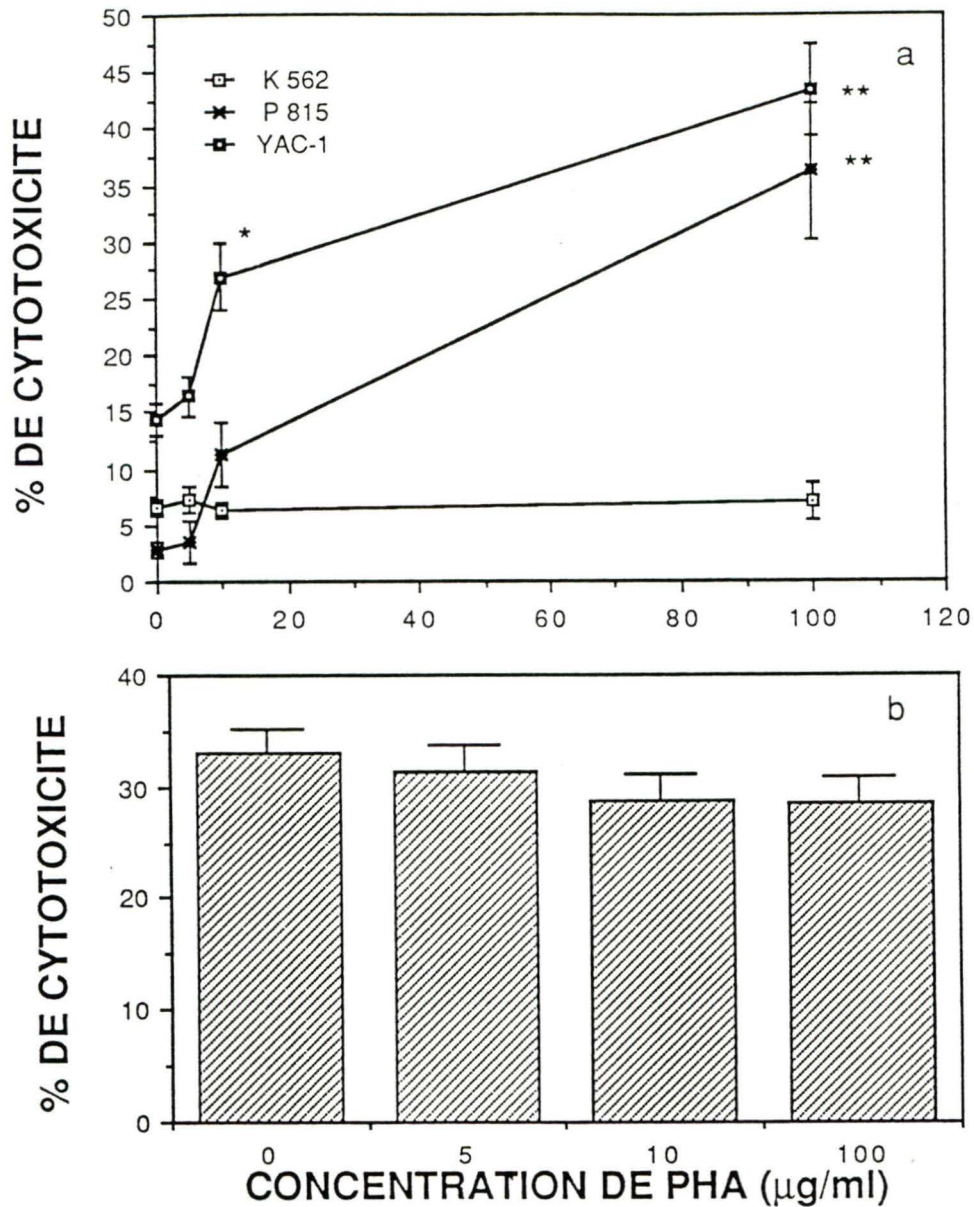


Figure 2: Effet de la PHA sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff. La PHA était présente durant les 4 heures d'incubation (37°C) des cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) et des cellules cibles (5×10^4 /ml) (a) ou utilisée en prétraitement (2 hres) des cellules Kurloff (b). Après le prétraitement avec la PHA, les cellules Kurloff ont été lavées 2 fois dans du PBS avant l'essai de cytotoxicité et la lyse des cellules YAC-1 a été mesurée après 4 heures d'incubation à 37°C. Le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr par les cellules cibles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 6 à 7 expériences.

Aucune augmentation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff n'a cependant été observée contre l'une ou l'autre des cellules cibles lorsque la Con A (1 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) était utilisée dans les mêmes conditions (résultats non présentés).

Afin de déterminer si l'augmentation de l'activité lytique des cellules Kurloff en présence de PHA résultait des propriétés leucoagglutinantes ou mitogéniques de la lectine (NASPITZ et RICHTER, 1968), les cellules Kurloff ont été prétraitées 2 heures en présence de PHA et lavées 2 fois dans du PBS avant l'essai de cytotoxicité. Tel que démontré à la figure 2b, l'effet de la PHA sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff était complètement supprimée par cette procédure.

3.3 Effet des lectines sur la formation de conjugués

Puisqu'aucune réactivation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff n'avait été observée en prétraitement avec la PHA, nous avons étudié l'effet de la PHA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de la Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sur la formation de conjugués effecteur:cible. Les résultats sont présentés au tableau 1. Contrairement à la Con A, une augmentation significative de la formation de conjugués entre les cellules Kurloff et les 2 cellules cibles murines, YAC-1 et P815, a été observée en présence de PHA. La formation de conjugués entre les cellules Kurloff et les

TABLEAU 1 EFFET DES LECTINES SUR LA FORMATION DE
CONJUGUÉS EFFECTEUR : CIBLE

Cellules-cibles	Lectines	% de conjugués
P 815	Contrôle	9.25 ± 2.1
	ConA 5 µg/ml	6.5 ± 1.6
	PHA 100 µg/ml	19.5 ± 2.5**
YAC-1	Contrôle	4.9 ± 2.9
	ConA 5 µg/ml	7.4 ± 2.0
	PHA 100 µg/ml	25.8 ± 2.1

Les cellules effectrices ($1.25 \times 10^5/0.1$ ml) et les cellules-cibles ($2.0 \times 10^5/0.1$ ml) ont été incubées en présence de lectine (0.1 ml) pendant 10 minutes, à 37°C, ensuite centrifugées et le culot de cellules a été resuspendu doucement avant le compte cellulaire.

Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type de 4-5 expériences.

** = $p < 0.01$

cellules cibles humaines K562 n'était cependant pas affectée par la présence de PHA ou de Con A (résultats non présentés).

3.4 Caractérisation microscopique des conjugués effecteur:cible

La figure 3a montre une micrographie typique en MET d'un conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1. La taille de la cellule Kurloff apparaît beaucoup plus grande que celle de la cellule YAC-1 et démontre un ratio cytoplasme/noyau élevé. Le cytoplasme est occupé principalement par le corps d'inclusion dense aux électrons entouré de plusieurs figures de myéline. Le réticulum endoplasmique granulaire est abondant et est situé entre le corps d'inclusion cytoplasmique et la région de contact avec la cellule tumorale. Quoique la périphérie de la cellule Kurloff soit généralement lisse, un petit groupe de microvillosités ou projections cytoplasmiques est présent dans la région de contact avec la cellule YAC-1. A la figure 3b, on peut observer que l'interaction physique entre les 2 cellules est assurée par des contacts ponctuels entre les projections cytoplasmiques de la cellule Kurloff et les microvillosités de la cellule YAC-1.

La micrographie de conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1 en MEB (figure 4) montre clairement les morphologies respectives de la cellule Kurloff et de la cellule YAC-1. Tandis que la cellule YAC-1 est caractérisée par une forme ronde possédant des microvilli uniformément distribués en surface de la cellule, la forme de la cellule Kurloff paraît plus asymétrique présentant plusieurs

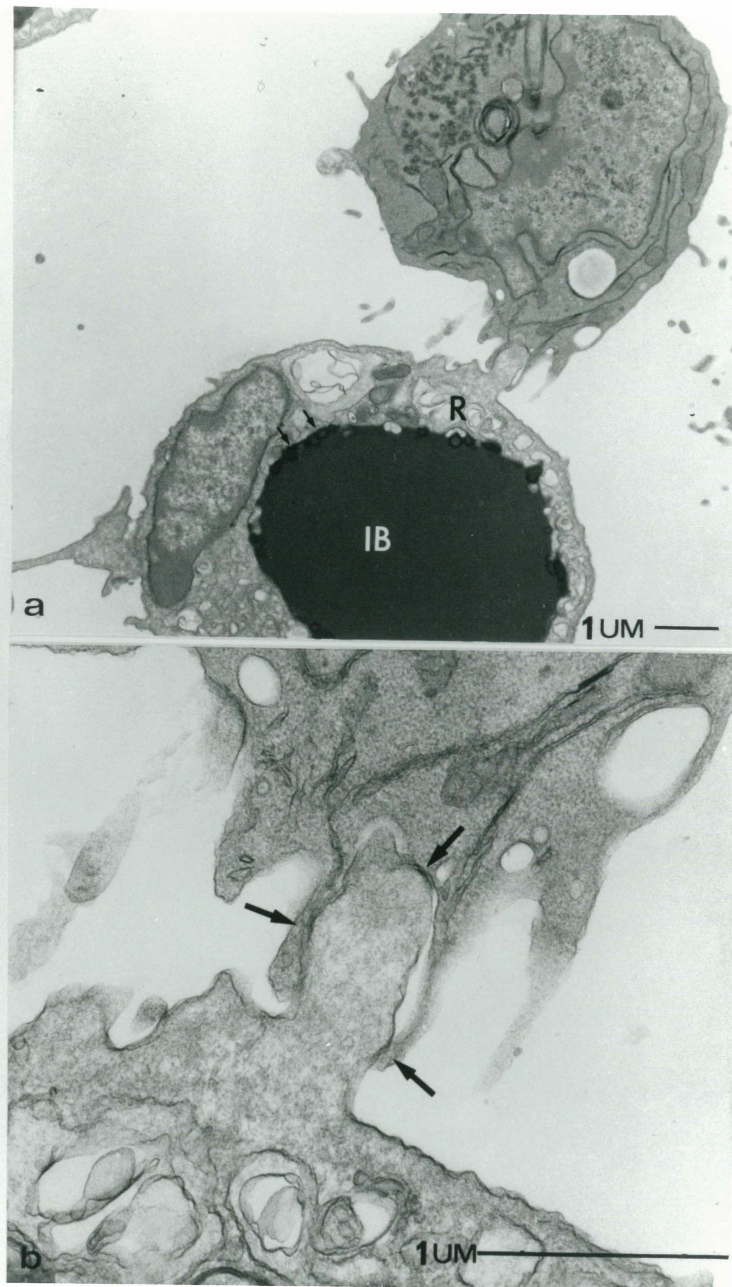


Figure 3: Conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1 en microscopie électronique à transmission. (a): Le grand corps d'inclusion cytoplasmique dense aux électrons (IB), caractéristique des cellules Kurloff, de nombreuses figures de myéline (flèche) et une abondance de réticulum endoplasmique granulaire (R) peuvent être observés sur cette micrographie. (b): L'agrandissement de la région de contact entre la cellule Kurloff et la cellule YAC-1 montre que l'adhésion est assurée par des points de contact entre les membranes des 2 cellules (flèches).

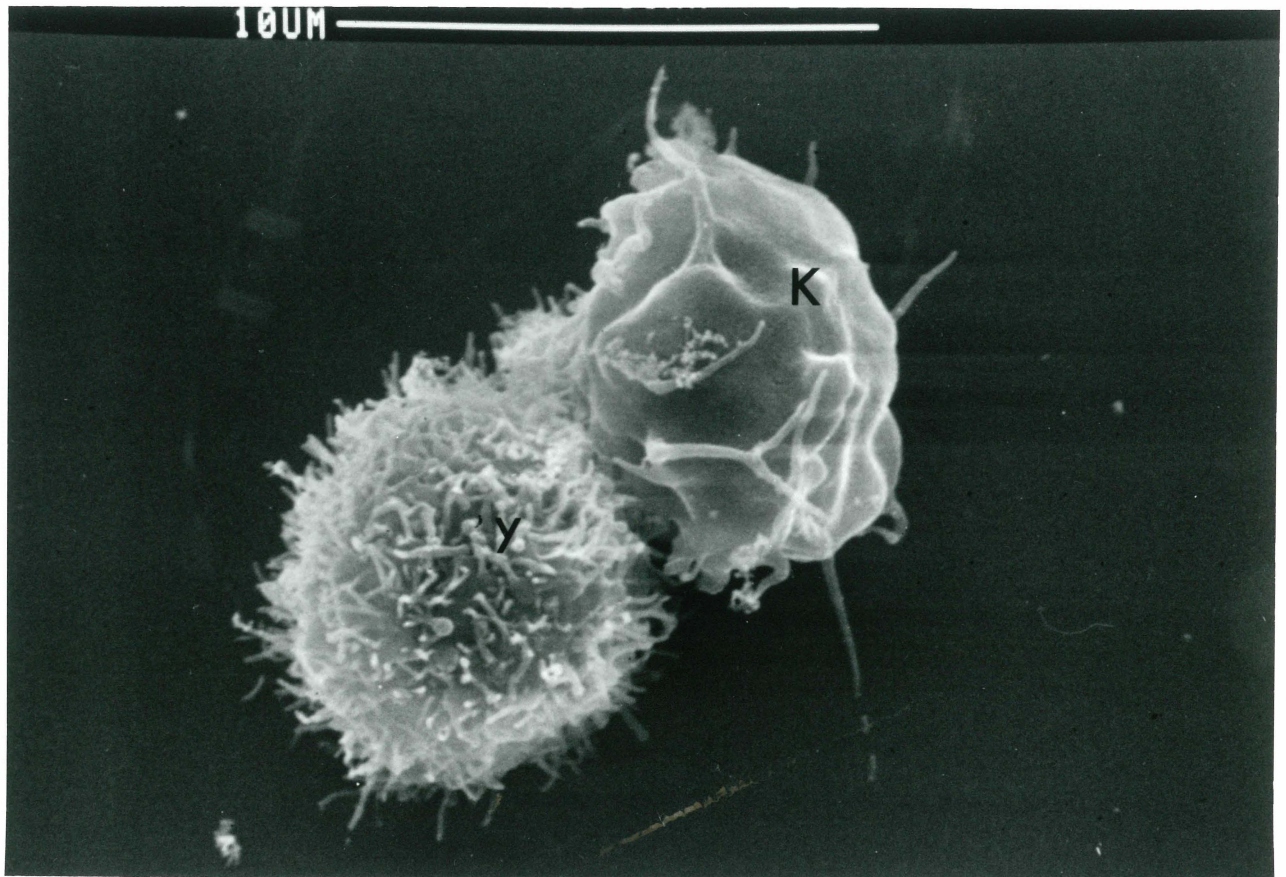


Figure 4: Conjugué cellule Kurloff:cellule YAC-1 en microscopie électronique à balayage. La cellule YAC-1 (Y) se distingue de la cellule Kurloff (K) par sa forme typique circulaire possédant des microvilli distribués uniformément à la surface de la cellule. La cellule Kurloff possède une surface plus lisse avec des groupes de microvillosités distribués également à la surface. Ceux-ci sont observées dans la région de contact avec la cellule YAC-1.

irrégularités de la membrane cytoplasmique et des groupes de microvilli dispersés en surface de la cellule. Certains de ces microvilli sont localisés dans la région de contact avec la cellule YAC-1.

