

50376  
1976

N° d'ordre : 343

21

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376  
1976  
21

**Michel JOSEPH**

**ETUDE DU ROLE DES IMMUNOSTIMULINES  
ENDOGENES ET EXOGENES  
DANS L'IMMUNITE EXPERIMENTALE VIS-A-VIS DE  
SCHISTOSOMA MANSONI**



**JURY : MM. J. MONTREUIL,      Président**  
**J. GUILLAUME,                      Assesseur**  
**L. CHEDID,**  
**H. BAZIN,**                            }  
**A. CAPRON**                            } **Rapporteurs**

**Thèse de Doctorat Es Sciences**

**LILLE 1976**

Thèse soutenue

le 25 février 1976

devant un jury présidé par

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à l'Université Lille I  
Chef de Service à l'Institut de Recherches sur le Cancer  
Chef du Service de Biochimie alimentaire de l'Institut  
Pasteur à Villeneuve d'Ascq

et composé de

Monsieur le Professeur André CAPRON

Professeur d'Immunologie et de Biologie parasitaire  
à l'Université de Lille II  
Sous-directeur de l'Institut Pasteur de Lille  
Directeur du Centre d'Immunologie et de Biologie  
parasitaire de l'Institut Pasteur

Monsieur le Professeur Louis CHEDID

Chef du Service d'Immunothérapie expérimentale à  
l'Institut Pasteur à Paris

Monsieur le Professeur Jean GUILLAUME

Professeur de Microbiologie à l'Université de Lille I  
Chef de Service à l'Institut Pasteur à Lille

Monsieur le Docteur Hervé BAZIN

Chargé de Cours à l'Université de Louvain  
Chargé de Recherche au Centre National de la Recherche  
Scientifique

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	BACCHUS Pierre	Astronomie
M.	BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M.	BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BIAYS Pierre	Géographie
M.	BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	DECUYPER Marcel	Géométrie
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique
M.	DERCOURT Michel	Géologie Générale
M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	GLACET Charles	Chimie Organique
M.	GONTIER Gérard	Mécanique
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M <sup>lle</sup> DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M <sup>e</sup> EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>lle</sup> KOSMAN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>lle</sup> LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>lle</sup> LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>e</sup> N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie
M <sup>lle</sup> SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STEEN Jean-Pierre	Informatique

M. THERY Pierre  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. VILLETTE Michel  
M. WALLART Francis  
M. WERNIER Georges  
M. WATERLOT Michel  
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Mécanique  
Chimie  
Informatique  
Géologie Générale  
Algèbre

A ma femme et à mes fils

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Nous avons pu, au cours de nos études, apprécier les hautes qualités pédagogiques de votre remarquable enseignement.

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre très respectueuse considération.



A notre Maître

Monsieur le Professeur André CAPRON

Malgré la lourde tâche de faire aboutir ce travail dans des délais très sévères, vous nous avez accueilli au sein de votre remarquable équipe de recherche, toute imprégnée de votre dynamisme et de votre enthousiasme.

Permettez-nous de joindre à nos sentiments de grande admiration, l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean GUILLAUME

Vous avez été le guide patient et attentif de nos premiers pas dans la recherche et avez toujours su nous orienter avec sûreté au milieu des difficultés, apportant encouragements et apaisements à un moral assez barométrique.

Acceptez l'expression de toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Louis CHEDID

Nous avons toujours trouvé auprès de vous  
une large compréhension jointe à un bien-  
veillant intérêt et à de précieux conseils.  
Vous nous faites aujourd'hui l'honneur de  
bien vouloir juger notre thèse.  
Qu'il nous soit permis de vous exprimer ici  
notre gratitude et notre profond respect.

A Monsieur le Docteur Hervé BAZIN

Nous vous sommes très reconnaissant  
d'avoir bien voulu accepter de juger  
notre travail.

Nous sommes honoré de bénéficier ainsi  
de votre haute compétence en Immunologie.  
Soyez assuré de notre gratitude et de  
notre profond respect.

Nous souhaitons assurer de notre sincère gratitude

Monsieur le Professeur Albert TACQUET

et Monsieur le Professeur Cyr VOISIN

qui nous ont accueilli quelques mois dans leur laboratoire, nous permettant ainsi de bénéficier de leurs travaux et de leurs conseils.

Nous remercions chaleureusement

Madame Monique CAPRON

qui nous a apporté l'irremplaçable concours de sa technique de production de larves parasitaires sans laquelle ce travail n'aurait pu aboutir.

Ainsi que

Mademoiselle Marie-Thérèse PLANCOT

qui nous a offert sa compétence dans l'analyse des résidus N-terminaux des protéines et nous a largement conseillé dans de nombreux domaines.

Ces remerciements vont aussi à

Madame Roselyne ROUSSEaux

qui nous a abandonné sans compter une grande quantité d'immunoglobulines marquées destinées aux dosages réalisés dans ce travail.

Ce travail, entrepris à l'Institut Pasteur de Lille au sein du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 36 consacré aux recherches sur les antigènes mycobactériens, a été développé et achevé grâce à l'équipe de recherche du Service d'Immunologie et de Biologie parasitaire de Monsieur le Professeur A. CAPRON à la Faculté de Médecine et à l'Institut Pasteur de Lille.

Tous ont participé par une collaboration efficace et constante à la réalisation de cette étude.

Qu'ils en soient très sincèrement remerciés et acceptent l'expression de notre profonde amitié.

Nous tenons cependant à rendre un particulier hommage à celles qui par leur compétence technique nous ont permis de mener à bien ce travail

Madame Lucienne BOUTRY

Madame Marie-Christine LIMBERT

pour leur collaboration  
technique

Madame Marie-France MASSARD

pour la préparation du  
manuscrit

Madame Paule COULEMBIER

pour les planches photo-  
graphiques

Nous remercions également Mademoiselle Bernadette BONNEL et Monsieur Alain JACOB pour leur concours occasionnel mais non négligeable.

Le plus grand dérèglement de l'esprit,  
c'est de croire les choses parce qu'on veut qu'elles soient,  
et non parce qu'on a vu qu'elles sont en effet.

J.B. BOSSUET

Quand vous avez éliminé l'impossible,  
ce qui reste, même improbable,  
doit être la vérité.

