PHCbi

LiCellMo™

Note d'application

À des fins de recherche uniquement

Surveillance du changement métabolique des cellules immunitaires au cours de la différenciation

Introduction

Les monocytes et les macrophages jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire naturel de l'organisme. Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse et se déplacent dans l'organisme via le sang, pour se différencier en macrophages et infiltrer les tissus. Les macrophages activés deviennent dépendants de la voie glycolytique pour la production d'énergie, même en présence d'oxygène ; ce profil métabolique, appelé effet Warburg, est une caractéristique reconnue des cellules cancéreuses.[1] L'effet Warburg a fait l'objet de nombreuses études dans les cellules immunitaires, mais il semble qu'il serve des objectifs différents dans les cellules cancéreuses et dans les cellules immunitaires. Dans les cellules cancéreuses, l'effet Warburg favorise la survie et la prolifération, alors que dans les cellules immunitaires, il est un signe de vieillissement et de mort cellulaire.[2,-4] Dans les monocytes et autres cellules immunitaires dans lesquelles on peut observer l'effet Warburg, le profil métabolique diffère pour chaque état d'activité immunitaire. Par exemple, les monocytes et les macrophages M2 présentent une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative, tandis que les macrophages M0 et M1 présentent une augmentation de la glycolyse. Par ailleurs, on sait que le micro-environnement et le profil métabolique des macrophages M0 sont impliqués dans le contrôle de la polarisation des macrophages M1 et M2.[5] Cela signifie que l'étude du profil métabolique des cellules immunitaires peut permettre de tirer des conclusions sur leur état de différenciation.[6,7] Dans cette étude, on a procédé à un suivi chronologique des changements métaboliques dans les cellules THP-1, une lignée cellulaire de monocytes, lorsqu'elles se sont différenciées en macrophages M0 à la suite d'une exposition au PMA.

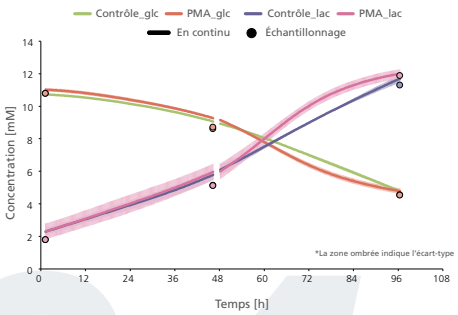
Matériels et méthodes

On a utilisé des cellules THP-1 (JCRB0112.1, obtenues auprès de la Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank : JCRB), une lignée cellulaire de leucémie monocytaire aiguë. La culture a été réalisée dans un milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de SVF pendant 96 heures, au cours desquelles on a mesuré en continu les concentrations en glucose et en lactate dans le milieu de culture à l'aide d'un analyseur métabolique de cellules vivantes. Les mesures en continu ont commencé immédiatement après l'ensemencement des cellules et le PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate) a été ajouté à une concentration finale de 10 ng/mL (0,001 % de DMSO) 48 heures après l'ensemencement. Dans le groupe de contrôle, le véhicule seul (0,001% de DMSO) a été ajouté. Le milieu de culture a fait l'objet d'un prélèvement pour mesurer les concentrations en glucose et en lactate au moment de l'ajout du réactif et à la fin de la culture. Par ailleurs, on a examiné la morphologie des cellules à l'aide d'un microscope à contraste de phase, et mesuré le niveau d'expression de CD11b à la surface des cellules à l'aide de la cytométrie de flux.

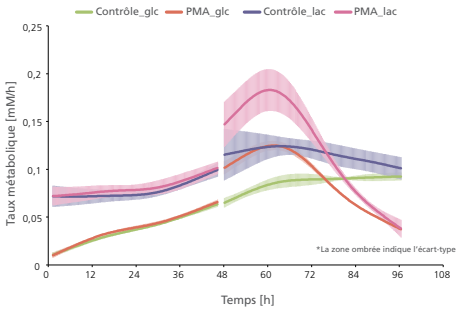
Résultats

En premier lieu, on a vérifié la précision des valeurs mesurées par l'analyseur métabolique des cellules vivantes en comparant les valeurs de l'analyseur pour les concentrations en glucose et en lactate dans le milieu de culture au moment de l'ajout du réactif et à la fin de la culture avec les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique. L'écart maximal était de 14 %, ce qui a permis de conclure que les valeurs mesurées par l'analyseur métabolique des cellules vivantes étaient suffisamment précises (Fig. A). On a ensuite calculé le taux de consommation de glucose et le taux de production de lactate à partir des changements continus des concentrations de glucose et de lactate (Fig. B). La comparaison de ces valeurs a montré que le taux de consommation de glucose et le taux de production de lactate augmentaient immédiatement après l'ajout de PMA. Le nombre de cellules à la fin de la culture était plus élevé dans le groupe témoin, ce qui suggère que la consommation de glucose et la production de lactate par cellule ont augmenté à la suite de l'ajout de PMA (Fig. C). Par ailleurs, les images microscopiques ont confirmé que les monocytes, qui sont des cellules non adhérentes, se sont transformés en cellules adhérentes à la suite de l'ajout de PMA (Fig. D). Le niveau d'expression de CD11b, un marqueur des macrophages, à la surface des cellules a été mesuré par cytométrie de flux, et les résultats ont montré que le niveau d'expression de CD11b augmentait suite à l'ajout de PMA (Fig. E). Ces résultats confirment que les monocytes se sont différenciés en macrophages suite à l'ajout de PMA.