3.5 Effet des cations sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff

L'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des cellules NK contre les cellules tumorales est fortement influencée par la présence de cations. Tandis que le Mg^{++} est impliqué dans l'adhésion de la cellule effectrice à la cellule cible (PLAUT et coll., 1976; GATELY et MARTZ, 1979; HISERODT et coll., 1982; QUAN et coll., 1982), il a été démontré que la présence de Ca^{++} est essentielle à l'activation et à la programmation de la lyse des cellules cibles par les cellules effectrices (PLAUT et coll., 1976; RODER et coll., 1978; GATELY et MARTZ, 1979; HISERODT et coll., 1982; QUAN et coll., 1982, NG et coll., 1987).

Lorsque l'EDTA ou l'EGTA ont été utilisés pour dépléter le Ca^{++} et le Mg^{++} ou le Ca^{++} seul, respectivement, la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff était complètement inhibée par des concentrations supérieures à 2.0 mM d'EDTA ou 1.0 mM d'EGTA (figure 5). De façon similaire, lorsque les essais de cytotoxicité étaient effectués dans un milieu exempt de Ca^{++} et de Mg^{++} (milieu HBSS), les cellules Kurloff étaient incapables de lyser les cellules YAC-1 (figure 6). Toutefois, l'ajout de $CaCl_2$ à une concentration de 1.0 mM était suffisant pour

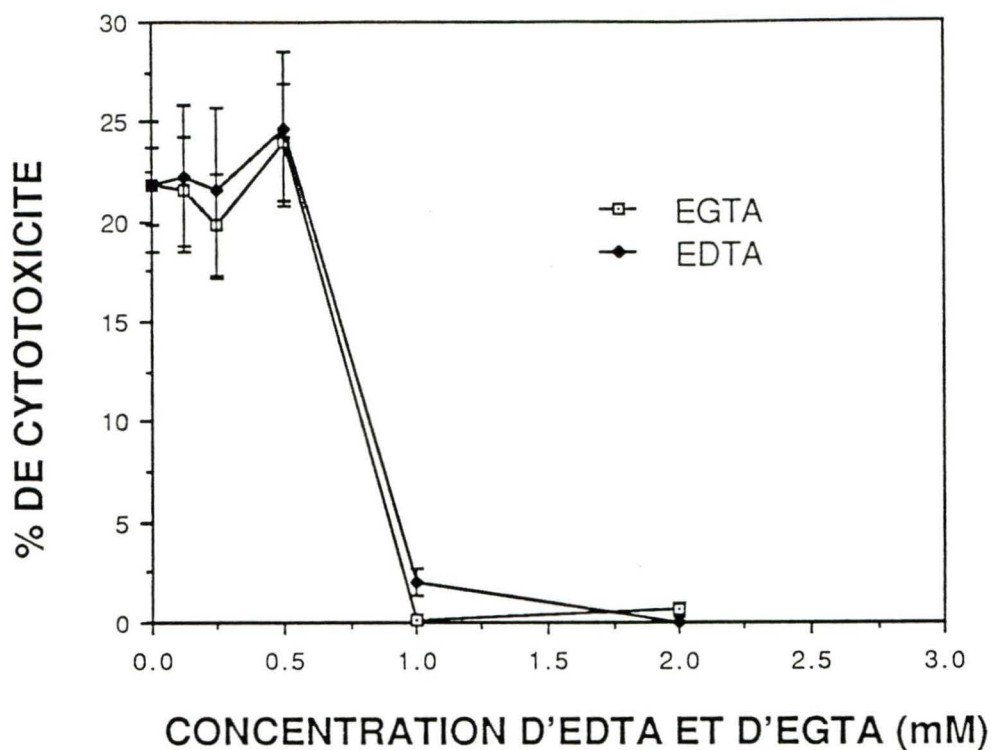


Figure 5: Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par l'EDTA et l'EGTA. La lyse des cellules YAC-1 (5×10^4 /ml) par les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C dans du milieu standard supplémenté de 0 à 10 mM d'EDTA ou d'EGTA. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 6 expériences.

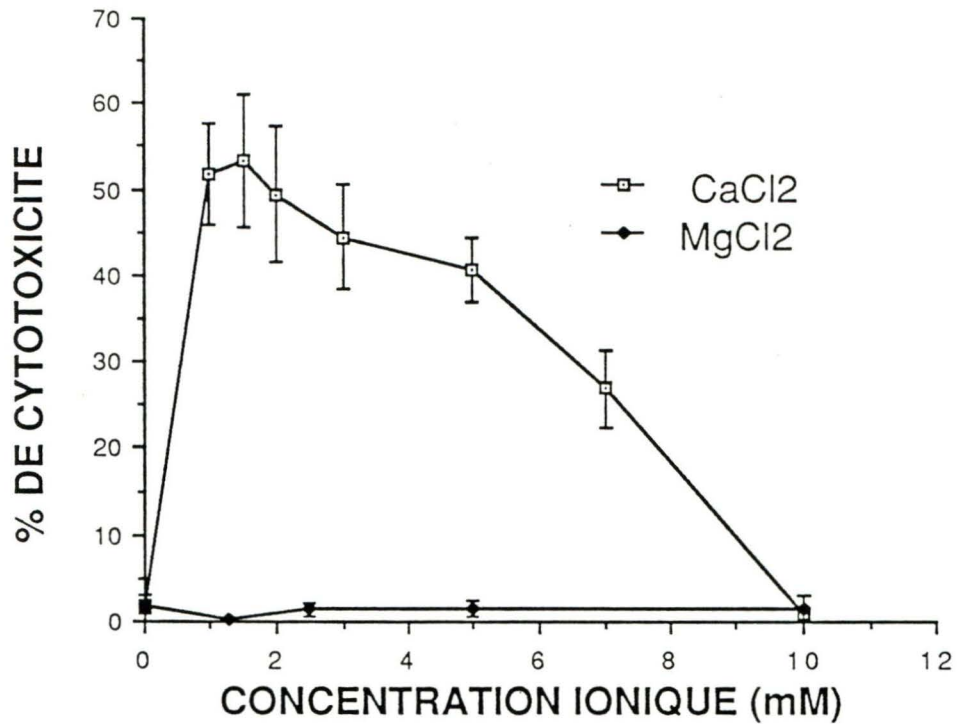


Figure 6: Effet du Ca^{++} et du Mg^{++} sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff. La lyse des cellules YAC-1 ($5 \times 10^4/\text{ml}$) par les cellules Kurloff ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C dans un milieu HBSS supplémenté de concentrations variables de CaCl_2 ou de MgCl_2 . Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences.

rétablir le potentiel lytique des cellules Kurloff. Contrairement à ce qui était observé en présence de CaCl_2 , aucune lyse des cellules YAC-1 n'a pu être constatée en présence de 1.0 à 10.0 mM de MgCl_2 .

Afin de déterminer si l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff observée dans l'expérience précédente pouvait être attribuable à une diminution de la formation de conjugués avec les cellules YAC-1, des essais de formation de conjugués ont été effectués en présence d'EDTA ou d'EGTA. Tel que démontré au tableau 2, le nombre de conjugués cellule Kurloff:cellule YAC-1 formés était significativement réduit en présence de l'un ou l'autre de ces agents chélateurs.

3.6 Effet du TPA et de l'ionomycine sur l'activité NK des cellules Kurloff

Pour mieux caractériser le mécanisme d'action des cellules Kurloff, nous avons effectué des essais de cytotoxicité en présence de l'ionophore de Ca^{++} , ionomycine (LIU et HARMANN, 1978) et de l'activateur de PKC, TPA (CASTAGNA et coll., 1982). Les résultats présentés à la figure 7 démontrent que la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff était considérablement accrue en présence de TPA (10 ng/ml) quoique cette concentration n'était pas toxique pour les cellules YAC-1 tel qu'observé sur le relâchement spontané de ^{51}Cr . Lorsque l'ionomycine (1 μM) était utilisé seul comme stimulus, aucune

**TABLEAU 2 EFFET DE L'EDTA ET DE L'EGTA SUR LA FORMATION DE
CONJUGUÉS EFFECTEUR-CIBLE**

<u>MILIEU</u>	<u>% DE CONJUGUÉS KURLOFF:YAC-1</u>
Contrôle	20 ± 1.4
EDTA (1 mM)	8.8 ± 0.6**
EGTA (1 mM)	9.6 ± 0.7**

Les cellules effectrices ($1.25 \times 10^5/0.1$ ml) et les cellules YAC-1 ($2.0 \times 10^5/0.1$ ml) ont été mises en présence d'EDTA ou d'EGTA (0.1 ml) puis centrifugées et incubées 10 minutes à 37°C. Après l'incubation, les cellules ont été resuspendues doucement et comptées.

Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type de 5 expériences.

** = $p < 0.01$

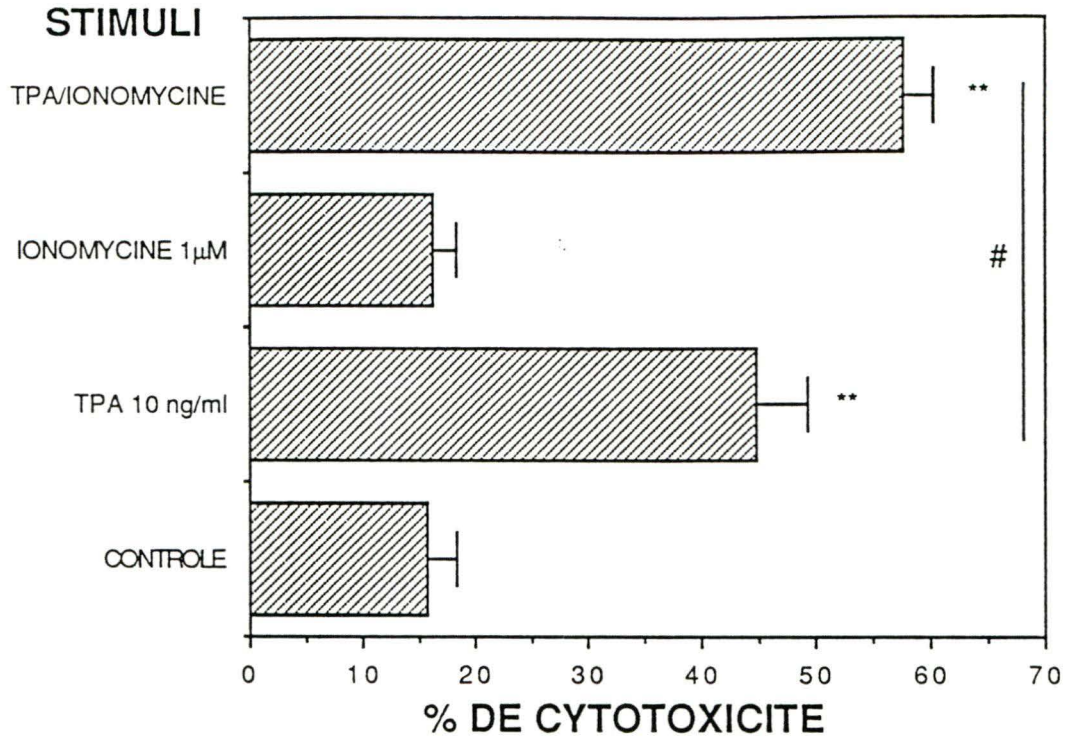


Figure 7: Effet du TPA et de l'ionomycine sur l'activité NK des cellules Kurloff. La lyse des cellules YAC-1 (5×10^4 /ml) par les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) a été déterminée par de mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C en présence ou absence de TPA (10 ng/ml) et/ou d'ionomycine (1 μ). Le TPA et l'ionomycine étaient ajoutés directement dans les microplaques et étaient présents durant toute la période d'incubation. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences. (#) signifie que les pourcentages de cytotoxicité obtenus par stimulation avec le TPA et le TPA + l'ionomycine sont significativement différents ($p < 0.01$).

augmentation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff n'a été observée. Cependant, lorsque les 2 stimuli étaient présents ensemble durant l'essai de cytotoxicité, un effet synergique sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules YAC-1 a été noté ($p < 0.01$).

Tel que démontré à la figure 8, l'augmentation de l'activité lytique des cellules Kurloff en présence de TPA était fortement inhibée par le prétraitement des cellules effectrices avec l'inhibiteur de PKC, H-7 (50 μM) et faiblement inhibé par le HA1004 (50 μM), un inhibiteur plus spécifique des protéine kinases dépendantes des nucléotides cycliques (HIDAKA et coll., 1984). Il est intéressant de noter qu'une inhibition de la cytotoxicité était aussi observée en absence de TPA (contrôle) lorsque les cellules Kurloff étaient prétraitées avec le H-7.

3.7 Effet du vérapamil et du diltiazem sur l'activité NK des cellules Kurloff

Selon les résultats des expériences précédentes, il semble que le Ca^{2+} extracellulaire soit essentiel à la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff. Puisqu'il a été rapporté par différents auteurs (NG et coll., 1987; EDWARDS et coll., 1989; MASERA et coll., 1989; RICHARDS et DJEU, 1990) que l'influx de calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule effectrice est une étape importante dans la lyse de cellules tumorales par les cellules NK, nous avons proposé que le même phénomène était impliqué chez les cellules Kurloff. Les cellules Kurloff ont

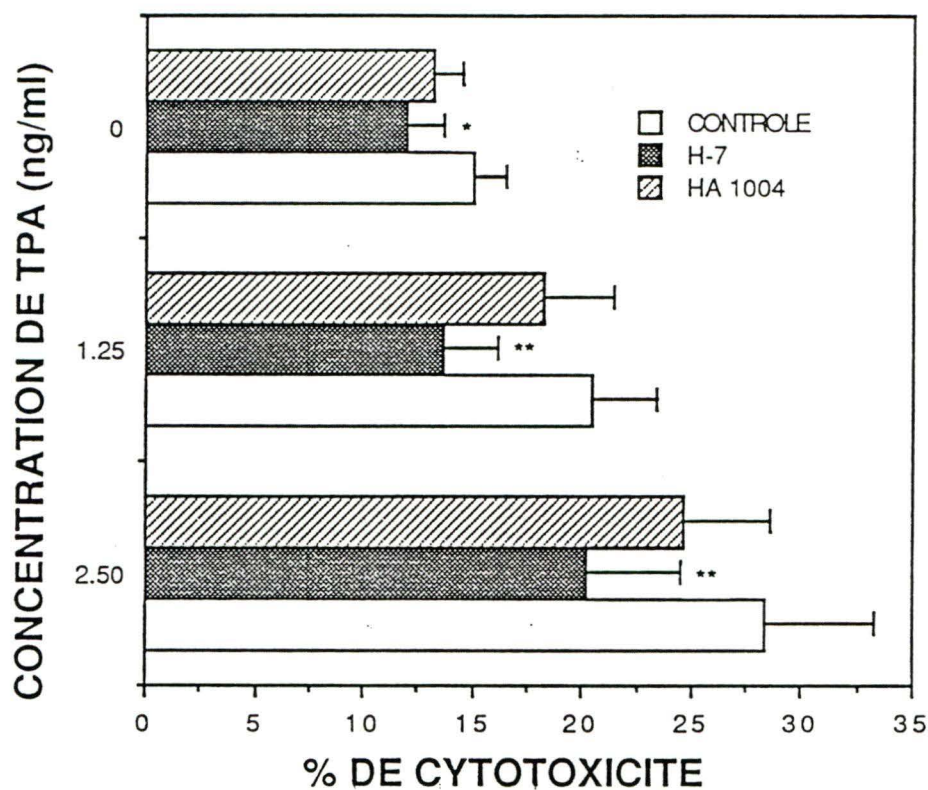


Figure 8: Effet du H-7 et du HA 1004 sur l'activité NK des cellules Kurloff. Le H-7 et le HA 1004 ont été utilisés en prétraitement (45 minutes) des cellules Kurloff à une concentration de $50 \mu\text{M}$ et étaient présents durant l'essai de cytotoxicité. Le TPA était ajouté dans les microplaques à des concentrations variables juste avant l'essai de cytotoxicité. La lyse des cellules YAC-1 ($5 \times 10^4/\text{ml}$) par les cellules Kurloff ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C . Les différences entre les groupes témoins étaient significatives ($p < 0.05$). Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences.