Sir Arthur CONAN DOYLE

## PLAN DU TRAVAIL

### INTRODUCTION et BUT DU TRAVAIL

#### Chapitre 1

##### L'IMMUNITE VIS-A-VIS DE LA SCHISTOSOMIASE

- I - Résistance à la réinfection
- II - Les antigènes schistosomiens immunogènes
- III - Mécanismes de la résistance

#### Chapitre 2

##### LES STIMULANTS DE LA REPONSE A MEDIATION HUMORALE

- I - Mécanismes de la réponse humorale
- II - Les adjuvants humoraux

#### Chapitre 3

##### LES STIMULANTS DE LA REPONSE A MEDIATION CELLULAIRE

- I - Le macrophage dans l'immunité cellulaire
- II - Les stimulants du macrophage

### TRAVAUX PERSONNELS

#### Chapitre 4

##### IMMUNOSTIMULATION HUMORALE ET MACROPHAGIQUE

- I - Isolement d'une fraction antigénique mycobactérienne (AgR)
- II - Propriétés de l'antigène R
- III - Activation des macrophages

#### Chapitre 5

##### APPLICATION A LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE DU RAT

- I - Potentialisation des IgE
- II - Activation des macrophages contre les schistosomules

### COMMENTAIRES GENERAUX

### CONCLUSION

### RESUME

### Pages techniques et BIBLIOGRAPHIE



## I N T R O D U C T I O N

### B U T   D U   T R A V A I L

Schistosoma mansoni, ver plat Trématode digénétique, est un parasite des vaisseaux sanguins mésentériques de l'Homme et de quelques mammifères. Il est responsable de la forme intestinale de la schistosomiase (ou bilharziose), maladie touchant 150 millions d'individus, principalement en Afrique et en Amérique tropicale. A ce titre, la bilharziose sous ses diverses formes représente l'une des principales endémies mondiales et, bien que son taux de mortalité reste faible, elle entraîne souvent, par son évolution vers des formes chroniques, une profonde incapacité physique avec ses conséquences humaines et économiques.

L'infection par S. mansoni se produit par voie transcutanéomuqueuse lors d'un contact avec de l'eau où nagent les larves à queue bifide du parasite (les furcocercaires), peu de temps après leur sortie de la Planorbe, mollusque gastéropode pulmoné dulçaquicole, hôte intermédiaire des Schistosomes.

Au moment de la pénétration dans la peau, réalisée grâce à des enzymes protéolytiques, la cercaire perd sa queue et se transforme en un schistosomule. Par un cheminement qui reste encore discuté (capillaires sanguins, système lymphatique), les schistosomules gagnent en quelques jours les poumons où une grande partie d'entre eux est détruite. Les jours suivants, les jeunes vers atteignent les vaisseaux mésentériques et la veine-porte, où ils achèvent leur maturation en vers adultes mâles ou femelles. Le mâle qui mesure 2 cm, loge la femelle, filiforme, dans le creux formé par le repli longitudinal de sa face ventrale, le canal gynécophore. Les femelles fécondées abandonnent les mâles et s'arrêtent dans les veinules du gros intestin. Leurs oeufs, par érosion et digestion enzymatique, traversent la paroi des capillaires, tombent dans la lumière intestinale d'où ils sont entraînés au dehors, et parviennent en milieu aquatique.

De l'oeuf éclot un miracidium, larve ciliée, qui pénètre dans le mollusque lui servant d'hôte intermédiaire. Au sein du mollusque a lieu une reproduction par bourgeonnement interne (polyembryonie) qui transforme le miracidium en sporocyste primaire capable de donner naissance à des milliers de sporocystes-fils. Leur maturation en cercaires s'achève dans l'hépatopancréas du mollusque. Libérées dans l'eau à 25-30°C, les larves infectieuses doivent trouver un hôte dans les 24 heures faute de quoi elles meurent.

La résistance naturelle des mammifères à l'infection par Schistosoma mansoni varie considérablement d'une espèce à l'autre, allant de la résistance totale, comme chez le chat ou le pigeon par exemple, à la susceptibilité comme chez l'homme, la souris ou le hamster.

Entre ces extrêmes existe la situation intermédiaire des mauvais hôtes, comme le cobaye ou le chien, chez qui les larves pénètrent mais ne se développent pas, ou comme le singe Rhésus et le rat chez qui les larves deviennent des vers adultes, éliminés après un délai de quelques semaines par un phénomène d'expulsion spontanée ("self-cure" anglo-saxonne).

Toutefois, chez les hôtes susceptibles, se développe, à des degrés divers, une résistance à la réinfection, conséquence d'une immunité acquise. Chez l'homme, où les vers adultes peuvent survivre de 25 à 30 ans, on constate une certaine réduction de la population parasitaire avec l'âge, mais l'on observe surtout une limitation des infections ultérieures lors de contacts avec des larves infectieuses : il s'est développé un état de prémunition. Chez les animaux expérimentaux, la première infestation entraîne un état de résistance à la réinfection qui semble totale et définitive chez le singe Rhésus, temporaire chez le rat, et seulement partielle chez divers hôtes comme la souris.

Cette immunité acquise a essentiellement comme support le parasite adulte vivant. Les schistosomes éliminent dans la circulation sanguine de leur hôte de très nombreuses substances solubles, somatiques et surtout métaboliques : produits de la digestion, enzymes, structures

du tube digestif, pigments, éléments du tégument, substances de l'appareil excréteur et de l'appareil génital, peut-être des hormones, constituant une source extrêmement complexe d'antigènes grâce auxquels l'hôte est susceptible de s'immuniser.

Actuellement, l'étude des antigènes schistosomiens est l'un des axes principaux de la recherche concernant l'immunité anti-bilharzienne, dans le but d'identifier ceux qui sont responsables de l'immunisation de l'hôte.

\*

\*        \*

Le second pôle d'intérêt dans ce problème est l'analyse des mécanismes effecteurs de l'immunité anti-schistosomienne. Les plus récents travaux à ce sujet ont mis en évidence, in vitro, l'existence de plusieurs processus immunologiques :

- 1) La présence dans le sérum des animaux (singe Rhésus, rat, lapin, cobaye) et de l'homme infectés, d'un anticorps toxique et même léthal, en quelques jours, pour les tout jeunes schistosomules et dont l'action nécessite le complément.
- 2) Chez le rat et le cobaye, une accélération du mécanisme précédent est constatée en présence de leucocytes polymorphonucléaires, apparemment les neutrophiles.
- 3) Chez l'homme, le babouin et la souris, des éosinophiles associés à des anticorps, indépendamment du complément, entraînent des lésions importantes chez les schistosomules.
- 4) Des macrophages normaux, sensibilisés à 4°C par des anticorps cytophiles de rats immuns, endommagent les larves du parasite.
- 5) Enfin, des macrophages normaux, préincubés pendant 3 à 14 h avec du sérum de rat immun, adhèrent fortement aux schistosomules et parviennent à les tuer en quelques heures. Les anticorps impliqués sont les IgE.

Avec ces mécanismes se manifeste le caractère majeur de l'immunité acquise dans la schistosomiase : elle s'exerce contre la forme larvaire précoce du parasite, c'est-à-dire dans les premières heures qui suivent une nouvelle pénétration de larves dans la peau. En effet, après 4 jours, le schistosomule acquiert des antigènes identiques à ceux de son hôte, qui semblent le protéger des mécanismes immunitaires de l'organisme infecté. C'est probablement là l'une des explications de la longue survie des vers adultes malgré l'immunité qu'ils suscitent ; cette immunité n'agit qu'à l'encontre des larves nouvellement introduites dans l'organisme, donc vis-à-vis de la réinfection.

Si la coopération macrophages-immunoglobulines E (IgE) constitue un élément important de la défense de l'organisme contre la réinfection, il est tentant d'essayer d'augmenter l'efficacité du mécanisme.