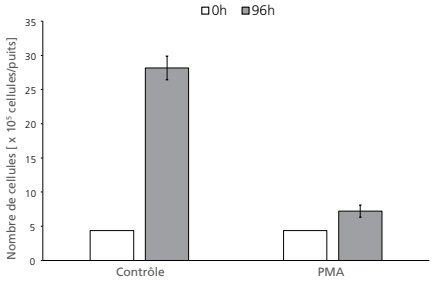
A



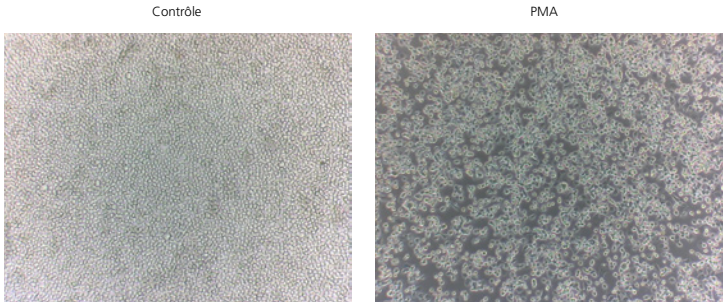
B



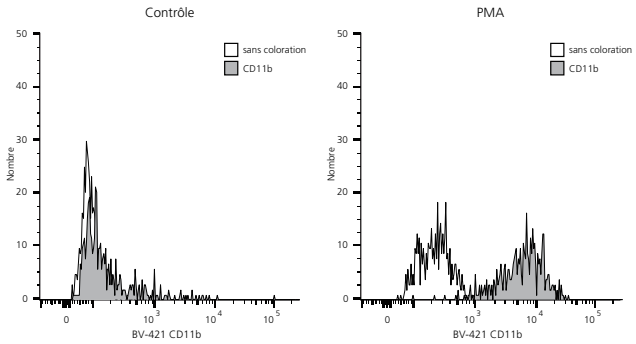
C



D



E



Discussion

La comparaison des taux métaboliques analysés par un analyseur métabolique de cellules vivantes et du nombre de cellules a permis de démontrer que les monocytes, dont l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative sont accrues, présentent une voie glycolytique renforcée lorsqu'ils se différencient en macrophages. Toutefois, à 60 heures de culture, 12 heures après l'ajout de PMA, le taux métabolique des macrophages a commencé à chuter. L'inhibition de la glycolyse et la réduction de la fonction des cellules immunitaires se produisent en réponse à la concentration en lactate de l'environnement cellulaire. Ce phénomène serait l'une des raisons de l'absence de réponse immunitaire dans le micro-environnement tumoral.[8] Par ailleurs, les macrophages M1 cultivés dans un milieu contenant 5 à 20 mM de lactate auraient tendance à réduire l'absorption de glucose.[2] Dans cette expérience, la concentration de lactate avait atteint environ 8 mM au moment où le taux métabolique a commencé à diminuer, ce qui suggère que la suppression de la glycolyse due à l'augmentation de la concentration de lactate dans le milieu s'est reflétée dans la réduction du taux métabolique.

Conclusion

Un analyseur métabolique de cellules vivantes a permis de mesurer chronologiquement le changement métabolique au cours du processus de différenciation des monocytes en macrophages. Le profil métabolique des cellules immunitaires est intimement lié à leur état de différenciation, et l'observation du profil métabolique des cellules immunitaires dans différents états de différenciation, comme dans la présente expérience, contribuera à l'évaluation de la différenciation des cellules immunitaires. L'analyseur métabolique des cellules vivantes mesure les concentrations de glucose et de lactate pendant la culture des cellules, ce qui permet d'observer chronologiquement le changement métabolique au cours du processus de différenciation cellulaire. L'utilisation de cette technique dans des études où les cellules immunitaires sont amenées à se différencier en une grande variété de phénotypes devrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche métabolique.

Références

1. Warburg O. On the origin of cancer. Science. 1956;123(3191):309-314.
2. Dietl K, Renner K, Dettmer K, et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. J Immunol. 2010;184(3):1200-1209.
3. Kempner W. THE NATURE OF LEUKEMIC BLOOD CELLS AS DETERMINED BY THEIR METABOLISM. J Clin Invest. 1939;18 (3):291-300.
4. Nagy C, Haschemi A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. Front Immunol. 2015;6(164):1-8.
5. Cao J, Zeng F, Liao S, Cao L, Zhou Y. Effects of glycolysis on the polarization and function of tumor-associated macrophages (Review). Int J Oncol. 2023;62(70):1-12.
6. Abuawad A, Mbadugha C, Ghaemmaghami AM, Kim DH. Metabolic characterisation of THP-1 macrophage polarisation using LC–MS-based metabolite profiling. Metabolomics. 2020;16(33):1-14.
7. Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, Singh A, Crowe SM. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. EBioMedicine. 2016;6:31-41.
8. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood. 2007;109(9): 3812-3819.

*Les données sont le résultat de la vérification par PHC et ne constituent pas une garantie des données des clients.

PHC Europe
A Member of PHC Group

Eikdonk 1 | 4825 AZ Breda | Netherlands
T: +31 (0) 76 543 3833 | biomedical.nl@eu.phchd.com

www.phchd.com/eu/biomedical

Version : 291124