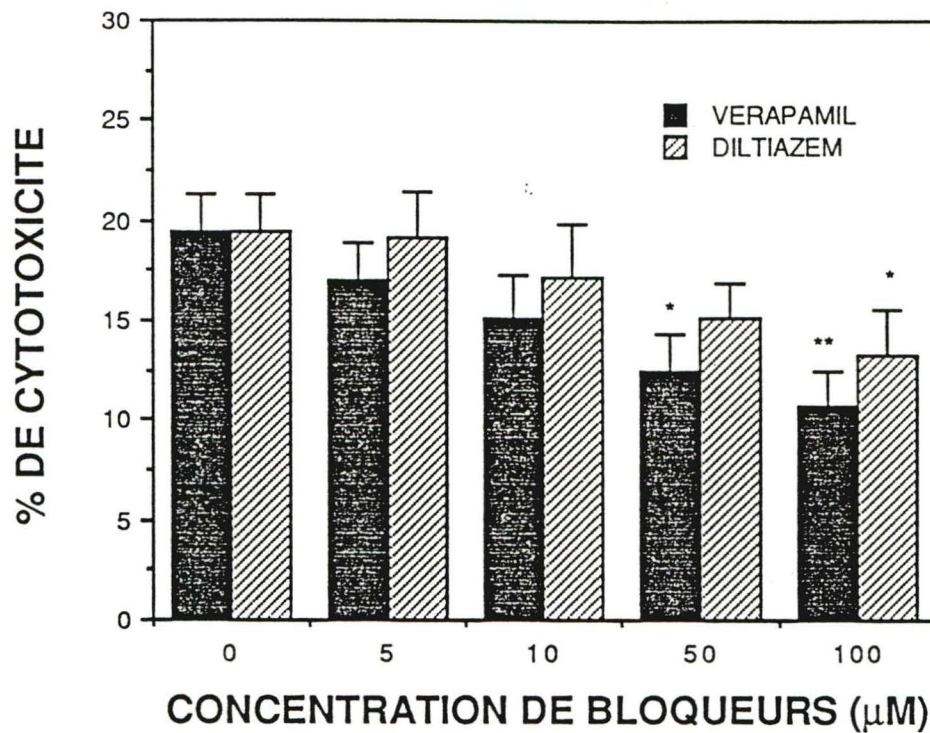


Figure 9: Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par les bloqueurs de canaux calciques vérapamil et diltiazem. Les cellules Kurloff ont été préincubées 45 minutes en présence ou absence de vérapamil ou de diltiazem et ont été utilisées sans lavage pour l'essai de cytotoxicité. La lyse des cellules YAC-1 (5×10^4 /ml) par les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C . Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 6 expériences.

donc été prétraitées pendant 45 minutes avec des concentrations variables de bloqueurs de canaux calciques (vérapamil et diltiazem) avant l'essai de cytotoxicité de 4 heures. Les résultats présentés à la figure 9 démontrent que ces deux bloqueurs de canaux calciques pouvaient exercer un effet inhibiteur proportionnel à la concentration utilisée sur l'activité cytolytique des cellules Kurloff contre les cellules YAC-1. Pour toutes les concentrations utilisées, le vérapamil était plus efficace que le diltiazem. A une concentration de 10^{-4} M, 40% de la lyse des cellules YAC-1 était inhibée par prétraitement des cellules Kurloff avec le vérapamil comparativement à 20% avec le diltiazem. Les inhibitions observées n'étaient pas dues à la toxicité de ces agents sur les cellules Kurloff puisque la viabilité des cellules n'était pas affectée par le prétraitement à l'une ou l'autre des concentrations utilisées pour ces essais tel qu'observé par exclusion au bleu de Trypan (résultats non présentés).

3.8 Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par le monensin

Dans le but d'étudier l'implication potentielle de facteurs cytotoxiques sécrétés par les cellules Kurloff dans la médiation d'activité NK, nous avons utilisé le monensin, un ionophore carboxylique pouvant interférer avec la sécrétion normale chez les cellules NK (CARPEN et coll., 1981; CARPEN et SASKELA, 1988). Tel qu'observé à la figure 10, le prétraitement des cellules Kurloff avec le monensin a résulté en une inhibition de la lyse des cellules YAC-1

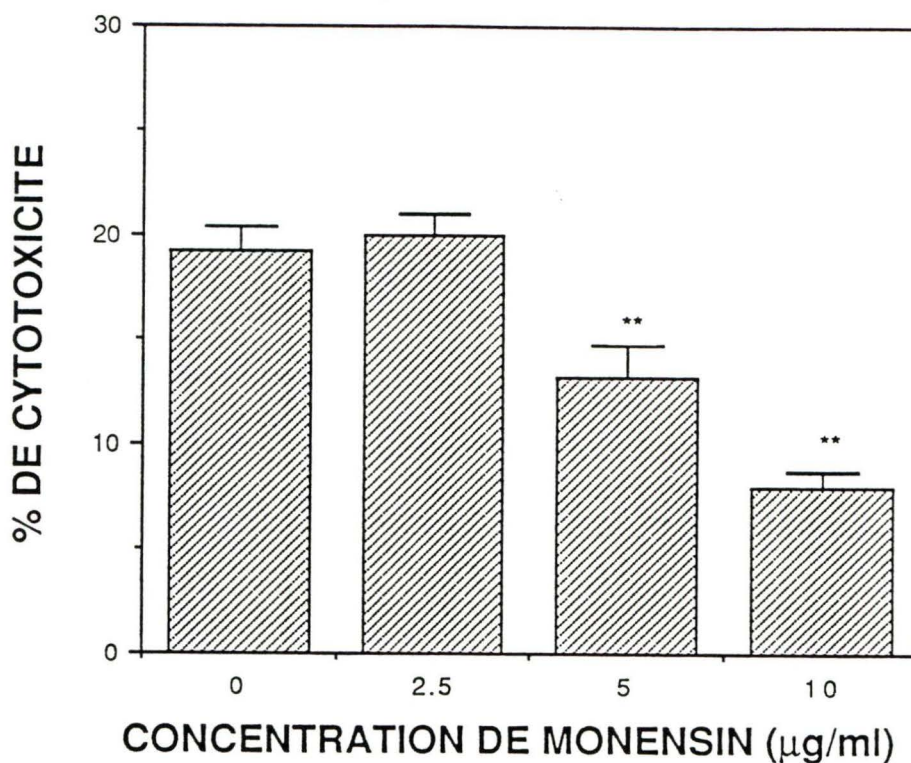


Figure 10: Inhibition de l'activité NK des cellules Kurloff par le monensin. Les cellules Kurloff ont été prétraitées 60 minutes à 37°C en présence ou absence de concentrations variables de monensin, puis lavées 2 fois dans du PBS avant l'essai de cytotoxicité. La lyse des cellules YAC-1 (5×10^4 /ml) par les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr . Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 4 expériences.

par les cellules Kurloff, proportionnelle à la concentration utilisée.

3.9 Relâchement de sérine estérases par les cellules Kurloff

Les cellules capables d'activité cytotoxique peuvent lyser leurs cellules cibles via des mécanismes impliquant le relâchement de molécules lytiques parmi lesquelles les sérine estérases ont été identifiées (TAKAYAMA et coll., 1987; ATKINSON et coll., 1990). Les cellules Kurloff ont été incubées 4 heures en présence de TPA (10 ng/ml) et d'ionomycine (1 μ M) et l'activité sérine estérases des surnageants a été mesurée. Les résultats présentés au tableau 3 démontrent que cette procédure pouvait induire une augmentation considérable du relâchement de sérine estérase dans le milieu extracellulaire par les cellules Kurloff comparativement au contrôle (surnageants de cellules Kurloff non stimulées).

3.10 Activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules cibles WEHI 164

Nous avons vu précédemment que le potentiel lytique des cellules Kurloff variait selon la cellule cible utilisée (voir figure 1). Nous avons donc cherché à savoir si les cellules Kurloff pouvaient être actives contre la lignée cellulaire murine WEHI 164. Il a été démontré que cette cellule tumorale était sensible à l'activité cytotoxique du TNF α et des cellules NC (DJEU et coll., 1983; ORTALDO

TABLEAU 3 **RELACHEMENT DE SERINE ESTÉRIASE PAR LES**
CELLULES KURLOFF

<u>STIMULI</u>	<u>% DE RELACHEMENT DE</u> <u>SERINE ESTÉRIASE</u>
Contrôle	26.0 ± 4.2
TPA 10 ng/ml/ionomycine (1µM)	78.6 ± 5.9**

Les cellules Kurloff ($2.5 \times 10^6/0.2$ ml) ont été incubées 4 h à 37°C en présence ou absence de TPA et d'ionomycine et la présence de sérine estérase dans les surnageants a été déterminée tel que décrit dans la section "matériel et méthodes".

Les résultats représentent la moyenne ± l'écart-type de 5 expériences.

** p < 0.01

et coll., 1986). A la figure 11, on peut voir que les cellules WEHI 164 étaient aussi très sensibles à l'activité lytique des cellules Kurloff dans l'essai de cytotoxicité de 18 heures et à un degré moindre dans l'essai de 4 heures. De plus, lorsque l'essai de 4 heures était effectué en présence de TPA (10 ng/ml), la lyse des cellules WEHI 164 était significativement augmentée (figure 12). La stimulation par l'ionomycine seule (1 μ M) n'avait cependant aucun effet quoiqu'un effet synergique était observé lorsqu'utilisé en combinaison avec le TPA.

3.11 Production de TNF par les cellules Kurloff

Suite aux résultats obtenus dans l'expérience précédente, nous nous sommes demandé si l'activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules cible WEHI 164 pouvait être médié via la libération de TNF. Les cellules ont donc été stimulées 18 heures avec les cellules cibles WEHI 164 et l'activité cytotoxique des surnageants a été testée par bioessai de TNF en utilisant la lignée cellulaire TNF-sensible L-929. Les résultats présentés à la figure 13a indiquent que cette stimulation pouvait induire la libération de facteurs cytotoxiques apparentés au TNF par les cellules Kurloff.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons observé que la combinaison de TPA (10 ng/ml) et d'ionomycine (1 μ M) était aussi un bon

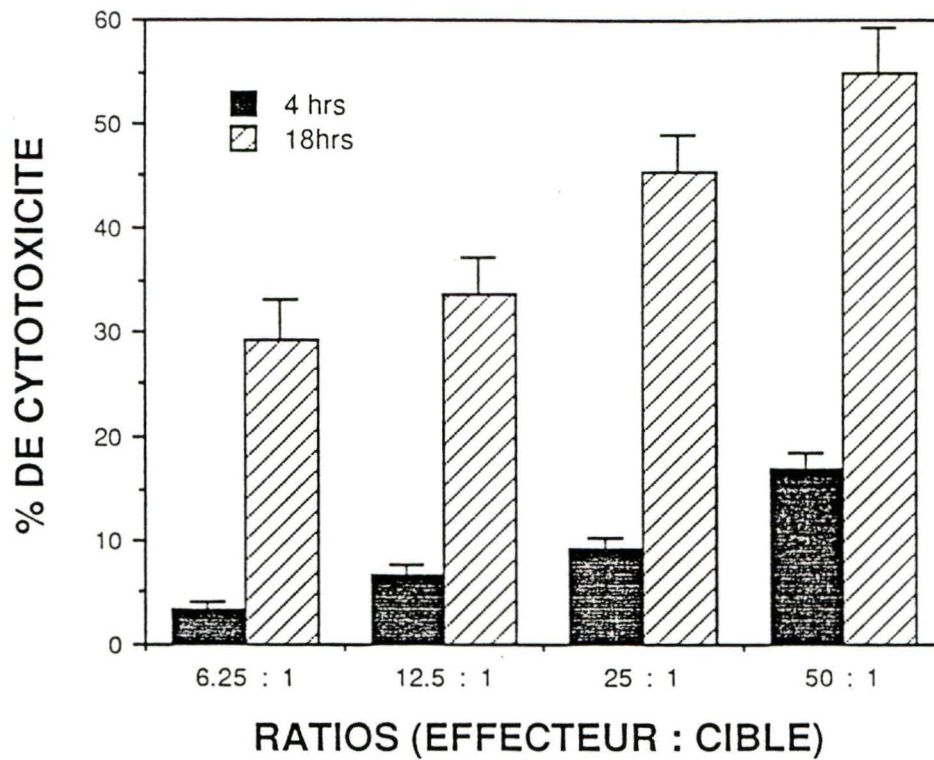


Figure 11: Activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules cibles WEHI 164. Les cellules Kurloff ont été incubées 4 heures ou 18 heures à 37°C en présence de cellules WEHI 164 (5×10^4 /ml). La lyse des cellules cibles par les cellules Kurloff a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr par les cellules cibles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences.