C'est à un tel objectif que notre travail s'est attaché.

Dans ce but, nous avons utilisé diverses substances immuno-stimulantes, les unes connues pour potentialiser la réponse humorale et plus spécialement solliciter la production d'IgE en augmentant leur taux sérique, et les autres connues pour stimuler les activités propres des macrophages, ces cellules que nos connaissances ont longtemps confinées au seul service de la voirie de l'organisme, mais qui se révèlent, depuis quelques années, des partenaires indispensables aux mécanismes immuns.

Dans un premier chapitre, nous exposerons l'état actuel de nos connaissances dans l'immunité anti-bilharzienne et dans les mécanismes qui la soutiennent.

Cette immunité étant à la fois à support humoral et à support cellulaire, nous présenterons, dans le deuxième chapitre, les mécanismes de la réponse humorale ainsi que les substances immuno-stimulantes susceptibles d'agir sur la production d'anticorps, et, dans un troisième chapitre, le rôle du macrophage dans l'immunité cellulaire, avec les substances capables d'accroître l'efficacité de ses interventions.

Nos travaux personnels seront exposés en deux chapitres.

Le premier présentera les résultats obtenus dans l'immunostimulation humorale et macrophagique avec un extrait antigénique pur isolé des Mycobactéries comparé à d'autres substances connues pour leur effet adjuvant.

Le second s'attachera à une application des effets stimulants humoraux et macrophagiques observés, dans le développement de l'immunité anti-bilharzienne chez le rat soumis à une infection expérimentale par Schistosoma mansoni.

CHAPITRE I

L'IMMUNITE VIS-A-VIS DE LA SCHISTOSOMIASE

L'immunologie de la schistosomiase a fait l'objet d'un récent Memorandum de l'O.M.S. (CAPRON et un groupe d'auteurs, Bull. OMS, 1974).

Contrairement à ce qui se passe dans la plupart des infections, l'immunité qui se développe dans les affections parasitaires est en général très longue à s'instaurer et n'aboutit pas à une destruction totale de la population parasitaire installée. Vis-à-vis des vers adultes de l'infestation initiale, il se développe ce que SMITHERS et TERRY (1969)<sup>359</sup> ont appelé l' "immunité concomitante", état dans lequel l'hôte est incapable de se débarrasser complètement de la population de vers responsable de l'immunisation, mais grâce auquel il peut résister aux infestations ultérieures. On cite l'exemple de travailleurs subtropicaux, dont la tâche impose une immersion quotidienne dans des canaux d'irrigation entraînant une importante mortalité par une infestation primaire massive, mais pour qui la survie signifie l'immunisation.

Il est possible, mais non prouvé, que la réduction de la population infestante, manifestée chez certains animaux expérimentaux dans le phénomène de "self-cure", ainsi que chez l'homme avec l'âge (BRADLEY et Mc CULLOUGH, 1973)<sup>46</sup>, repose sur un mécanisme immunologique : chez le singe Rhésus, la ponte par les parasite est maximum entre 8 et 12 semaines après l'infestation, puis diminue progressivement pour atteindre un taux faible mais constant. On constate une réduction parallèle de la population de vers adultes (Mc MULLEN et coll., 1967)<sup>245</sup>.

Chez le rat, l'élimination des vers constitue un phénomène extrêmement intéressant pour l'immunologiste et un modèle expérimental très utilisé par le parasitologue : la plus grande partie de la population parasitaire est détruite entre la 4ème et la 8ème semaine, tout d'abord rapidement entre le 21ème et le 37ème jour (la demi-vie biologique des vers est de 6 jours), puis plus lentement, la population se réduisant de moitié tous les mois environ (RITCHIE et coll., 1963<sup>319</sup> ; SMITHERS et TERRY, 1965 b)<sup>357</sup>.

Chez la souris, les oeufs sont pondus à un rythme constant pendant une centaine de jours. Peu à peu, et surtout à partir du 60ème jour, ils sont piégés dans le foie et l'intestin. Un mécanisme immun de l'hôte inhiberait l'action des enzymes de l'oeuf, l'empêchant de tomber dans la lumière intestinale (KLOETZEL, 1967)<sup>216</sup>.

Le cobaye et le lapin sont capables de réduire leur population parasitaire mais plus lentement que le rat.

## I - RESISTANCE A LA REINFECTION

Au sens stric, l'immunité contre la schistosomiase n'intéresse que les parasites introduits lors des infections secondaires. Il semble en effet que l'essentiel des mécanismes immunologiques acquis s'exerce contre les formes immatures du parasite, celles qu'il présente au moment de la pénétration dans l'hôte. L'immunité anti-bilharzienne se traduit par une résistance à la réinfection.

C'est ainsi que le singe Rhésus devient totalement résistant à la réinfection après une première infestation. Les auteurs divergent sur le délai nécessaire à l'installation de cette immunité, délai qui serait de 16 à 21 semaines pour certains (SMITHERS et TERRY, 1965a)<sup>356</sup> et d'une année pour d'autres (NAIMARK et coll., 1960)<sup>278</sup>, mais ils tombent d'accord sur sa réalité (MADDISON et coll., 1971)<sup>248</sup>.

Chez le rat, en général 4 semaines après une première infestation, une immunité est observable et persiste pendant 12 à 14 semaines (SMITHERS et TERRY, 1965b)<sup>357</sup>. Chez le rat Sprague-Dawley, la résistance à la réinfection est comprise entre 80 et 100 % de la 5<sup>ème</sup> à la 7<sup>ème</sup> semaine suivant une infestation par 1000 cercaires. Elle diminue ensuite rapidement et disparaît à la 16<sup>ème</sup> semaine. Chez le rat Hooded-Lister, la cinétique est tout à fait semblable, avec un léger décalage, puisque le maximum de résistance est compris entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine et que cette espèce est à nouveau susceptible vers la 17<sup>ème</sup> semaine (PEREZ et coll., 1974)<sup>305</sup>. Le rat Sherman et le rat Lewis atteignent le maximum de résistance à la 8<sup>ème</sup> semaine (MADDISON et coll., 1970)<sup>246</sup>. Le maximum de résistance du rat Fisher est observé à la 9<sup>ème</sup> semaine (Monique CAPRON, 1974)<sup>74</sup>.

Les divers stades du cycle parasitaire dans l'hôte vertébré sont potentiellement antigéniques. Tous, cependant, ne semblent pas impliqués dans le développement de la résistance acquise aux schistosomules.

## II - LES ANTIGENES SCHISTOSOMIENS IMMUNOGENES

Chaque étape du développement du parasite libère dans la circulation sanguine et les tissus de l'hôte des substances solubles susceptibles de déclencher une réponse immunitaire. L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle permet d'identifier plus de 60 antigènes dans les extraits



parasitaires réalisés in vitro. Au sein de cette mosaïque, certains antigènes ont une spécificité de genre, d'autres une spécificité d'espèce, et d'autres enfin une spécificité de stade. L'un ou l'autre de ces antigènes spécifiques ont été isolés, en particulier par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (BOUT et coll., sous presse) et supportent très souvent une activité enzymatique. Ils sont également présents dans le sérum des sujets parasités.