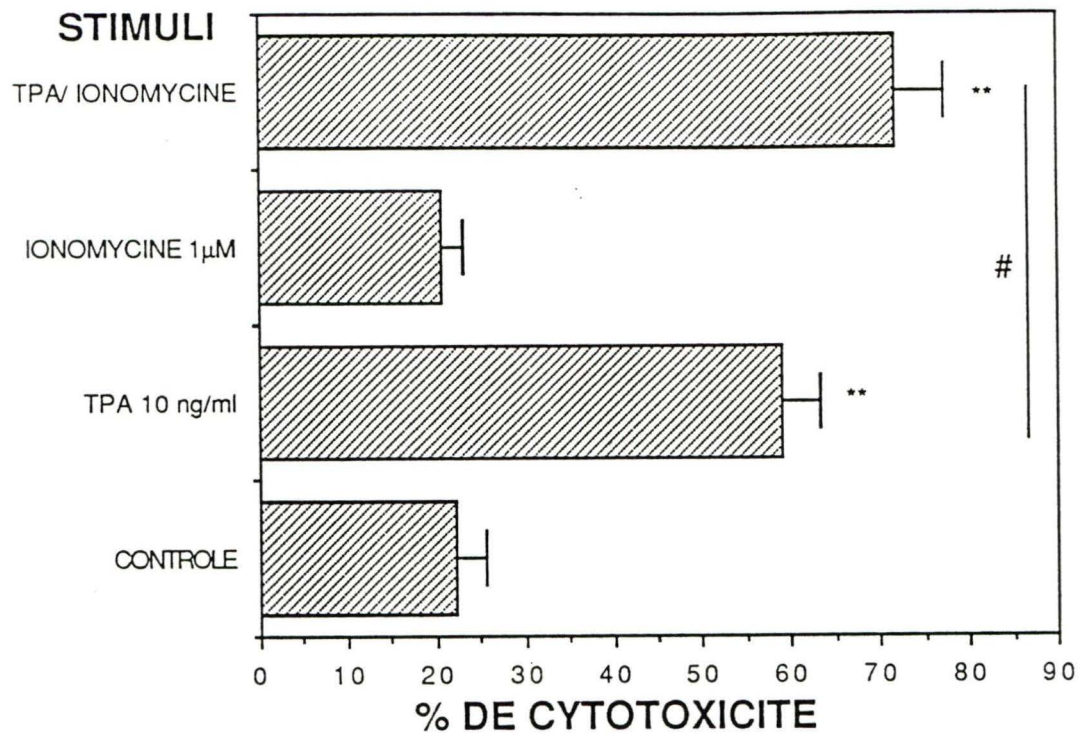


Figure 12: Effet du TPA et de l'ionomycine sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff. La lyse des cellules WEHI 164 (5×10^4 /ml) a été déterminée par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr après 4 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de TPA (10 ng/ml) et/ou d'ionomycine (1 μM). Le TPA et l'ionomycine étaient ajoutés directement dans les microplaques et étaient présents durant toute la période d'incubation. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences. (#) signifie que les pourcentages de cytotoxicité obtenus par stimulation avec le TPA et le TPA + l'ionomycine sont significativement différents ($p < 0.05$).

stimuli pouvant déclencher la libération de facteur(s) cytotoxique(s) apparenté(s) au TNF par les cellules Kurloff (figure 13b). L'effet de ces substances n'était pas dû à leur toxicité sur les cellules L-929 puisqu'aucune lyse des cellules L-929 n'a pu être observée lorsque le TPA et/ou l'ionomycine était utilisés dans du milieu standard (résultats non présentés). La libération de facteur(s) cytotoxique(s) apparenté(s) au TNF par les cellules Kurloff était aussi fortement augmentée par stimulation avec l'ionomycine seule. Toutefois, aucune activité de type TNF n'a pu être détectée dans les surnageants de cellules Kurloff stimulées seulement 4 heures avec le TPA et/ou l'ionomycine (résultats non présentés).

Tel que démontré au tableau 4, les surnageants de cellules Kurloff stimulées 18 heures avec le TPA et l'ionomycine étaient aussi très cytotoxiques contre les cellules cibles WEHI 164. la cytotoxicité observée était approximativement 4 fois supérieure à celle du contrôle (cellules Kurloff non stimulées). Au contraire, la lyse des cellules cibles P815 était très faible et n'était pas augmentée en présence des surnageants de cellules Kurloff stimulées avec le TPA et l'ionomycine. Il a été démontré que cette lignée cellulaire était résistante à l'activité NK (WILTROUT et coll., 1982; WRIGHT et BONAVIDA, 1982; BOLHUIS et coll., 1983/84) et au TNF α (ORTALDO et coll., 1986).

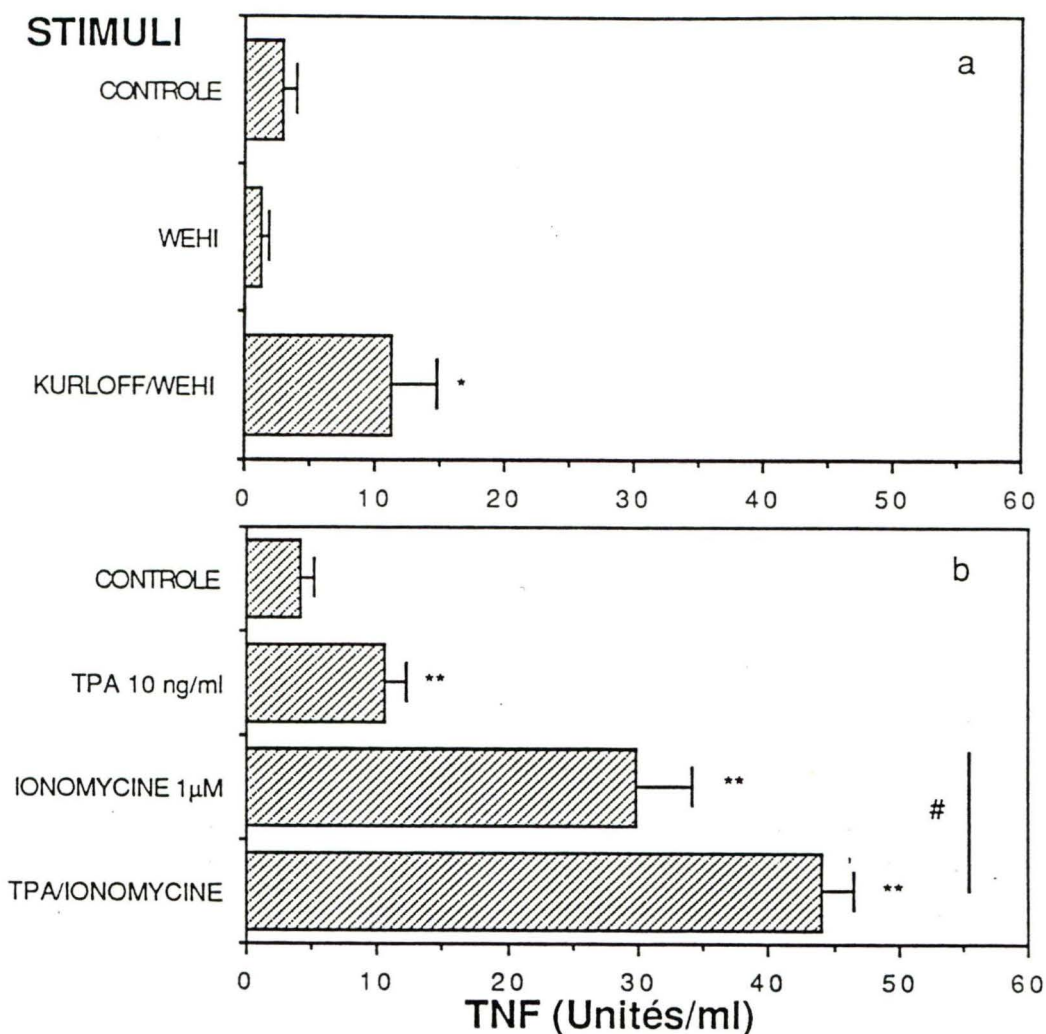


Figure 13: Production de TNF par les cellules Kurloff. Les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) ont été incubées en présence ou absence (a) de cellules cibles WEHI 164 (5×10^4 /ml) ou (b) de TPA (10 ng/ml) et/ou ionomycine (1 μ M), à 37°C. Après 18 heures les surnageants ont été recueillis et leur activité cytotoxique a été mesurée par bioessai en utilisant la lignée cellulaire TNF-sensible L-929. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 7 à 9 expériences. (#) signifie que les quantités de TNF produites par les cellules Kurloff stimulées avec le TPA et avec le TPA + l'ionomycine était significativement différentes $p < 0.01$.

**TABLEAU 4 ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES SURNAGEANTS DES
CELLULES KURLOFF**

<u>Surnageants</u>	<u>Cellules cibles</u>	
	<u>WEHI 164</u>	<u>P 815</u>
Contrôle	15.5 ± 2.0	1.5 ± 1.2
TPA (10 ng/ml) + Ionomycine (1 µM)	59.0 ± 2.0	2.5 ± 1.5

Les cellules cibles ($5 \times 10^4/\text{ml}$) ont été incubées 18 h en présence de surnageants de cellules Kurloff concentrés (4 x) sur des filtres centricon-3, tel que décrit dans la section "matériel et méthodes".

Les résultats représentent la moyenne des % de cytotoxicité \pm l'écart type de 4 expériences.

3.12 Neutralisation de l'activité cytotoxique des surnageants de cellules Kurloff par des anticorps anti-TNF

Il semble selon les résultats des expériences précédentes que les cellules Kurloff puissent produire un facteur cytotoxique soluble de type TNF. Cependant, le TNF α et le TNF β (lymphotoxine) sont deux molécules fonctionnellement et structuralement apparentées (PENNICA et coll., 1984) agissant sur le même récepteur (FITZGERALD KNAUER et coll., 1990). Par conséquent, elles ne peuvent être distinguées par le bioessai de TNF avec les cellules L-929.

Pour ces raisons nous avons effectué des essais de cytotoxicité avec les surnageants de cellules Kurloff en présence d'anticorps anti-TNF α murins. Les résultats de la figure 14 montrent que la lyse des cellules WEHI 164 était presque complètement inhibée par le prétraitement des surnageants avec 600 UN/ml d'anticorps et ce, même avec les surnageants concentrés 4 fois sur filtres centricon-3. Une inhibition était aussi observée avec 200 UN/ml quoique plus faible qu'avec 600 UN/ml d'anticorps. Actuellement aucun anticorps anti-TNF α ou TNF β de cobaye n'est disponible. En utilisant les anticorps analogues humains (anti-TNF α ou TNF β) nous n'avons pu observer de neutralisation de l'activité cytotoxique des surnageants des cellules Kurloff (résultats non présentés).

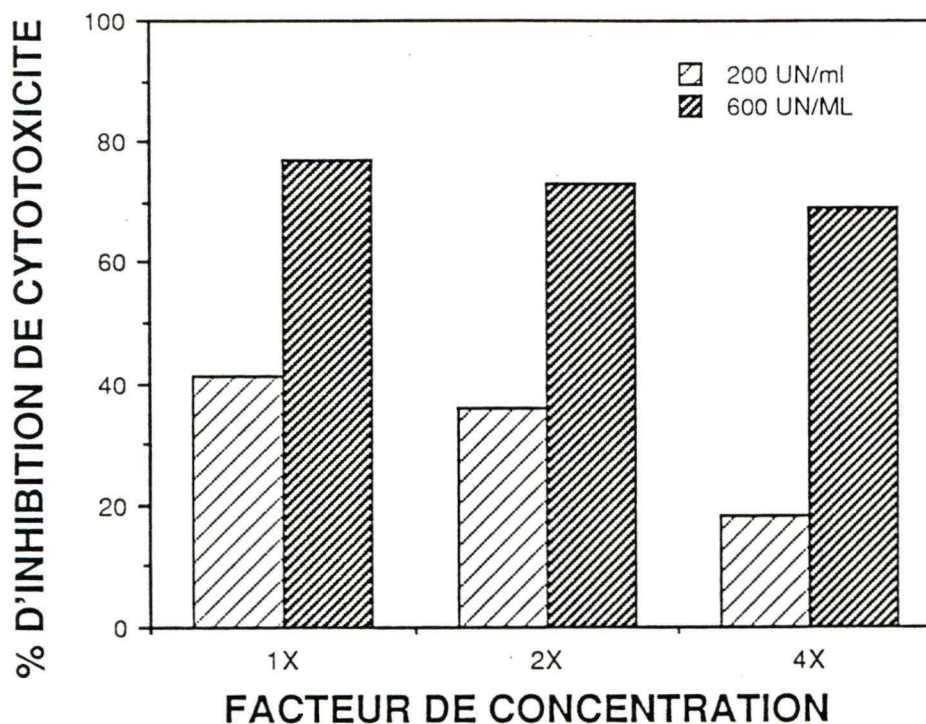


Figure 14: Neutralisation de l'activité cytotoxique des surnageants de cellules Kurloff contre les cellules WEHI 164 par des anticorps anti-TNF. Les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) ont été incubées à 37°C en présence de TPA (10 ng/ml) et d'ionomycine ($1 \mu\text{M}$) et les surnageants récoltés ont été concentrés 4 fois sur des filtres centricon-3, puis dilués en série (facteur 2) dans des microplaques. Les surnageants prétraités ou non pendant 30 minutes avec 200 ou 600 UN/ml d'anticorps anti-TNF α murins ont été incubés 18 heures en présence de cellules cibles WEHI 164 (5×10^4 /ml) et le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par mesure de relâchement spécifique de ^{51}Cr . Les résultats représentent la moyenne des pourcentages d'inhibition de 4 expériences.

3.13 Effet du monensin sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff

Après avoir constaté l'inhibition importante de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff contre les cellules YAC-1 par prétraitement des cellules effectrices avec le monensin (figure 10), nous avons voulu vérifier si cet ionophore carboxylique pouvait avoir le même effet sur la lyse des cellules WEHI 164. Les résultats sont présentés à la figure 15. La lyse des cellules WEHI 164 dans l'essai de cytotoxicité de 4 heures était considérablement altérée (41% d'inhibition) par le prétraitement des cellules Kurloff avec le monensin. La lyse des cellules WEHI 164 dans l'essai de 18 heures était aussi réduite par le prétraitement des cellules Kurloff quoique l'inhibition observée était moins drastique (21% d'inhibition).

3.14 Fractionnement des surnageants de cellules Kurloff

Pour estimer le poids moléculaire des facteurs cytotoxiques sécrétés par les cellules Kurloff, les surnageants de cellules Kurloff stimulées 18 heures avec le TPA (10 ng/ml) et l'ionomycine (1 μ M) ont été concentrés sur un filtre centricon-3 et fractionnés par la suite sur un filtre centricon-10 ou centricon-30. Après cette procédure, l'activité cytotoxique des concentrés et des filtrats contre les cellules cibles WEHI 164 a été mesurée par essai de cytotoxicité de 18 heures. Les résultats de 2 expériences représentatives sont présentés au tableau 5. Tel que

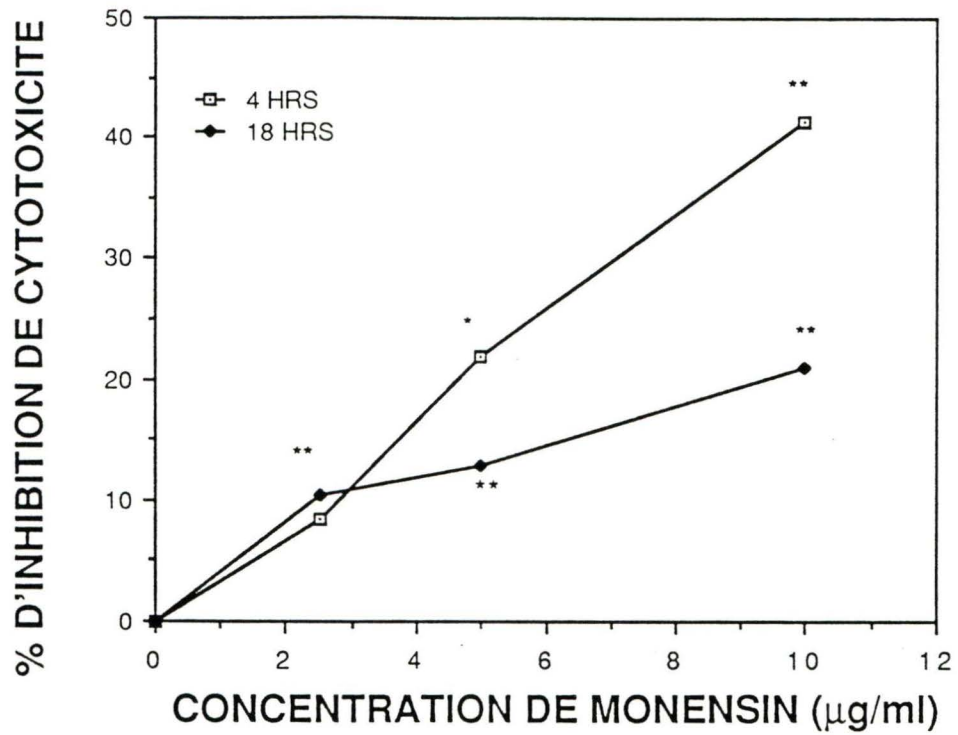


Figure 15: Effet du monensin sur la lyse des cellules WEHI 164 par les cellules Kurloff. Les cellules Kurloff ont été prétraitées 60 minutes en présence ou absence de monensin et lavées 2 fois dans du PBS avant l'essai de cytotoxicité. La lyse des cellules WEHI 164 (5×10^4 /ml) par les cellules Kurloff (2.5×10^6 /ml) a été déterminée par mesure de relâchement de ^{51}Cr après 4 heures ou 18 heures d'incubation à 37°C . Les résultats représentent la moyenne des pourcentages d'inhibition de 4 à 5 expériences.

**TABLEAU 5 ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES SURNAGEANTS FRACTIONNÉS DE CELLULES KURLOFF
CONTRE LES CELLULES CIBLES WEHI 164**

Expériences	Stimuli	% de cytotoxicité des surnageants			
		Stock	Centricon-3 concentré/filtrat	Centricon-10 concentré/filtrat	Centricon-30 concentré/filtrat
1	Contrôle	0	10/0	ND*	ND
	TPA (10 ng/ml) + ionomycine (1 µM)	39	60/15	84/15	70/20
2	Contrôle	10	15/0	ND	ND
	TPA (10 ng/ml) + ionomycine (1 µM)	41	55/8	71/14	66/17

Les cellules cibles WEHI 164 (5×10^4 /ml) ont été incubées 18 h en présence de surnageants fractionnés de cellules Kurloff, tel que décrit dans la section "matériel et méthodes". Les résultats représentent les pourcentages de cytotoxicité spécifique.

* ND = non déterminé.

prévu, les surnageants contrôles (cellules Kurloff non stimulées) n'ont démontré que peu ou pas d'activité cytotoxique, laquelle pouvait être légèrement augmentée par concentration des surnageants sur filtre centricon-3. Au contraire, les surnageants stock de cellules Kurloff stimulées étaient très cytotoxiques contre les cellules WEHI 164. La lyse des cellules WEHI 164 était accrue davantage par filtration des surnageants sur filtre centricon-3, où l'activité cytotoxique se retrouvait essentiellement dans les concentrés. Lorsque ces surnageants concentrés étaient par la suite filtrés sur filtre centricon-10 ou centricon-30, l'activité cytotoxique était observée en majeure partie au niveau des concentrés avec une activité résiduelle mais significative dans les filtrats.

DISCUSSION

Quoique l'activité de type NK ait déjà été observée chez le cobaye, la cellule responsable de l'élimination des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus, n'a jamais clairement été identifiée. La médiation d'activité NK in vitro par des cellules Kurloff purifiées a été démontrée pour la première fois par DEBOUT et coll. (1984) en utilisant la lignée cellulaire cible humaine K562. De plus, il existe une corrélation entre la diminution tissulaire des cellules Kurloff et la distribution de l'activité NK chez le cobaye (ALTMAN et RAPP., 1978). Pour ces raisons nous avons entrepris de caractériser les mécanismes cytotoxiques des cellules Kurloff contre les cellules tumorales afin d'établir une corrélation possible avec les mécanismes employés par les cellules NK classiques humaines et murines et ceux des cellules Kurloff.

Au cours de ce travail nous avons pu constater une certaine sélectivité de l'activité NK des cellules Kurloff envers les différentes cellules cibles utilisées. La cellule cible murine YAC-1 sensible à l'activité NK était hautement susceptible à l'activité NK des cellules Kurloff tandis que la lignée cellulaire humaine K562 a démontré une susceptibilité modérée. Pour sa part, la lignée cellulaire murine P815 résistante à l'activité NK a démontré une résistance presque complète à la lyse par les cellules Kurloff. La spécificité de l'activité NK chez le cobaye a aussi été observée par ALTMAN et RAPP (1978). Ces auteurs ont démontré que la sélectivité de l'activité NK envers différentes cellules cibles était médiée par une

population cellulaire non-adhérente et possédant des récepteurs Fc pour les immunoglobulines G (Fc γ R⁺). Plus récemment, HARRISON et MAYER (1988) ont observé que l'activité NK du cobaye contre les cellules infectées par un virus était médiée en majeure partie par une population cellulaire non-T, capable de former des rosettes avec des érythrocytes de lapin (E-rosette⁺). Puisque les cellules Kurloff sont aussi non-adhérentes, E-rosette⁺ (NOGA et coll., 1985; WILSON et COOMBS, 1971; WILSON et COOMBS, 1973), il est possible que l'activité NK observée par ces auteurs ait été médiée par les cellules Kurloff.

Les propriétés mitogéniques des lectines Con A et PHA sur les leucocytes sont connues depuis longtemps et ont fait l'objet de plusieurs études (revues par NASPITZ et RICHTER, 1968 et LIS et SHARON, 1973). Plusieurs rapports concernant l'induction de cytotoxicité cellulaire contre différentes cellules cibles par les lectines mitogéniques ont été publiés (WISLOFF et coll., 1974; De E. De BRACCO et coll., 1976; NELSON et coll., 1976). Ces études utilisaient des essais de cytotoxicité dans lesquels les lectines étaient incubées avec des leucocytes de sang périphérique (PBL) et des cellules cibles pour des périodes de 18 à 24 heures. Dans ces conditions, la cytotoxicité résultante est présumément attribuable aux effets additifs des cellules cytotoxiques originalement présentes et des cellules activées de novo par les lectines mitogéniques. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé des suspensions de cellules Kurloff très pures (>95%) et testé

leur activité cytotoxique en présence de lectines dans des essais de courte durée (4 heures).

Les résultats présentés à la figure 2 indiquent que dans ces conditions, la PHA pouvait accroître l'activité NK des cellules Kurloff, proportionnellement à la concentration utilisée, contre les deux cibles murines mais seulement si la PHA était présente durant les 4 heures d'incubation. La lyse des cellules K562 par contre n'était pas affectée par l'utilisation de PHA durant l'essai de cytotoxicité ou en prétraitement des cellules effectrices. L'augmentation de l'activité cytotoxique en présence ou absence de lectines a été désignée sous le terme d'activité LDCC (Lectine-Dependent Cellular Cytotoxicity) et a été rapporté chez l'homme par plusieurs auteurs. Parmi ces auteurs, BONAVIDA et coll. (1977) ont démontré, par des méthodes de fractionnement de populations cellulaires, que la déplétion des monocytes, des granulocytes et des lymphocytes B n'éliminait pas l'activité LDCC. Inversement, la déplétion des leucocytes possédant des récepteurs Fc éliminait totalement l'activité LDCC. Lorsque cette population cellulaire était enrichie en lymphocytes T par formation de rosettes avec des érythrocytes de mouton, l'activité LDCC était retrouvée à la fois dans la fraction enrichie en lymphocytes T et dans la fraction non-T, mais était prédominante dans la fraction non-T. Ainsi, il semble que le phénotype des cellules responsables de l'activité LDCC chez l'homme soit très similaire à celui des cellules Kurloff c'est-à-dire non monocyte (non-adhérent), non-B (MSGp9⁻), FcγR⁺

et E-rosette (environ 35% des cellules Kurloff du sang périphérique) (THOMSON et coll., 1988; SEWELL et coll., 1988; WILSON et COOMBS, 1971; WILSON et COOMBS, 1973).

Au cours de leur étude, BONAVIDA et coll. (1977) ont aussi observé que l'activité LDCC était beaucoup plus faible en présence de Con A que de PHA et parfois même indétectable. Ces résultats sont compatibles avec les nôtres puisque nous n'avons observé aucune activité LDCC en présence de Con A avec les 3 cellules cibles utilisées (observation non présentée).

Les résultats obtenus avec les cellules NK-résistantes P815 sont plus surprenants. Tandis que cette lignée cellulaire était résistante à la lyse par les cellules Kurloff dans le milieu standard, l'ajout de PHA dans le milieu standard la rendait très sensible à l'activité cytotoxique des cellules Kurloff. Des résultats similaires ont été obtenus par BOLHUIS et coll. (1983/84) en utilisant des cellules NK humaines B73.1⁺ obtenues par expansion clonale. Sur la base de ces résultats et des résultats obtenus dans les essais de formation de conjuguées effecteur:cible (voir tableau 1), nous pouvons supposer que l'augmentation de la lyse des cellules cibles en présence de PHA résulte de ses propriétés leucoagglutinantes plutôt que mitogéniques. Nous croyons que la présence de PHA entre les cellules effectrices et les cellules cibles facilite les interactions entre leurs membranes permettant d'induire les signaux d'activation. Cette hypothèse est supportée par

le fait que les cellules P815 étaient capables de former des conjugués avec les cellules effectrices en absence de PHA mais étaient susceptibles à la lyse seulement sous des conditions appropriées c'est-à-dire en présence de PHA.

Tel que montré à la figure 3b, les cellules Kurloff, durant la formation de conjugués formaient fréquemment des projections cytoplasmiques pénétrant à l'intérieur de la cellule cible. Des interactions du même type ont été observées entre les cellules cibles et les cellules NK humaines (NEIGHBOUR et HUBERMAN, 1982; CARPEN et coll., 1982), de souris (RODER et coll., 1978; FREY et coll., 1982) et de rat (KANEDA et WAKE, 1990).

Il a été démontré que la lyse des cellules tumorales par les cellules NK est dépendante de la présence de Mg^{++} et de Ca^{++} extracellulaire (HISERODT et coll., 1982; QUAN et coll., 1982; NG et coll., 1987; RODER et coll., 1978; EDWARDS et coll., 1989). Le Mg^{++} étant nécessaire à l'adhésion à la cellule cible, le Ca^{++} est essentiel à l'activation et à la programmation de la lyse. En accord avec ces affirmations, nous avons observé que la déplétion du Ca^{++} seul ou du Ca^{++} et du Mg^{++} avec 1 mM d'EGTA ou 2 mM d'EDTA respectivement, pouvait inhiber complètement la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff (figure 5). Les résultats présentés à la figure 6 indiquent que le Mg^{++} seul n'était pas suffisant pour induire la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff. De plus, la présence de Mg^{++} ne semblait pas nécessaire puisque la lyse pouvait s'effectuer

en présence de Ca^{++} seul. Ces résultats sont contradictoires aux travaux antérieurs démontrant que l'adhésion des cellules NK à leurs cibles est nécessaire pour que la lyse s'effectue et est dépendante de la présence de Mg^{++} et indépendante de la présence de Ca^{++} (HISERODT et coll, 1982; QUAN et coll., 1982; RODER et coll., 1978; CHOW et coll., 1988).

Cette discordance concernant la dépendance au Mg^{++} peut possiblement être attribuable à la spécificité d'espèce des cellules effectrices. Une explication alternative pourrait être que le Ca^{++} puisse agir en synergie avec des quantités traces de Mg^{++} pour permettre l'adhésion. GATELY et MARTZ (1979) ont montré que l'ajout de 0.1 à 1.0 mM de Ca^{++} dans un milieu exempt de Ca^{++} et de Mg^{++} pouvait induire une augmentation marquée de conjugués entre des lymphocytes T de souris et des cellules P815. Lorsque le milieu était prétraité avec une résine échangeuse d'ions pour chélater les cations divalents contaminant le milieu, l'ajout de Ca^{++} subséquent n'avait aucun effet sur la formation de conjugués. Ces observations seraient en accord avec nos résultats mentionnés précédemment et l'observation que le Ca^{++} peut participer à la formation de conjugués puisque l'EGTA pouvait diminuer la formation de conjugués cellule Kurloff:cellule YAC-1 (tableau 2). Il est intéressant de noter que l'activité NK des cellules Kurloff était totalement inhibée en présence de 1.0 mM d'EGTA tandis que la formation de conjugués n'était que partiellement inhibée suggérant un second rôle du Ca^{++} dans les événements post-adhésion. Si cette hypothèse est vraie, elle expliquerait

pourquoi une concentration supérieure d'EDTA (qui chélate à la fois le Ca^{++} et le Mg^{++}) est nécessaire pour inhiber complètement la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff.

L'ensemble de ces résultats indique que l'adhésion des cellules Kurloff à leurs cellules cibles constitue une première étape essentielle à la lyse des cellules cibles et est dépendante de la présence de Ca^{++} extracellulaire et jusqu'à un certain point, à la présence de quantité trace de Mg^{++} .

Lorsque les essais étaient effectués en présence de l'activateur de la PKC, le TPA, une augmentation significative de l'activité NK des cellules Kurloff contre les cellules cibles YAC-1 était observée (figure 7). Quoique l'ionomycine seule n'ait eu aucun effet, une synergie était observée sur l'activité NK des cellules Kurloff lorsque combinée au TPA. L'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff par le TPA semble résulter de l'activation de la PKC puisque; 1) le prétraitement des cellules effectrices avec le H-7 pouvait réduire la lyse des cellules YAC-1 au niveau du contrôle (absence de TPA) à des concentrations de TPA variant entre 1.25 et 2.5 ng/ml 2) l'activité cytotoxique des cellules Kurloff prétraitées avec le HA1004, un inhibiteur plus spécifique des protéines kinases dépendante des nucléotides cycliques, était encore augmentée en présence de TPA (1.25 à 2.5 ng/ml) et 3) en absence de TPA (contrôle) une inhibition significative était observée sur la lyse des cellules YAC-1 par les cellules Kurloff prétraitées

avec le H-7. Ces résultats suggèrent fortement que suivant la liaison aux cellules cibles, l'activation des cellules Kurloff se traduit par l'activation de la PKC et que l'influx de Ca^{++} extracellulaire accroît davantage leur activité lytique. Cette dernière suggestion est supportée par les résultats obtenus par prétraitement des cellules Kurloff avec les 2 bloqueurs de canaux calciques, vérapamil et diltiazem (figure 9). Ces deux bloqueurs pouvaient inhiber l'activité NK des cellules Kurloff contre les cellules YAC-1 proportionnellement à la concentration utilisée. Une inhibition optimale était observée à $100 \mu M$ induisant 40% et 20% d'inhibition par le vérapamil et le diltiazem respectivement. Nos résultats sont en accord avec des résultats récents démontrant que l'activité lytique des cellules NK humaines dépend de l'activation de la PKC (CHOW et coll., 1988; STEELE et BRAHMI, 1988; ORTALDO et coll., 1989) et de l'influx de Ca^{++} dans la cellule effectrice (NG et coll., 1987; EDWARDS et coll., 1989; MASERA et coll., 1989).