Les substances libérées dans le sang de l'hôte se répartissent en antigènes somatiques, constitutifs du corps parasite, et en antigènes métaboliques, sécrétés ou excrétés par le parasite.

Une description détaillée de ces antigènes a été donnée par CARLIER (1975)<sup>76</sup>.

Quelle est leur valeur immunogène ou vaccinnante ?

- Les cercaires : Au moment de la pénétration dans la peau, les cercaires libèrent des enzymes et vident leurs glandes acétabulaires. LEVINE et KAGAN (1960)<sup>232</sup> ont obtenu une immunisation de souris avec de l'incubat de cercaires de S. mansoni ; il s'agit du milieu dans lequel ont vécu un certain temps les cercaires.
- Les schistosomules : 10 à 60 % des schistosomules, selon la susceptibilité de l'hôte, sont détruits au moment de leur pénétration, de leur migration ou au niveau du poumon. Ils constituent une importante source d'antigènes. Le singe Rhésus infesté par la souche formosane de Schistosome, qui ne se développe pas chez le singe, deviennent résistants à une infestation par S. japonicum (HSU et HSU., 1963)<sup>175</sup>.

Les avis divergent sur la valeur de l'immunisation par infestation avec des souches hétérologues (souches du bétail, chez la souris ou le singe).

L'utilisation de cercaires irradiées, qui restent à l'état de larves immatures, confère une certaine immunité ; mais l'irradiation qui entraîne ce blocage du développement conduit également à la mort in situ des larves et déclenche de ce fait la formation de granulomes pulmonaires ou cutanés.

- Les vers adultes : Des rats sont facilement protégés par des homogénats de vers adultes de S. mansoni (SADUN, 1963)<sup>332</sup>. Par le transfert de vers adultes dans la veine-porte de singes sains, SMITHERS et TERRY (1967)<sup>358</sup> ont développé une immunité à la réinfection.

L'infection unisexuée permet de vérifier le rôle de l'adulte, en éliminant la part éventuelle des oeufs : ainsi VOGEL (1958)<sup>394</sup> obtient une immunisation chez des singes par infestation avec des cercaires d'un seul sexe ; de même, SMITHERS et TERRY (1969b)<sup>360</sup> chez des souris. Ces deux derniers auteurs (1967)<sup>358</sup>, par le transfert de vers adultes mâles ou femelles dans la veine-porte du singe Rhesus, ont obtenu un haut degré de résistance ; de même, par transfert de vers femelles coupés en deux : la partie antérieure peut survivre plusieurs semaines et ne pond pas d'oeufs.

Ce sont essentiellement les produits du métabolisme des vers qui portent l'activité immunogène protectrice : les surnageants des cultures de vers in vitro (incubats) confèrent une bonne immunité aux animaux : ainsi vaccinée, la souris résiste à une infestation par S. japonicum (SADUN et LIN, 1959)<sup>331</sup> ou par S. mansoni (MURRELL et CLAY, 1972)<sup>275</sup>.

Le tube digestif du ver adulte est en cul de sac. Trois à quatre heures après ingestion des érythrocytes du sang de l'hôte, le ver renouvelle le contenu coecal en régurgitant les résidus de la digestion : enzymes, cellules et débris cellulaires de son épithélium intestinal. Outre ces excréments, le ver renouvelle constamment son tégument externe heptalaminé, dont les fragments sont libérés dans la circulation de l'hôte ; des sérums toxiques in vitro pour les schistosomules ont été obtenus par injection de molécules membranaires à des rats (SHER et coll., 1974).

Le ver adulte vide le contenu de sa vésicule excrétoire. Des produits de l'appareil génital du mâle comme de la femelle passent dans la circulation sanguine. Il y a peut-être également des hormones.

CARLIER (1975)<sup>76</sup> a isolé du sérum et de l'urine de bilharziens, un antigène de nature polysaccharidique, retrouvé dans l'incubat de vers adultes. Cette molécule serait hapténique et ne provoquerait l'apparition d'anticorps, que couplée à une protéine porteuse.

Les antigènes métaboliques libérés par le ver adulte se répartissent actuellement en molécules polysaccharidiques pour les éléments provenant du tube digestif, et en molécules protéiniques ou glycoprotéiniques pour les structures libérées par le turn-over très rapide de la membrane cytoplasmique externe heptalaminée du ver (KUSEL et MACKENZIE, 1975<sup>225</sup> ; KUSEL et coll., 1975)<sup>226</sup>. Ces mêmes molécules ont été identifiées dans le sérum des sujets infectés.

De plus certains des antigènes membranaires de l'adulte et de la forme larvaire ont des communautés qui peuvent expliquer l'action d'anticorps cytotoxiques, induits par les vers adultes, sur les jeunes larves au moment de leur pénétration.

Il apparaît cependant de plus en plus clairement que le développement de l'immunité à la réinfection chez le rat coïncide avec la lyse des vers (qu'elle soit la conséquence d'un rejet immunologique ou d'une thérapeutique efficace) qui libère dans la circulation sanguine une énorme quantité d'antigènes somatiques et d'immunocomplexes solubles (CAPRON, 1975)<sup>72</sup>.

- Les oeufs : Dans le système S. douthittii-souris, les femelles pondent des oeufs parthénogéniquement. Il est donc possible d'obtenir in vivo une ponte en absence de mâles. La souris développe une immunité à la réinfection lorsqu'elle est infestée par des femelles, mais pas lorsqu'elle l'est avec des mâles (KAGAN, 1952)<sup>200</sup>. Dès le 2ème jour, l'oeuf, contenant le miracidium, excrète, par ses pores, des enzymes dans les tissus qui l'entourent. Cependant, les antigènes d'oeufs semblent surtout responsables du déclenchement des réactions d'hypersensibilité retardée à l'origine du granulome qui se forme autour de cet organite.

En conclusion, il est encore difficile de déterminer les antigènes responsables de l'induction de l'immunité protectrice. Il semble au moins acquis que cette stimulation de l'immunité soit due au métabolisme des vers vivants au sein de l'hôte.

Il est possible qu'un certain degré d'immunité protectrice puisse être obtenue avec la jeune larve migrante, mais les singes et les souris ne développent d'immunité que très lentement après une petite infection initiale. C'est le signe de l'importance de l'adulte dans le processus immunitaire. Le transfert chirurgical des vers adultes dans la veine-porte confirme d'ailleurs que l'essentiel du stimulus antigénique est apporté

par le parasite adulte.

Le développement des techniques immunologiques qui permettent d'évaluer le degré de protection immunitaire a récemment montré que les parasites introduits lors d'une infection expérimentale sont détruits soit dans le poumon, soit à un stade précoce de leur migration.

Comment les schistosomes survivent-ils dans les hôtes immuns parviennent-ils à échapper à la réponse immunitaire ? Quels mécanismes les hôtes immuns parviennent-ils à résister à l'infestation ?