Il est connu qu'après leur activation, les cellules NK subissent plusieurs changements morphologiques tels que la réorientation de l'appareil de Golgi, du cytosquelette et des granules lytiques vers la cellule cible menant au relâchement subséquent de leur contenu (CARPEN et SAKSELA, 1988). Au cours d'études préliminaires nous avons observé que le prétraitement des cellules Kurloff avec le cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, n'affectait pas leur activité cytotoxique contre les cellules YAC-1 suggérant que les facteurs cytotoxiques produits par la cellule sont de nature non protéique ou préstockés

dans la cellule. Cette deuxième hypothèse est supportée par l'inhibition de la lyse des cellules YAC-1 lorsque les cellules Kurloff étaient prétraitées avec le monensin, un ionophore carboxylique pouvant interférer avec la sécrétion normale chez les cellules NK et par conséquent, bloquer la dégranulation des facteurs cytotoxiques (CARPEN et coll., 1981) (figure 10).

Plusieurs évidences ont été accumulées quant au rôle des sérine estérases dans l'activité cytotoxique des cellules NK et des CTL (BROGAN et TARGAN, 1986; GOLDFARB, 1985; OSTERGAARD et CLARK, 1989). Ces protéases sont localisées dans les granules lytiques (BURKHARDT et coll., 1989; MASSON et coll., 1990) et serait en étroite association avec les protéochondroïtines sulfate A chez les CTL (MASSON et coll., 1990). Elles sont relâchées dans le milieu extracellulaire par stimulation avec des cellules cibles tumorales ou avec le TPA et un ionophore de Ca^{++} (OSTERGAARD et CLARK, 1989; ATKINSON et coll., 1990). Nos expériences préliminaires sur les cellules Kurloff par coloration cytochimique, nous ont indiqué que ces protéases sont présentes dans le corps d'inclusion cytoplasmique. Leur association avec les protéochondroïtines sulfate A retrouvées dans le corps d'inclusion (LETAIEF et coll., 1989) reste cependant à confirmer. Toutefois, nous avons observé qu'en réponse à la stimulation des cellules Kurloff avec le TPA et l'ionomycine, ces protéases étaient relâchées dans le milieu extracellulaire (tableau 3).

L'ensemble de ces résultats suggère une grande ressemblance entre les mécanismes de cytotoxicité des cellules Kurloff contre les cellules sensibles à l'activité NK, YAC-1 et les mécanismes employés par les cellules NK classiques. La première étape consiste en l'adhésion ($\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ - dépendante) à la cellule cible. L'activation de la cellule Kurloff est caractérisée par un influx de calcium extracellulaire et l'activation de la PKC. Subséquemment, il y aurait libération de facteurs cytotoxiques, impliquant possiblement des sérine estérases, et menant à la lyse des cellules cibles.

L'activité cytotoxique de type NC représente une deuxième composante de l'immunité naturelle à médiation cellulaire. Cependant, l'identification des cellules capables d'exercer une telle activité a été limitée par l'absence de marqueurs spécifiques pour ces cellules. Contrairement à l'activité rapide (< 4 heures) des cellules NK, la détection optimale de l'activité NC nécessite des périodes d'incubation de 18 heures et plus (PATEK et coll., 1987). Les études visant à caractériser le mécanisme d'action des cellules NC, ont révélé qu'elles médient leur activité cytotoxique via la production de $\text{TNF}\alpha$ (ORTALDO et coll., 1986; PATEK et coll., 1987).

Toutefois, les cellules NK sont aussi capables de produire du $\text{TNF}\alpha$ lorsque stimulées de façon appropriée (DEGLIANTONI et coll., 1985; WRIGHT et

BONAVIDA, 1987; CUTURI et coll., 1987) ce qui a soulevé la possibilité que les cellules NK soient responsables de l'activité NK et NC dépendamment de la cellule cible utilisée. RICHARDS et coll. (1989) et RICHARDS et DJEU (1990) ont récemment caractérisé un clone de cellules NK murines capable de médier une activité NK ou NC contre les cellules YAC-1 et WEHI 164 respectivement.

Dans ce rapport, nous avons démontré que les cellules Kurloff étaient aussi capables de lyser les cellules sensibles au TNF, WEHI 164. De plus, lorsque les cellules Kurloff étaient stimulées 18 heures avec les cellules WEHI 164, une activité cytotoxique de type TNF significative était détectée dans les surnageants tel qu'observé par bioessai de TNF en utilisant les cellules cibles sensibles au TNF, L-929. Plusieurs auteurs ont démontré que les cellules cibles tumorales pouvaient stimuler la production de TNF par les macrophages péritonéaux (HASDAY et coll., 1990), les cellules NC (ORTALDO et coll., 1986) ou les cellules NK (DEGLIANTONI et coll., 1985; WRIGHT et BONAVIDA, 1987). Dans notre étude, nous avons aussi observé un relâchement significatif de facteur(s) TNF-like par stimulation des cellules Kurloff avec l'ionomycine seule ou en combinaison avec le TPA, et à un niveau moindre, avec le TPA seul. CUTURI et coll. (1987) ont aussi observé un relâchement significatif de $\text{TNF}\alpha$ par stimulation de cellules NK humaines purifiées avec l'ionophore de calcium A23187 et le phorbol 12,13-dibutirate (PDBu). Toutefois, contrairement à nos observations sur les cellules Kurloff, ils

n'ont pu détecter de relâchement de $\text{TNF}\alpha$ par stimulation des cellules NK humaines avec l'ionophore de calcium seul.

L'activité NC est généralement reconnue comme étant médiée par le relâchement de $\text{TNF}\alpha$ par les cellules effectrices suite au contact des cellules cibles. Par conséquent, nous avons proposé que pour que les cellules Kurloff soient considérées des cellules effectrices NC, les conditions suivantes devraient être respectées; 1) les cellules Kurloff devraient être capables de lyser des cellules TNF -sensibles, 2) les cellules Kurloff devraient relâcher du TNF dans le surnageant suite à leur stimulation, 3) ces surnageants devraient être cytotoxiques contre des cellules TNF -sensibles mais pas contre des cellules TNF -résistantes et 4) cette cytotoxicité devrait être bloquée par des anticorps anti- $\text{TNF}\alpha$.

Puisque les deux premières conditions étaient démontrées (voir figures 11 et 13), nous avons voulu vérifier si les facteurs cytotoxiques relâchés suite à la stimulation des cellules Kurloff étaient cytotoxiques contre les cellules TNF -sensibles WEHI 164. Tel qu'attendu, les cellules WEHI 164 étaient très susceptibles à la lyse par les surnageants de cellules Kurloff stimulées avec le TPA ou l'ionomycine. Au contraire, les cellules cibles P815 ont démontré une résistance complète à la lyse. Cette lignée cellulaire était utilisée comme contrôle parce qu'en plus de sa résistance au $\text{TNF}\alpha$ (ORTALDO et coll., 1986) elle est aussi résistante à l'activité NK ou aux NKCF (WILTROUT et coll., 1982; WRIGHT et

BONAVIDA, 1982; BOLHUIS et coll., 1983/84). Finalement, nous avons démontré que jusqu'à 80% de l'activité cytotoxique des surnageants pouvait être neutralisée par des anticorps anti-TNF α . L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les cellules Kurloff peuvent médier une activité NC contre les cellules TNF-sensibles WEHI 164.

Etonnement, une lyse significative des cellules WEHI 164 était observée après seulement 4 heures d'incubation avec les cellules Kurloff (voir figure 11). Ceci, semble contradictoire avec des travaux antérieurs démontrant que les cellules cibles WEHI 164 sont résistantes à l'activité NK (COLOTTA et coll., 1984) et que contrairement à l'activité NK, la cinétique de lyse des cellules sensibles au TNF par des cellules NC ou par du TNF exogène est beaucoup plus lente et requiert généralement 18 à 24 heures pour une détection optimale (DJEU et coll., 1988; PATEK et coll., 1987; DEALTRY et coll., 1987; RUBIN et coll., 1988). Pour ces raisons, nous croyons qu'il est peu probable que l'activité cytotoxique observée dans ce court essai soit médiée par le TNF α seul. De plus, nous n'avons pu détecter d'activité TNF-like contre les cellules cibles L-929 dans les surnageants de cellules Kurloff stimulées pendant seulement 4 heures avec les cellules WEHI 164 avec le TPA et l'ionomycine (résultats non présentés). La possibilité que des quantités indétectables de TNF aient été produites après 4 heures de stimulation ne peut être éliminée. Cette faible concentration de TNF serait active lorsque libérée localement c'est-à-dire dans l'espace intercellulaire. Toutefois, cette

possibilité n'expliquerait pas la lyse rapide observée. De plus, tel que montré à la figure 13, la stimulation par l'ionomycine seule (18 heures) était suffisante pour induire la libération de facteurs apparentés au TNF par les cellules Kurloff tandis qu'il n'avait aucun effet sur l'activité lytique des cellules Kurloff contre les cellules WEHI 164 dans l'essai de 4 heures (voir figure 12). Ces résultats suggèrent un mécanisme différent dans l'essai de 4 heures et 18 heures impliquant possiblement d'autres médiateurs que le TNF. Cette affirmation est supportée par le fait que les cellules Kurloff peuvent aussi médier une activité cytotoxique contre les cellules cibles murines YAC-1 sensibles à l'activité NK (figure 1) et que cette lignée cellulaire est résistante au TNF α (ORTALDO et coll.,1986).

Nous avons mentionné précédemment que le monensin pouvait inhiber l'activité cytolytique des cellules NK en bloquant le processus de dégranulation des facteurs cytotoxiques (NKCF, sérine estérases, perforine). Lorsque testé sur l'activité lytique des cellules cibles WEHI 164, le monensin a démontré un effet inhibiteur plus important dans l'essai de cytotoxicité de 4 heures que dans celui de 18 heures (40% vs 20%). Ces résultats suggèrent que l'exocytose de facteurs cytotoxiques est responsable en plus grande partie de la lyse initiale observée dans l'essai de 4 heures que de la lyse subséquente se produisant dans la phase tardive de l'essai de 18 heures. Toutefois, il est possible que cette différence s'explique par l'action du monensin sur d'autres composantes du métabolisme

cellulaire, et ces résultats doivent être interprétés avec vigilance. Par exemple, il a été démontré que le monensin, un ionophore plus spécifique du Na^+ (PINKERTON et coll., 1970; CUSSLER et coll., 1971) peut interférer avec l'équilibre Na^+/K^+ de la cellule (PRESSMAN, 1976). L'effet du monensin sur la sécrétion de TNF par les cellules Kurloff n'a pu être déterminé mais des études sur les monocytes humains sont présentement en cours dans notre laboratoire.

Les cellules NK peuvent produire du $\text{TNF}\alpha$ et il a été démontré que l'activité cytotoxique des NKCF présents dans les surnageants de cellules NK stimulées est médiée partiellement par le $\text{TNF}\alpha$ (DEGLIANTONI et coll., 1985; WRIGHT et BONAVIDA, 1987). La façon dont les multiples facteurs cytotoxiques des cellules NK agissent pour médier la cytotoxicité contre les cellules tumorales demeure encore incertaine et plusieurs hypothèses ont été élaborées à ce sujet. Il a été proposé que les sérine estérases soient impliquées dans les étapes précoces de l'activation de la lyse des cellules NK en activant ou en libérant d'autres facteurs cytotoxiques et/ou dans la phase tardive de la lyse des cellules cibles en agissant en synergie avec les NKCF (ORTALDO et coll., 1985; GOLDFARD, 1985). Des évidences ont aussi été accumulées concernant les interactions possibles entre le $\text{TNF}\alpha$ et les sérine estérases dans la cytotoxicité à médiation cellulaire. Le $\text{TNF}\alpha$ produit par les monocytes/macrophages peut exister sous plusieurs formes; une forme sécrétée de 17 kd et une molécule transmembranaire de 26 kd (VILCEK et LEE, 1991). L'existence d'une molécule de 17 kd attachée à son récepteur a

aussi été rapportée (LUETTIG et coll., 1989). La forme sécrétée de 17 kd est dérivée de la molécule de TNF α transmembranaire par clivage protéolytique (KRIEGLER et coll., 1988) impliquant possiblement des sérine protéases (SCUDERI, 1989). Les travaux de SUFFYS et coll. (1988) suggèrent aussi un rôle des sérine estérases dans l'étape tardive de la cytotoxicité médiée par le TNF (après son internalisation et sa dégradation). Des évidences que toutes ces formes de TNF α puissent participer à la lyse des cellules tumorales soit par relâchement local de la molécule de 17 kd ou par contact cellule à cellule impliquant le TNF α lié à la membrane ont été documentées (SUFFYS et coll., 1988; KRIEGLER et coll., 1988; SCUDERI et coll., 1989; LUETTIG et coll., 1989; PEREZ et coll., 1990; VILCEK et LEE, 1991). Nos travaux ont démontré que les cellules Kurloff pouvaient produire des sérine estérases (voir tableau 3) et il sera donc intéressant dans les travaux futurs de préciser leur rôle dans la cytotoxicité des cellules Kurloff contre les cellules tumorales TNF-sensibles.

Le fractionnement des surnageants de cellules Kurloff a révélé que l'activité cytotoxique des surnageants contre les cellules sensibles au TNF, WEHI 164 était prédominante dans la fraction de 30 kd et plus. Nos résultats sont compatibles avec ceux de ZACHARCHUK et coll. (1983) et de TAMATANI et coll. (1989) qui ont purifié le TNF α produit par les macrophages de cobaye et ont évalué son poids moléculaire à 45 kd par filtration sur gel. Au cours de notre étude, nous avons tenté de déterminer le poids moléculaire précis du facteur cytotoxique TNF-

like produit par les cellules Kurloff par analyse par buvardage Western. Malheureusement, nos résultats n'étaient pas concluants (résultats non présentés). Pour ces essais, nous avons utilisé des anticorps non neutralisants anti-TNF α de souris puisque les anti-TNF α de cobaye ne sont pas disponibles. Il est possible que cet échec soit dû à une spécificité d'espèce entre le TNF α de cobaye et le TNF α de souris. Toutefois, la comparaison de la séquence d'acides aminés entre le TNF α de souris et de cobaye par TAMATANI et coll. (1989) a révélée une homologie de 76% dans les 21 résidus NH₂-terminaux.

Une étude est présentement en cours dans notre laboratoire dans le but de détecter l'ARN messenger du TNF α chez les cellules Kurloff par analyse par buvardage Northern.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette études suggèrent fortement que les cellules Kurloff sont capables de médier une activité cytotoxique de type NK de même qu'une activité cytotoxique de type NC selon la cellule cible utilisée. Nos résultats sont en accord avec ceux de RICHARDS et coll. (1989) et RICHARDS et DJEU (1990) qui ont caractérisé un clone de cellules NC contre les cellules sensibles au TNF, WEHI 164. La possibilité que l'activité NK et NC observée avec les cellules Kurloff soit médiée par des sous-populations cellulaires distinctes ne peut être éliminée. Cependant, nos préparations cellulaires contenaient toujours au delà de 95% de cellules possédant un grand corps

d'inclusion cytoplasmique caractéristique des cellules Kurloff et ne pouvaient donc pas être distinguées par leur morphologie. La caractérisation des récepteurs de surface des cellules Kurloff à l'aide d'anticorps monoclonaux fait présentement l'objet d'études dans notre laboratoire et nous aidera à clarifier cette question.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le Dr. M. Rola-Pleszczyński pour avoir contribué de façon exceptionnelle à ma formation scientifique de par ses conseils judicieux. Je tiens à le remercier tout particulièrement de la confiance qu'il m'a accordée au cours de ces 2 années.