### III - MECANISMES

Il est classique, mais toujours valable, de distinguer dans les mécanismes immunologiques deux types de réponse, l'immunité humorale, intéressant les immunoglobulines anti-parasitaires, et l'immunité cellulaire, intéressant les cellules lymphoïdes et réticulo-endothéliales, qui agissent contre la cible que le système immunitaire est capable de reconnaître.

Nous envisagerons successivement les mécanismes de l'immunité humorale, l'on peut considérer comme purement humaine, et l'immunité cellulaire, qui implique une coopération des anticorps avec divers types de cellules, et enfin, les mécanismes dépendant directement de la réponse cellulaire.

#### A) Immunité à médiation humorale

Les anticorps contre les antigènes de Schistosoma ont été révélés par les diverses techniques de l'immunochimie : précipitation en solution, immunofluorescence, hémagglutination, hémolyse, etc. Cependant ces anticorps atteignent leur taux maximum lorsque l'hôte est adulte et que de nombreux oeufs sont déjà bloqués dans le poumon, c'est-à-dire plus tardivement que l'installation de l'immunité à médiation humorale. Chez le rat Sherman, le maximum d'anticorps est atteint à 10 semaines, alors que le rat est immun dès la 4ème semaine (SHERMAN, 1962; MADDISON et coll., 1970a)<sup>246</sup>. Chez le singe Rhésus, l'immunité à médiation humorale ne corrèle pas les anticorps détectés (MADDISON et coll., 1971)<sup>247</sup>.

Jusqu'à ces tout derniers mois, la plupart des expériences de transfert passif de sérum d'animaux immuns à des animaux sains s'étaient traduites par des échecs : aucune protection n'était transférée.

Autrement dit, les anticorps présents dans ces sérums à ce moment du cycle parasitaire ne protègent pas le receveur contre des larves infestantes.

Enfin, une immunosuppression des cellules productrices d'anticorps, réalisable par irradiation aux rayons X et par splénectomie, n'entraîne pas de diminution de la protection chez le singe Rhésus (BRUCE et coll., 1966)<sup>50</sup>.

Ces divers éléments semblaient peu encourageants pour déceler ou identifier dans le sérum, l'existence d'anticorps protecteurs.

Entre 1966 et 1970, un pas décisif fut franchi lorsqu'il devint possible de travailler avec de toutes jeunes larves de schistosomes, dès leur transformation de cercaires en schistosomules par le passage transcutané réalisé in vitro selon la technique de CLEGG et SMITHERS (1970<sup>81</sup> et 1972)<sup>82</sup> adaptée de celle de STIREWALT et coll. (1966)<sup>369</sup>.

### 1 - L'anticorps léthal

Dans ce système in vitro, CLEGG et SMITHERS (1970<sup>81</sup> et 1972)<sup>82</sup> montrent qu'au bout de 4 jours de culture en présence d'un sérum de singe Rhésus hyperimmunisé par plusieurs infestations cercariennes, 95 à 100 % des schistosomules sont détruits. De leur côté, CAPRON et coll. (1972,<sup>66</sup> 1973<sup>67</sup> et 1974)<sup>68</sup> démontrent une activité létale très marquée de 74 % des sérums de malades atteints de bilharziose. Ce même facteur est retrouvé chez le rat et le lapin infestés. Dans un système voisin, MURRELL et CLAY (1972)<sup>275</sup>, observent également une action cytotoxique de sérums de rats, de lapins et de singes infestés par S. mansoni sur des schistosomules.

CLEGG et SMITHERS<sup>82</sup> chez le singe Rhésus, CAPRON et coll.<sup>68</sup> chez l'homme, le rat et le lapin, ont identifié ce facteur létal comme une immunoglobuline G, dont l'action nécessite la présence de complément.

Son action est spécifique d'espèce, puisque les sérums d'animaux infestés par S. japonicum ou S. haematobium, n'ont pas d'effet sur les schistosomules de S. mansoni (CAPRON et coll., 1973)<sup>67</sup> et que les sérums des malades à S. haematobium (schistosomiase urinaire) sont sans effet sur les formes immatures de S. mansoni (CAPRON et coll., 1974)<sup>68</sup>.

Cet anticorps léthal est spécifique de stade : en effet, les schistosomules récupérés au niveau du poumon chez un hamster, sept jours après infestation, ou chez une souris, après quatre jours d'évolution, sont insensibles à ce facteur, de même que des schistosomules cultivés cinq jours et plus en présence de sérum de singe normal. Tous les auteurs sont d'accord pour considérer que l'anticorps léthal n'est actif que sur la forme immature du parasite, dans les quatre jours qui suivent la pénétration transcutanée. Cette insensibilité, acquise en quelques jours, proviendrait de l'apparition chez les vers d'un certain nombre d'antigènes identiques à ceux de l'hôte vertébré (DAMIAN, 1964<sup>96</sup> - 1967<sup>97</sup>; CAPRON et coll., 1965<sup>63</sup> - 1968)<sup>64</sup>, leur conférant une sorte d'adaptation qui les protégerait contre les réactions immunes de l'hôte. Ce sont les schistosomes eux-mêmes qui synthétisent des protéines semblables à celles de l'hôte : des schistosomes prélevés chez le hamster et cultivés in vitro avec des acides aminés marqués, synthétisent des protéines dont le marquage montre qu'elles ont des déterminants communs avec des protéines sériques et hépatiques du hamster (BOUT et coll., 1974)<sup>44</sup>.

Il a été possible d'induire la synthèse de cet anticorps léthal par immunisation du lapin et du rat avec de l'antigène total de S. mansoni (il s'agit essentiellement des fractions membranaires du parasite adulte). Les sérums obtenus sont très actifs sur les schistosomules (CAPRON et coll., 1974)<sup>68</sup>. De même, SHER et coll. (1974)<sup>352</sup> ont isolé de la fraction membranaire du schistosome un antigène capable d'induire la formation de cet anticorps cytotoxique chez le rat et d'adsorber cet anticorps dans les sérums le contenant. En revanche, les animaux ainsi immunisés n'acquièrent aucune protection contre une nouvelle infection.

Les dommages provoqués par l'anticorps léthal ont été visualisés en microscopie électronique. Il provoque une désorganisation totale du tégument des schistosomules.

Le taux maximum d'activité lytique chez le rat correspond assez précisément à la période où cet animal est immun à la réinfection, c'est-à-dire entre le 30ème et le 90ème jour. Chez le lapin, dès le 45ème jour après l'infestation, il est décelable à un taux qui dépend du nombre de cercaires infestantes. Des expériences de transfert passif de sérum de rats infestés à des rats sains ont donné une protection maximum de 83 % avec des sérums d'animaux infestés depuis 100 jours (Monique CAPRON, 1974)<sup>74</sup>, et des résultats positifs de transfert d'immunité acquise par le sérum, également chez le rat, sont rapportés par SMITHERS (cité dans PEREZ, 1974)<sup>305</sup> et tout récemment par PHILLIPS et coll. (1975)<sup>309</sup> qui obtiennent une très forte protection chez des rats recevant en intraveineuse un maximum de 2 ml de sérum de rats infestés depuis 40 à 45 jours. Les immunoglobulines porteuses de cet effet protecteur sont localisés dans la fraction IgG. Cependant, Alan SHER (1974)<sup>352</sup> ne constate aucune protection chez les animaux vaccinés avec l'antigène schistosomien inducteur de forts taux d'anticorps léthal : Hilda PEREZ et coll. (1974)<sup>305</sup> remarquent que si la résistance à la réinfection apparait à peu près au même moment que l'activité létale du sérum, des taux hautement toxiques d'anticorps persistent chez des animaux qui ont perdu leur immunité à la réinfection.

Alan SHER émet une série d'hypothèse pour expliquer cette discordance entre les effets in vitro et in vivo de l'anticorps léthal :

- 1) l'effet observé in vitro est un artefact : soit qu'in vivo les schistosomules sont moins fragiles qu'in vitro, soit qu'ils sont très rapidement protégés de cette action par des antigènes d'hôte (pour l'équipe de SMITHERS, les antigènes d'hôte ne sont pas d'origine parasitaire mais passivement adsorbés par le ver).
- 2) la protection immune in vivo est médiée par un anticorps de même spécificité antigénique que l'anticorps cytotoxique, mais appartenant à une autre classe d'immunoglobuline (l'auteur évoque la possibilité d'anticorps cytophiles ou homocytotropes). Cet anticorps agirait dans les tissus à un niveau inaccessible à l'anticorps léthal détecté dans le sérum.

3) l'anticorps léthal doit coopérer avec un ou plusieurs constituants de la réponse immunitaire. Ces éléments pourraient être humoraux ou cellulaires. SHER penche pour des composants humoraux, étant donné les récents résultats positifs de transfert de sérum par SMITHERS (1974)<sup>305</sup>.

En liaison avec ce problème de l'anticorps léthal, CAPRON et coll. (1974)<sup>68</sup> ont obtenu des anticorps toxiques in vitro pour le ver adulte par hyperimmunisation de lapins avec de l'antigène soluble de S. mansoni adulte : 67 à 100 % des vers de 30 jours mis en culture avec de tels sérums meurent entre 4 et 10 jours. En revanche, ces sérums ne témoignent d'aucune activité létale significative pour les larves immatures.

Comme pour l'anticorps léthal, cette activité est portée par la fraction IgG des immunoglobulines fractionnées sur Sephadex G 200, et nécessite la présence du complément. Mais contrairement à l'effet de destruction du tégument observé en microscopie électronique chez les schistosomules par l'anticorps léthal, la structure du tégument apparaît ici bien conservée chez le ver adulte lésé. En revanche, les lésions cytoplasmiques sont très importantes : le cytoplasme est vacuolisé, rempli de vésicules, de débris de fibres musculaires et de grandes inclusions denses aux électrons.

Ce type d'anticorps n'est pas observé dans le sérum des animaux infestés naturellement ou expérimentalement. L'hypothèse formulée est que ces molécules seraient suscitées par des antigènes du schistosome adulte normalement inaccessibles à l'hôte dans l'infection naturelle.

Les immunoglobulines G, identifiées dans la schistosomiase et porteuses d'une activité cytotoxique in vitro pour le parasite, jouent peut-être un rôle dans l'immunité vis-à-vis de la réinfection, mais ce point demande des investigations supplémentaires. L'intervention des anticorps réaginique dans les mécanismes de résistance à la réinfection semble, en revanche, mieux établie.

## 2 - Les anticorps réaginique

Chez l'homme, les trois espèces de schistosomes (S. mansoni, S. japonicum et S. haematobium) sont responsables de phénomènes allergiques : après une première infestation, la pénétration cercarienne peut provoquer de l'urticaire, de l'asthme, un oedème sous-cutané, une leucocytose et de l'éosinophilie. Un mois après l'infection, à une date corres-



pendant au début de la ponte par les vers devenus adultes, on constate anorexie, céphalées et perte de poids. Il s'agit dans les deux cas de manifestations d'hypersensibilité immédiate dont le mécanisme est à support sérique, déclenché par le contact du parasite avec les formations lymphoïdes des muqueuses intestinales ou respiratoires de l'hôte (SADUN, 1972)<sup>333</sup>.

Les anticorps principalement responsables de ces phénomènes d'anaphylaxie, sont les immunoglobulines de type E (IgE) appelées réagines avant leur identification en 1966 par ISHIZAKA<sup>183</sup>. Ce sont des anticorps thermosensibles (détruits par chauffage 3 heures à 56°C), réduits par le mercaptoéthanol, de mobilité électrophorétique plus rapide que les IgG, et ne fixant pas le complément. Leur poids moléculaire est de 190 000 et leur constance de sédimentation 8,2 s.

Ces immunoglobulines ont la propriété de se fixer fortement aux membranes cellulaires d'un animal de la même espèce (anticorps homocytotropes) par leur fragment Fc, et peuvent persister longtemps liées aux tissus : jusqu'à 14 jours chez l'homme.

Leur localisation principale se situe sur les basophiles du sang et sur les mastocytes, cellules du tissu conjonctif de la peau, du mésentère et des bronches. Ces cellules sont riches en médiateurs solubles pharmacologiquement actifs (STANWORTH, 1973)<sup>365</sup> : principalement l'histamine, mais également sérotonine, kinines, héparine, "slow reactive substance", enzymes lysosomiales et facteur chimiotactique pour les éosinophiles identifié par KAY et coll. (1971)<sup>205</sup>.

La rencontre d'un antigène avec ses IgE spécifiques fixées à la surface des mastocytes, provoque une dégranulation des cellules par l'intermédiaire d'une cascade de réactions enzymatiques. Le processus aboutit à la libération dans le milieu extracellulaire des médiateurs chimiques de l'anaphylaxie dont les effets sont spectaculaires sur l'organisme : vasodilatation, céphalées, troubles digestifs, asthme, érythème, toutes les manifestations observées dans les réactions allergiques des bilharziens.

Or, l'une des caractéristiques de la réponse humorale dans la plupart des infections parasitaires est la production de fortes quantités d'immunoglobulines de type E (OGILVIE, 1964,<sup>293</sup> 1967<sup>296</sup>; OGILVIE et coll., 1966<sup>294</sup>; HOGARTH-SCOTT et coll., 1969<sup>173</sup>; CAPPUCINELLI et coll., 1971<sup>62</sup>; KOJIMA et coll., 1972<sup>218</sup>; WILKINS et BROWN, 1973<sup>419</sup>; PATTERSON et coll., 1973<sup>304</sup>; DESSAINT, 1974<sup>105</sup>; DESSAINT et coll., 1975)<sup>106</sup>. SADUN (1972)<sup>333</sup> a constaté que les animaux naturellement résistants développent un taux élevé d'IgE, alors que les animaux susceptibles ne semblent pas en synthétiser beaucoup.

#### - Rôle de l'anaphylaxie

Le rôle des IgE ans l'immunité protectrice a récemment été revu par CAPRON et DESSAINT (1975)<sup>73</sup>.