J'aimerais également remercier le Dr. P. Sirois et le Dr. J. Stankova, qui ont participé à ce projet, et qui m'ont aussi guidé dans mes recherches.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire d'immunologie et plus particulièrement, Diane Bolduc, Louise Bouvrette, Carole Jacques et Denis Gingras pour leur support aussi bien professionnel que moral. De ces personnes, que je considère des amis personnels, je garde un souvenir précieux.

Je voudrais aussi remercier Karim Maghni, un ami et confrère de travail, qui, de par son dynamisme et son enthousiasme, a été une source de motivation constante lors de mes travaux de recherche.

Pour avoir bien voulu évaluer ce travail, je remercie également les Drs. Pierre Sirois et Daniel Ménard.

Enfin, j'aimerais remercier Nathalie Perron, qui a participé à la préparation de ce manuscrit, et Nathalie Bissonnette, deux amies très chères qui ont rendu mon séjour à l'Université de Sherbrooke des plus agréables.

BIBLIOGRAPHIE

ALEXEIEFF, A.-A. et N. JOUKOFF (1928a). Recherches expérimentales sur les corps de Kurloff. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 98: 34-36.

ALEXEIEFF, A.-A. et N. JOUKOFF (1928b). Recherches expérimentales sur les corps de Kurloff. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 98: 446-448.

ALTMAN A. et H. RAPP (1978). Natural cell-mediated cytotoxicity in guinea pigs: properties and specificity of natural killer cells. *J. Immunol.* 121: 2244-2252.

ATKINSON E.A., GERRARD, J.M., HILDES, E. et H. GREENBERG. (1990). Studies of the mechanism of natural killer (NK) degranulation and cytotoxicity. *J. Leuk. Biol.* 47: 39-38.

AVILA J.L. et J. CONVIT. (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. J.* 162: 57-64.

BIMES, C., GUILHEM, A., IZARD, J. et PONTONNIER, A.M.F. (1964). Origine des lymphocytes à corps de Foà-Kurloff. *Bull. Ass. Anat. (Nancy)*, 49: 299-303.

BOLHUIS, R.L.H., VANDE GRIEND, R.J. et C.P.M. RONTELTAP. (1983/84). Clonal expansion of human B73.1 positive natural killer cells or large granular lymphocytes exerting strong antibody-dependent and independent cytotoxicity and occasionally lectin-dependent cytotoxicity. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 3: 61-72.

BONAVIDA, B., ROBINS, A. et A. SAXON. (1977). Lectin-dependent cellular cytotoxicity in man. *Transplantation.* 23: 261-270.

BOYDE, A., WEISS, R.A. et P. VESELY. (1972). Scanning electron microscopy of cells in culture. *Exp. Cell Res.* 71: 313-324.

BROGAN, M et S. TARGAN. (1986). Evidence for involvement of serine esterases in the late stages of natural killer cell lytic reaction. *Cell. Immunol.* 103: 426-433.

BUAT M.-L., LANDERMORE, G. et J. IZARD. (1988). Cytochemical localization of arylsulfatase in guinea-pig Kurloff cells. *Acta Histochem.* 84: 211-215.

BURKHARDT, J.K., HESTER, S. et Y. ARGON. (1989). Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc, Natl. Acad. Sci.* 86: 7128-7132.

CARPEN, O. VIRTANEN, I. et E. SAKSELA. (1982). Ultrastructure of human natural killer cell: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. *J. Immunol.* 128: 2691-2697.

CARPEN, O., VRTANEN, I., et E. SAKSELA. (1981). The cytotoxic activity of human natural killer cells requires an intact secretory apparatus. *Cell. Immunol.* 58: 97-106.

CARPEN, O. et E. SAKSELA. (1988). Directed exocytosis in the NK-Cell-mediated cytotoxicity. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 7: 1-12.

CASTAGNA, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SANO, K., KIKKAWA, U. et Y. NISHIZUKA. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.

CHOW, S.C., NG, J., NORDSTEDT, C., FREDHOLM, B.B. et M. JONDAL. (1988). Phosphoinositide breakdown and evidence for proteine kinase C involvement during human NK killing. *Cell. Immunol.* 114: 96-103.

COLOTTA, F., PERI, G., VILLA, A. et A. MANTOVANI. (1984). Rapid killing of actinomycin-D treated tumor cells by human mononuclear cells. I. Effectors belong to the monocyte-macrophage lineage. *J. Immunol.* 132: 936-944.

CUSSLER, E.L., EVANS, D.F. et S.M.A. MATESICH. (1971). Theoretical and experimental basis for a specific countertransport system in membranes. *Science.* 172: 377-379.

CUTURI, M.C., MURPHY, M., COSTA-GIOMI, M.P. WIENMANN, R., PERUSSIA, B., et G. TRINCHIERI. (1987). Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1581-1594.

DEALTRY, G.B., NAYLOR, M.S., FIERS, W. et F.R. BALKWILL. (1987). DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* 17:689-693.

DEAN M.F. et H. MUIR. (1970). The characterization of a protein-polysaccharide isolated from Kurloff cells of guinea pig. *Biochem. J.* 118: 783-790.

DEAN, M.F. et H. MUIR. (1971). Proteoglycans from sheep, pig, rat and human spleens having chemical and biological resemblances to that in Kurloff cells. *Febs Letters* 16: 183-185.

DEAN, M.F. et H. MUIR. (1975). Separation of a proteoglycan fraction from Kurloff cells stimulating protein synthesis in macrophages. *Biochem. J.* 146: 557-563.

DEBOUT C., QUILLEC, M. et J. IZARD. (1984). Natural killer activity of Kurloff cells: A direct demonstration on purified Kurloff cell suspensions. *Cell. Immunol.* 87: 674-677.

DE E. DE BRACCO, M.M., ISTURIZ, M.A. et J.A. MANNI. (1976). Cell-mediated cytotoxicity; Characterization of the effector cells. *Immunology*, 30: 325-333.

DEGLIANTONI, G., MURPHY, M., KOBAYASHI, M., FRANCIS, M.K., PERUSSIA, B. et G. TRINCHIERI. (1985). Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J. Exp. Med.* 162: 1512-1530.

DJEU, J.Y., LANZA, E., PASTORE, S. et A. J. HAPPEL. (1983). Selective growth of natural cytotoxic but not natural killer effector cells in interleukin-3. *Nature*. 306: 22-29.

EDWARDS, B.S., NOLLA, H.A. et R.R. HOFFMAN. (1989). Relationship between target cell recognition and temporal fluctuations in intracellular Ca^{2+} of human NK cells. *J. Immunol.* 143: 1058-1065.

EREMIN, O., COOMBS, R.R.A., ASHBY, J. et D. PLUMB. (1980). Natural cytotoxicity in the guinea-pig: the natural killer (NK) cell activity of the Kurloff cell. *Immunology*. 41: 367-378.

EREMIN, O., WILSON, A.B., COOMBS, R.R.A., ASHBY, J. et D. PLUMB. (1980). Antibody-dependent cellular cytotoxicity in the guinea-pig: The role of Kurloff cell. *Cell. Immunol.* 55:312-327.

ERNSTROM, U. et G. SANDBERG. (1971). On the origin of oà-Kurloff cells. *Scand.J.Haematol.* 8: 380-391.

FITZGERALD, P.A., EVANS, R., KIRKPATRICK, D. et C. LOPEZ. (1983). Heterogeneity of human NK cells: comparison of effectors that lyse HSV-1 infected fibroblast and K562 erythroleukemia targets. *J. Immunol.* 130: 1663-1667.

FITZGERALD, K.M., LONGMUIR, K.J., YAMAMOTO, R.S., FITZGERALD, T.P. et G.A. GRANGER. (1990). Mechanism of human lymphotoxin and tumor necrosis factor induced destruction of cells in vitro: phospholipase activation and deacylation of specific membrane phospholipids. *J. Cell. Physiol.* 142: 469-479.

FLICK, D.A. et G.E. GIFFORD. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Meth.* 68: 167-175.

FOA, P.U. et T. CARBONE. (1889). Beitrage zur histologie und physiopathologie der milz der saugethiere. *Beitr. Path. Anat.* 5: 227-252.

FREY, T., PETTY, H. et H.M. McCONNEL. (1982). Electron microscopic study of natural killer cell-tumor cell conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 5317-5321.

GATELY, M. et E. MARTZ. (1979). Early steps in specific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes. III. Resolution of two distinct roles for calcium in the cytolytic process. *J. Immunol.* 122: 482-489.

GOLDFARB, R.H. (1985). Role of proteases in NK activity. Dans mechanisms of cytotoxicity by NK cells. (Herberman, R.V. and Callewaert, D.M. Eds.) Academic Press Inc. p.205-212.

HALLER, O., KIESSLING, R., ORN, A. et H. WIGTZELL. (1977). Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow. *J. Exp. Med.* 145: 1411-1416.

HANNA, N. et C. BURTON. (1981). Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.* 127: 1754-1758.

HANNA N. et M. SCHNEIDER. (1983). Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by β -estradiol treatment. *J. Immunol.* 130: 974-980.

HARRISON, C.J. et M.G. MYERS. (1988). Peripheral blood mononuclear cell-mediated cytolytic activity during cytomegalovirus (CMV) infection of guinea pig. *J. Med. Virol.* 25: 441-453.

HASDAY, J.D., SHAH, E.M. et A.P. LIEBERMAN. (1990). Macrophage tumor necrosis factor- α release is induced by contact with some tumors. *J. Immunol.* 145: 371:179.

HEINLE, R.W. et D.K. HEYDINGER. (1944). Filtering action of the guinea pig spleen for Foà-Kurloff cells. *J. Clin. Invest.* 23: 942.

HENKART, P.A., LEWIS, J.T. et J.R. ORTALDO. (1986) Preparation of target antigens specifically recognized by human natural killer. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 5: 113-126.

HERBERMAN, R.B., DJEU, J.Y., KAY, H.D., ORTALDO, J.R., RICCARDI, C., BONNARD, G.D., TOLDEN, H.T., FAGNANI, R., SANTONI, A. et P. PUCETTI. (1979). Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* 44: 43-65.

HERBERMAN R.B. et H.T. HOLDEN (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv. in cancer Res.* 27: 305-377.

HERBERMAN R.B., NUNN, M.E. et D.H. LAVRIN. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogenic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 16: 216-229.

HERBERMAN R.B. et J.R. ORTALDO. (1981). Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science.* 214: 24-30.

HIDAKA, H., INAGAKI, M., KAWAMOTO, S. et Y. SASAKI. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry.* 23: 5036-5041.

HISERODT, J.C., BRITVAN, L.J. et S.T. TARGAN. (1982). Characterization of the cytotoxic reaction mechanism of the human natural killer (NK) lymphocyte: Resolution into binding, programming, and killer cell-independent steps. *J.Immunol.* 129: 1782-1787.

IZARD, J., BARRELIER, M.T. et M. QUILLEC. (1976). The Kurloff cell; Its differentiation in the blood and lymphatic system. *Cell. Tiss. Res.* 173: 237-259.

KANEDA, K. et K. WAKE. (1990). Ultrastructural study of in vivo tumor cell lysis by liver-associated natural killer cells. *Biomed. Res.* 11: 137-143.

KIESSLING, R., KLEIN, E et H. WIGZELL. (1975). Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5: 112-117.

KITTAS, C., PARSONS, M.A. et L. HENRY. (1979). A light and electron microscope study on the origin of Foà-Kurloff cells. *Br. J. exp. Path.* 60: 276-285.

KRIEGLER, M., PEREZ, C., DeFAY, K., ALBERT, I. et S.D. SU. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53: 45-53.

KURLOFF, M.G. (1889). Blood cells in splenectomized animals after one year of life. *VRACH.* 10: 515-518.

LANDEMORE, G., BUAT, M.-L., et J. IZARD. (1987). Zymograms of Kurloff cell acid phosphatases. Thin layer isoelectric focusing and native polyacrylamide 4-15% gradient gel electrophoresis. *Biol. Cell.* 59: 97-100.

LANDEMORE, G. DARBON, J.-M., IZARD, J., BAYARD, F. et J.-C. FAYET. (1988). Presence of low affinity estrogen binding sites in guinea-pig Kurloff cells. *J. steroid Biochem.* 31: 57-60.

LANDEMORE, G., DEBOUT, C., QUILLEC, M. et J. IZARD. (1984). Isolation of Kurloff cells by Percoll density gradient centrifugation. Protein labeling with ³⁵S-methionine of these cells. *Biol. Cell.* 50: 121-126.

LANDEMORE, G., LETAIEF, S.-E., BOCQUET, J. et J. IZARD. (1986). Kurloff cell proteoglycans, Evidence for de novo synthesis of chondroitin sulfate proteoglycans by purified Kurloff cells. *Febs.* 209: 299-304.

LANDEMORE, G., QUILLEC, M., DEBOUT, C. et J. IZARD. (1983). Scanning electron microscopy of pure Kurloff cell suspensions. *Cell. Tis. Res.* 231: 457-461.

LEDINGHAM, J.C.G. (1906). On the vacuolated mononuclear cells in the blood of the guinea-pig. *The Lancet.* 1; 1675.

LEDINGHAM, J.C.G. (1940). Sex hormones and the Foà-Kurloff cell. *J. Path. Bacteriol.* 50: 210-219.

LENDRUM, A.C. (1952). Distribution of Kurloff bodies in the viscera of female guinea-pigs. *J. Path. Bact.* 64: 250.

LETAIEF, S.-E., LANDEMORE, G., BOCQUET, J. et J. IZARD. (1989). Kurloff cell proteoglycans: presence of two main size-populations of intracellular protease-resistant proteochondroitin sulphate. Effect of D-xyloside. *Biol. Cell.* 65: 257-263.

LIS, H. et N. SHARON. (1973). The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.* 42: 541-574.

LIU, C.-M. et T.E. HERMANN. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* 253: 5892-5894.

LUETTIG, B., DECKER, T. et M.L. LOHMANN-MATTHES. (1989). Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J. Immunol.* 143: 4034-4038.

LUM, L.G. (1987). The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood.* 69: 369-380.

MacDERMOTT, R.P., SCHMIDT, R.E., CAULFIELD, J.P., HEIN, A., BARTLEY, G.T., RITZ, J., SCHLOSSMAN, S.F., AUSTEN, K.F. et R.L. STEVENS. (1985). *J. Exp. Med.* 162: 1771-1787.

MAGHNI, K., ROBIDOUX, C., LAPORTE, J., HALLÉE, A., BORGEAT, P. et P. SIROIS. (1991). Purification of natural killer-like Kurloff cells and arachidonic acid metabolism. *Prostaglandines*, 42: 251-267.

MARSHALL, A.H.E. et K.V. SWETTENHAM. (1969). The formation of a mucoprotein-sulfated mucopolysaccharide complex in the lymphoid tissue of the pregnant guinea-pig. *J. Anat.* 93: 348-353.

MARSHALL, A.H.E., SWETTENHAM, K.V. et B. VERNON-ROBERTS. (1970) The function of the Kurloff cell and its possible relation to immunological status of the guinea pig placenta. *J. Anat.* 106: 414-415.