Parmi les divers parasites, le rôle protecteur des IgE a été principalement analysé chez le rat infecté par le nématode Nippostrongylus brasiliensis et par Schistosoma mansoni, et chez le cobaye infecté par Trichinella spiralis.

Les plus récentes recherches sur cette immunité protectrice liée aux IgE se sont surtout attachées à la phase du rejet des vers adultes par l'hôte infecté. L'expulsion spontanée d'Haemonchus contortus chez le mouton (STEWART, 1955)<sup>367</sup>, de Trichostrongylus retortaeformis chez le lapin (MICHEL, 1952)<sup>255</sup> et Nippostrongylus brasiliensis chez le rat, modèle qui reste le plus étudié (OGILVIE et LOVE, 1974)<sup>297</sup>, est accélérée par un choc anaphylactique hétérologue, l'expulsion semblant être déclenchée par les réactions d'hypersensibilité immédiate au niveau de la muqueuse intestinale. La multiplication des vers est en tout cas empêchée (URQUHARDT et coll., 1965)<sup>392</sup>. La production d'IgE anti-ovalbumine permet de déclencher une réaction anaphylactique vis-à-vis de cette protéine qui accélère le rejet des vers chez des rats passivement infestés par transfert de vers et de sérum de rats immuns (BARTH et coll., 1966)<sup>24</sup>. Les IgE apparaissent dans le sérum peu après le rejet des vers. BLOCH (1967)<sup>39</sup> remarque que les substances vaso-actives, libérées par le mastocyte activé par la formation des immunocomplexes IgE-allergènes à sa surface, faciliteraient l'élimination de bactéries, par l'augmentation locale de la perméabilité vasculaire qu'elles induisent. L'héparine libérée est susceptible d'inhiber l'action pathogène des métabolites bactériens, de certains virus et de venins.

Le rejet des vers s'accompagne d'une augmentation de la division et du nombre des mastocytes intestinaux, d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse aux grosses molécules (MURRAY et coll., 1971a)<sup>271</sup> et d'un taux d'histamine et de sérotonine plus élevé (MILLER et JARRETT, 1971<sup>259</sup>; MURRAY et coll., 1971b)<sup>272</sup>. Les anti-histaminiques ou les inhibiteurs de la sérotonine diminuent le rejet (MURRAY et coll., 1971c)<sup>273</sup>. Les phénomènes d'anaphylaxie locale permettent donc, par des modifications de perméabilité des tissus, l'accumulation des anticorps anti-parasitaires (MURRAY, 1972).

Ce fait implique que le rôle premier dans le rejet serait joué par des immunoglobulines (IgG<sub>1</sub> selon JONES et coll., 1970)<sup>194</sup> et par des lymphocytes (OGILVIE et LOVE, 1974)<sup>297</sup>, l'expulsion par anaphylaxie locale s'effectuant sur des vers déjà lésés (JONES et OGILVIE, 1971)<sup>196</sup>.

Il semble par ailleurs que les immunocomplexes IgE-allergènes provoquent un afflux d'éosinophiles (ZOLOV et LEVINE, 1969)<sup>429</sup> en particulier dans les intestins au moment du rejet des vers. Les éosinophiles deviennent capables de phagocyter ces immunocomplexes et libèrent des substances antagonistes des amines vasoactives relarguées par les mastocytes. Les éosinophiles ont, de ce fait, un rôle régulateur des réactions anaphylactiques locales (HUBSCHER, 1975)<sup>179</sup>.

Tout en restant prudent dans la généralisation d'un mécanisme noté pour un couple hôte-parasite, il est tentant de penser que les effets tissulaires des réactions anaphylactiques qui viennent d'être rapportées pour la phase du rejet des vers, pourraient intervenir dans l'immunité vis-à-vis des larves de réinfection où apparaît une coopération entre diverses cellules et plusieurs classes d'immunoglobulines comme nous allons l'exposer maintenant.

#### B) Coopération humorale et cellulaire

In vitro, diverses cellules se révèlent actives vis-à-vis de larves de schistosomes ; il est toutefois difficile de préciser le rôle exact de chacune d'elles in vivo. De plus, il apparaît que ces cellules agissent en coopération ou en association avec diverses classes d'immunoglobulines (Tableau 1).

Mécanismes	classes d'Ig	Complément	Hôtes	Références
<u>Serotoxicité</u>				
Anticorps cytotoxique	IgG	C+	Homme, Singe Rhésus, rat, lapin, cobaye	CLEGG et SMITHERS, 1972 <sup>82</sup> CAPRON et coll., 1973 <sup>67</sup> M. CAPRON, 1974 <sup>74</sup>
<u>Cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps</u>				
Anticorps + neutrophiles	IgG	C+	Rat	DEAN et coll., 1974 <sup>103</sup>
Anticorps + neutrophiles	IgG <sub>2</sub>	C+	Cobaye	DEAN et coll., 1975 <sup>104</sup>
Anticorps + éosinophiles	IgG <sub>1</sub>	C-	Homme, babouin, souris	BUTTERWORTH et coll., 1974 <sup>56</sup> MAHMOUD et coll., 1975 <sup>249</sup>
(Anticorps thermolabiles + macrophages	IgE	C-	Rat	CAPRON et coll., 1975 <sup>71</sup>
(Anticorps thermostables + macrophages	IgG <sub>1</sub> (?)	C-	Rat	PEREZ, 1975 <sup>305 bis</sup>

Tableau 1 : Mécanismes effecteurs in vitro.



- 1) Neutrophiles : DEAN et coll. (1974)<sup>103</sup> ont observé que les neutrophiles de rat détruisent les schistosomules in vitro par contact direct et probablement action enzymatique. Des IgG sont impliquées dans l'attachement des cellules aux vers et le complément semble jouer un rôle dans ce processus.
- 2) DEAN et coll. (1975)<sup>104</sup> : Un second mécanisme dépendant d'IgG<sub>2</sub> et de complément est présenté chez le cobaye où des leucocytes neutrophiles prélevés chez des animaux sains sont capables de tuer des schistosomules entre 20 et 44 heures. Ces cellules semblent également agir par un intense relargage d'enzymes lysosomiales.
- 3) Eosinophiles : La mort des schistosomules sans intervention du complément par des éosinophiles associés à des IgG<sub>1</sub> a été obtenue par BUTTERWORTH et coll. (1974<sup>55</sup> et 1975)<sup>56</sup>. Des éosinophiles normaux incubés dans du sérum de patients immuns inactivé par chauffage, détruisent les schistosomules. Ce même mécanisme a été démontré avec des cellules et du sérum de babouin et de souris. Un sérum anti-éosinophile fait disparaître la cytotoxicité du système in vitro, et abolit l'immunité à la réinfection chez la souris in vivo (MAHMOUD et coll. 1975)<sup>249</sup>.

Il est possible que le chemotactisme des immunocomplexes à IgE pour les éosinophiles noté dans l'anaphylaxie au niveau de la muqueuse intestinale puisse également se produire au site de réinfection, et que l'afflux de ces cellules au point de pénétration des jeunes larves facilite leur destruction rapide.