MARSHALL, A.H.E., SWETTENHAM, K.V., VERNON-ROBERTS, B. et P.A. REVELL. (1971). Studies on the function of the Kurloff cell. *Int. Arch. Allergy.* 40: 137-152.

MASERA, R., GATTI, G., SARTORI, M.L., CARIGNOLA, R., SALVADORI, A., MAGRO, E. et A. ANGELI. (1989). Involvement of Ca^{2+} -dependent pathways in the inhibition of human natural killer (NK) cell by cortisol. *Immunopharmacol.* 18: 11-22.

MASSON, D., PETERS, P.J., GEUZE, H.J., BORST, J. et J. TSCHOPP. (1990). Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry.* 29: 11229-11235.

MUIR, H. et A.H.E. MARSHALL. (1961). Chemistry of a mucopolysaccharide produced by guinea pig lymphocytes. *Nature.* 191: 706.

NG, J., FREDHOLM, B.B. et M. JONDAL. (1987) Studies on the calcium dependence of human NK cell killing. *Biochem. Pharmacol.* 36: 3943-3949.

NEIGHBOUR, P.A., HUBERMAN, H.S. et Y. KRESS. (1982). Human large granular lymphocytes and natural killing: ultrastructural studies of stontium-induced degranulation. *Eur. J. Immunol.* 12: 588-595.

NELSON, D.L., BUNDY, B.M., WEST, T.D. et W. STONBER. (1976). The nature of the effector cells mediating mitogen-induced cellular cytotoxicity (MICC) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Cell. Immunol.* 23: 89-98.

NOGA, S.J., NORMANN, J. et R. S. WEINWR. (1984). Methods in laboratory investigation. Isolation of guinea-pig monocytes and Kurloff cells: Characterization of monocyte subsets by morphology, cytochemistry and adherence. *Lab. Invest.* 51: 244-251.

ORTALDO, J.R., BLANCA, I. et R.B. HERBERMAN. (1985). Characteristics of human natural killer cytotoxic factor (NKCF) lysis and possible relationship to lysis by NK cells. Dans mechanisms of cytotoxicity by NK cells (Herberman, R.B. and Callewart, D.M. Eds. Academic Press inc. p.335-350.

ORTALDO, J.R., MASSON, L.H., MATHIESON, B.J., LIANG, S.-M., FLICK, D.A. et R.B. HERBERMAN. (1986). Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature*. 321: 700-702.

ORTALDO, J.R., YOUNG, H.A. et L. VAREGIO. (1989). Modulation of CD3⁺ large granular lymphocyte functions by agonist and antagonists of protein kinase C: Effects on NK and lymphokine-activated killer activity and production of TNF- α . *J. Immunol*. 143: 366-371.

OSTERGAARD, H.L. et W.R. CLARCK. (1989). Evidence for multiple lytic pathways used by cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol*. 143: 2120-2126.

PAIGE, C.J. FEO FIAGARELLA, E., CUTTITO, M.J., CAHAN, A. et O. STUTMAN. (1978). Natural cytotoxic cells against solid tumor in mice. II. Some characteristics of the effector cells. *J. Immunol*. 121: 1827-1835.

PARMLEY R.T., EGUCHI, M. et S.S. SPICER. (1979). Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in leucocyte granules. *J. Histochem. cytochem*. 27: 1167-1170.

PARMLEY, R.Y., RAHEMTULLA, F., COOPER, M.D et L. RODEN. (1985). Ultrastructural and biochemical characterization of glycosaminoglycans in HNK-1-Positive large granular lymphocytes. *Blood*. 66: 20-25.

PARR, L.E., YOUNG, L.H.Y., PARR, M.B. et J.D.-E. YOUNG. (1990). Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol*. 145: 2365-2372.

PATEK, P.Q., LIN, Y. et J.L. COLLINS. (1987). Natural cytotoxic cells and tumor necrosis factor activate similar lytic mechanism. *J. Immunol.* 138: 1641-1646.

PELE, J.P., ROBIDOUX, C. et P. SIROIS. (1989). Guinea pig lung cells; Method of isolation and partial purification, identification ultrastructure and cell count. *Inflammation.* 13: 103-123.

PENNICA, D., NEDWIN, G.E., HAYFLICK, J.S., SEEBURG, P.H., DERYNCK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWAL, B.B. et D.V. GOEDDEL. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 312: 724-729.

PEREZ, C., ALBERT, I., DeFAY, K., ZACHARIADES, N., GOODING, L. et M. KRIEGLER. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63: 251-258.

PINKERTON, M. et L.K. STEINRAUF. (1970). Molecular structure of monovalent metal cation complexes of monensin. *J. Mol. Biol.* 49: 533-546.

PLAUT, M., BUBBERS, J.E et C.S. HENNEY. (1976). Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. VII. Two stages in the T cell-mediated lytic cycle with distinct cation requirements. *J. Immunol.* 116: 150-155.

PRESSMAN, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 501-530.

PUCETTI, P., SANTONI, A., RICCARDI, C. et R.B. HERBERMAN. (1980). Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. *Int. J. Cancer.* 25: 153-158.

QUAN, P.-C., ISHIZATA, T. et B.R. BLOOM. (1982). Studies of the mechanism of NK cell Lysis. *J. Immunol.* 128: 1786-1791.

RANLOV, P., CHRISTENSEN, H.E. et J. WANSTRUP.(1970). Effects of thymectomy upon the formation of Foa-Kurloff cells in the Guinea pig. *Acta path.*

microbiol. scand. 78: 330-332.

REVELL, P.A. (1977). The Kurloff cell. *Int. Rev. Cytol.* 51: 275-314.

REVELL, P.A., DEAN, M.F., VERNON-ROBERTS, B., MUIR, H. et A.H.E. MARSHALL (1972). Inhibition of macrophage migration by a proteoglycan extracted from Kurloff cells of the Guinea-pig. *Int. Arch. Allergy.* 43: 813-825.

REVELL, P.A., VERNON-ROBERTS, B. et A. GRAY. (1971). The distribution and ultrastructure of the Kurloff cell in the Guinea-pig. *J. Anat.* 109: 187-199.

RICHARDS, A.L., DENNERT, G., PLUZNICK, D.V., TAKAGAKI, Y. et J.Y. DJEU. (1989). Natural cytotoxic activity in a cloned natural killer cell line is mediated by tumor necrosis factor. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 8: 76-88.

RICHARDS, A.L. et J.Y. DJEU. (1990). Calcium-dependant natural killer and calcium independant natural cytotoxic activities in an IL-2-dependent killer cell line. *J.Immunol.* 145: 3144-3149.

RODER, J.C., KIESSLING, R., BIBERFIELD, P. et B. ANDERSON. (1978) Target-effector interaction in the natural killer (NK) cell system. II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing. *J. Immunol.* 121: 2509-2517.

RODER, C.J. et H.F. FROSS. (1982). The biology of the human natural killer cell. *J. Clin. Immunol.* 2: 249-256.

ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (1980). In vitro induction of human cell-mediated cytotoxicity directed against herpes simplex virus-infected cells: characterization of the effector lymphocyte. *J. Immunol.* 125: 1475-1480.

ROONEY, C.M., WIMPERIS, J.Z., BRENNER, M.K., PATTERSON, J., HOFFBRAND, A.V. et H.G. PRENTICE. (1986). Natural killer cell activity following T-cell depleted allogenic bone marrow transplantation. *Br. J. Hematol.* 62: 413-420.

ROSS, E.H. (1912). The developpment of a leucocytozoon of Guinea-pigs. Proc. Roy. Soc. 85: 67-73.

RUBIN, B.Y., SMITH, L.J., HELLERMENN, G.R., LUNN, R.M., RICHARSON, N.K. et S.L. ANDERSON. (1988). Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activities of tumor necrosis factor. Cancer Res. 48: 6006-6010.

RUTH, R.F., ALLEN. C.P. et H.R. WOLFE. (1964). The effect of thymus on lymphoid tissue. Dans The thymus in immunobiology. R.A. Good et A.E. Gabrielsen (eds), Harper and Row, NY, pp. 183-205.

SANDBERG, G. et M. HAGELIN. (1986). Kinetic study of Kurloff cells in Guinea pig thymus. Int. Arch. Allergy. 80: 267-273.

SASHCHENKO, L.P., GNUCHEV, N.V., KIRILLOVA, M.A., LUKJANOVA, T.I., REBIZOVA, T.V., REVAZOVA, E.S. et E.M. LUKANIDIN. (1988). Separation of the pore-forming and cytotoxic activities from natural killer cell cytotoxic factor. FEBS LETT. 226: 261-264.

SCHMIDT, R.R., MacDERMOTT, R.P., BARTLEY, G., BERTOVICH, M., AMATO, D.A., AUSTEN, K.A., SCHLOSSMAN, S.F., STEVENS, R.L. et J. RITZ. (1985). Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis. Nature. 318: 289-291.

SCREPANTI, I., SANTONI, A., GULINO, A., HERBERMAN, R.B. et L. FRATI. (1987). Estrogen and antiestrogen modulation of the levels of mouse natural killer activity and large granular lymphocytes. Cell. Immunol. 106: 191-202.

SCUDERI, P. (1989). Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-l-arginine methyl ester (tame). J. Immunol. 143: 168-173.

SEAMAN, W.E., BLACKMAN, M.A., GINHART, T.D., ROUBINIAN, J.R., LOEB, J.L. et N. TALAL. (1978). β -estradiol reduces natural killer cells in mice. J. Immunol. 121: 2193-2198.

SETTE A., ADORINI, L., MARUBINI, E. et G. DORIA (1986). A microcomputer program for probit analysis of interleukin-2 (IL-2) titration data. *J. Immunol. Met.* 86: 265-277.

SEWELL, H.F., STEWART, L.S., McPHEE, C.A., MATHIE, I.H. et A.W. THOMPSON. (1988). Enhanced production and immunophenotypic analysis of Kurloff cells in immunized Guinea pigs treated with cyclophosphamide et cyclosporine A: Correlation with increased large granular lymphocyte production in the rat. *Transplantation Proc.* 20: 196-201.

STEELE, T.A. et Z. BRAHNI. (1988). Inhibition of human natural killer cell activity by the protein kinase C inhibitor 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine is an early but post-binding event. *J. Immunol.* 141: 3164-3169.

STUTMAN, O., PAIGE, C.J. et E.F. FIGARELLA. (1978). Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. I. Strain and age distribution and target cell susceptibility. *J. Immunol.* 121: 1819-1826.

STUTMAN O, DIEN, P., WISUN, R.E., et E.C. LATTIME. (1980). Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice: blocking of cytotoxicity by D-mannose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 2895-2989.

SUFFYS, P., BEYAERT, R., VAN ROY, F. et W. FIERS. (1988). Involvement of a serine protease in tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 178: 257-265.

TAKASUGI, M., MICKEY, M.R. et P.I. TERASAKI. (1973). Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33: 2898-2902.

TAKAYAMA, H. et M.V. SITKOVSKY. (1987). Antigen receptor-regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 166: 725-743.

TAMATANI, T., KIMURA, S., HASHIMOTO, T. et K. ONOZAKI. (1989). Purification of Guinea pig tumor necrosis factor (TNF): comparison of its antiproliferative and differentiative activities for myeloid leukemia cell lines with

those of recombinant human TNF. *J. Biochem.* 105: 55-60.

TIMONON, T., ORTALDON, J.R. et R.B. HERBERMAN. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med.* 153: 569-582.

TIMONEN, T., ORTALDO, J.R. et R.B. HERBERMAN. (1982). Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J. Immunol.* 128: 2514-2521.

TIMONEN, T., RANKI, A., SAKSELA, E. et P. HAYRY. (1979). Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. *Cell. Immunol.* 48: 121-132.

THOMPSON, A.W., McPHEE, C.A. et H.F. SEWELL. (1988) Increased production of Kurloff cells and accompanying lymphocyte subset changes in immunized Guinea-pigs treated with cyclophosphamide and cyclosporin A. *Immunology.* 63: 477-482.

TIFFON, Y, BUAT, M.-L., LANDEMORE, G. et J. IZARD. (1986). Cytochemical localization of acid phosphatase and trimetaphosphatase in Kurloff cells. *Biol. Cell.* 56: 85-87.

TORIBIO, M.L., DE LANDAZURI, M.O. et M. LOPEZ-BOTET. (1983). Induction of natural killer-like cytotoxicity in cultured human thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 13: 964-969.

TORTEN, M., SIDELL, N. et S. H. GOLUB. (1982). Interleukin 2 and stimulator lymphoblastoid cells will induce human thymocytes to bind and kill K562 targets. *J. Exp. Med.* 156: 1545-1550.

TRINCHIERI, G. (1989). Biology of natural cells. *Adv. Immunol.* 47: 187-342.

VILCEK, J. et T.H. LEE. (1991). Tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 266: 7313-7316.

WADA, H. (1928). Studien über die Kurloffshen Körperchen. *Z. Ges. Exp. Med.* 62: 542-546.

WELSH, R.A. (1966). Kurloff body formation in the Guinea pig lymphocyte. *J. Ultrastructure Res.* 14: 556-570.

WILSON, A.B. et R.R.A. COOMBS. (1971). Passive sensitization of tissue cells. IV. Guinea-pig antibodies cytophilic for basophils and Kurloff cells. *Int. Arch. Allergy.* 40: 19-46.

WILSON, A.B. et R.R.A. COOMBS. (1973). Rosette-formation between Guinea pig lymphoid cell and rabbit erythrocytes - a possible T-cell marker. *Int. Arch. Allergy.* 44: 544-552.

WILTROUT, R.H., MASON, L.H., MATHIESON, B.J., LIANG, S.-M. FLICK, D.A. et R.B. HERBERMAN. (1982). Variation in selectivity of tumor cell cytolysis by murine macrophages, macrophage-like cell lines and NK cells. *Int. J. Cancer.* 30:335-342.

WISLOFF, F., FROLAND, S.S. et T.E. MICAELSEN.(1974). Characterization of subpopulations of human lymphoid cells participating in phytohemagglutinin and concanavalin A-induced cytotoxicity. *Int. Arch. Allergy.* 47: 488-497.

WOODCOCK, H.M. (1921). An introduction to the study of haematophagy. *J. Roy. Arm. Med. Corps.* 37: 321-341.

WRIGHT, S.C. et B. BONAVIDA. (1982). Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factors specific for NK-sensitive target cells (NKCF) during co-culture of NK effector cells with NK target cells. *J. Immunol.* 129: 433-439.

WRIGHT, S.C., et B. BONAVIDA. (1987). Studies on the mechanism of natural

killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functionnal comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin anf tumor necrosis factor. J. Immunol. 138: 1791-1798.

WRIGHT, S.C., WEITZEN, M.L., KAHKE, R., GARNGER, G.A. et B. BONAVIDA. (1983). Studies on the mechanism of natural killer cytotoxicity. II. Coculture of human PBL with NK-sensitive or resistant cell lines stimulates release of natural killer cytotoxic factors (NKCF) selectively cytotoxic to NK-sensitive target cells. J. Immunol. 130: 2479-2483.

YOUNG, J.D-E, et Z.A. COHN. (1987). Cellular and humoral mechanism of cytotoxicity: structural and fonctionnal analogies. Adv. Immunol. 41: 269-321.