Eosinophiles et neutrophiles d'animaux sains apparaissent donc comme des cellules effectrices de la réponse immune à condition d'agir en association avec certaines immunoglobulines et fractions sériques d'animaux immuns.

- 4) Macrophages : Les macrophages, enfin, ont été impliqués dans deux mécanismes de cytotoxicité.

a) Les cellules d'un exudat péritonéal de rat sain préincubées 4 heures à 4°C avec un sérum de rat immun inactivé par chauffage, puis lavées, présentent une forte adhérence aux schistosomules qu'elles endommagent en une vingtaine d'heures. Les immunoglobulines en cause sont des anticorps cytophiles IgG<sub>1</sub> (PEREZ, 1975)<sup>305 bis</sup>.

Il est intéressant de noter qu'une étude de TIZARD (1969)<sup>385</sup> démontre que les neutrophiles ne fixent pas les anticorps cytophiles de classe IgG chez la souris, mais phagocytent activement les globules rouges de mouton recouverts d'opsonines. Cette incapacité de fixer les anticorps cytophiles est également partagée par les éosinophiles, les lymphocytes et les mastocytes. En revanche, dans des tests identiques, les macrophages fixent ces anticorps cytophiles IgG (labiles in vitro à 37°C) et phagocytent mieux les globules opsonisés.

b) Le deuxième mécanisme effecteur décrit avec des macrophages fait intervenir les IgE.

En 1969, SMITHERS et TERRY<sup>359</sup> avaient observé quelques cas de transfert passif de résistance chez le rat par du sérum. Ils avancèrent l'hypothèse que le rôle protecteur constaté pourrait être attribué aux anticorps réaginique.

CAPRON et coll. (1975 a<sup>70</sup> et b)<sup>71</sup> ont récemment découvert in vitro un mécanisme cytotoxique pour les schistosomules, où interviennent les IgE. En effet, lorsqu'ils sont incubés dans du sérum de rat Fisher immun vis-à-vis de S. mansoni, les macrophages péritonéaux de rats normaux syngéniques acquièrent la capacité d'adhérer très fortement aux schistosomules de cette espèce, les enrobant complètement en 3 à 4 heures. La mortalité des schistosomules ainsi agressés est de 70 % après 20 heures de contact (CAPRON, 1974)<sup>69</sup>. Le sérum des rats infestés contient un facteur cytophile qui se fixe sur les macrophages normaux, les rendant capables de réagir spécifiquement avec l'antigène représenté par le schistosomule. L'enrobage ne semble pas supérieur si l'on remplace les macrophages d'animaux sains par des macrophages provenant d'animaux immuns.

Le facteur cytophile impliqué dans ce phénomène est l'IgE.

En effet :

- 1) il est thermolabile, son activité disparaissant par chauffage à 56°C pendant 3 heures ;

- 2) il est cryorésistant, puisque les sérums congelés à - 20°C conservent la plus grande partie de leur activité ;
- 3) il est détruit par le mercaptoéthanol ;
- 4) il ne dépend pas du complément ;
- 5) mais surtout, une immunoadsorption des sérums par des anticorps spécifiques de la chaîne lourde epsilon des immunoglobulines entraîne la disparition de l'activité cytotoxique.

De plus, les macrophages incubés dans un sérum à activité cytophile forment des rosettes avec des hématies porteuses d'anti-IgE, et l'utilisation d'anti-IgE marquées à la fluorescéine a montré que les macrophages ainsi incubés, et eux seuls, sont fluorescents.

Les anticorps cytotoxiques impliqués dans ce mécanisme sont donc des IgE. Ces immunoglobulines E sont spécifiques, non seulement du parasite, mais de son espèce : en effet, les sérums d'animaux infestés avec S. haematobium rendent pas les macrophages normaux cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni.

L'absorption des sérums de rats immuns à Schistosoma mansoni par des quantités croissantes d'un sérum de lapin anti-S. mansoni entraîne une diminution progressive de l'adhérence des macrophages. De même, le passage de ces sérums de rat sur un immunoadsorbant solide réalisé avec les IgG anti-S. mansoni montre une décroissance hautement significative de l'enrobage des schistosomules par les macrophages (CAPRON et coll., 1975)<sup>2</sup>.

Il semble donc que ce sont les immunocomplexes à IgE présents dans le sérum des rats immuns qui sont impliqués dans l'adhérence des macrophages aux schistosomules. Les mêmes auteurs ont montré, par un marquage à l'iode 125 d'anticorps spécifiques des IgE de rat, qu'au moins deux antigènes circulants ont été identifiés dans les sérums de rats infestés ; ces deux antigènes sont probablement impliqués dans la production d'IgE et d'immunocomplexes à IgE.

Enfin, des augmentations significatives du taux en IgE ont été obtenues par immunisation de rats sains avec du sérum de rats infectés depuis 7 semaines, probablement par l'administration à ces animaux des immunocomplexes à IgE présents dans les sérums (CAPRON et coll., 1975)<sup>72</sup>.

Immunoglobulines E et anticorps cytotoxiques apparaissent au même moment dans le cycle parasitaire, c'est-à-dire vers le 30<sup>ème</sup> jour de l'infestation, immédiatement après le rejet des vers. Leur courbe suit une évolution parallèle entre le 45<sup>ème</sup> et le 90<sup>ème</sup> jour, l'activité cytophile persistant plus longtemps que l'activité létale.

L'établissement de l'immunité à la réinfection chez le rat Fisher s'effectue entre la 5<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine et atteint un maximum aux environs de la 9<sup>ème</sup> semaine à un moment où les macrophages peuvent être sensibilisés par les anticorps réaginique et où l'anticorps létal est à son taux d'activité optimal.

L'attaque médiée par anticorps peut donc être considérée comme la première étape dans la réponse immune de la schistosomiase.

Si l'efficacité des mécanismes in vitro qui viennent d'être décrits n'est pas encore prouvée in vivo, il apparaît néanmoins que l'activité cytotoxique de ces cellules résulte de la coopération ou de l'association d'anticorps et de cellules normales non sensibilisées.

On peut toutefois se demander s'il n'existe pas une intervention directe des cellules immunocompétentes dans l'immunité à la réinfection. Que connaissons-nous de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ?

### C - Immunité à médiation cellulaire

La réinfestation s'accompagne de manifestations cliniques que l'on attribue à des mécanismes cellulaires du système immunitaire, distincts des réactions notées pour l'hypersensibilité immédiate (anticorps réaginique) ou de type Arthus (anticorps précipitants).

Au niveau de la peau, on assiste à une infiltration inflammatoire, à une dermatite persistante, à un afflux de leucocytes polymorphonucléaires dans l'épiderme, à une hyperkératose et à une réaction eczémateuse. Ces réactions sont plus importantes chez les animaux résistants que chez les animaux normaux.



Les ganglions lymphatiques axillaires et inguinaux subissent une hyperplasie réticulaire.

Au niveau des poumons chez les animaux immuns, la réaction inflammatoire est très importante autour des schistosomules : gonflement endothélial, amas intravasculaires de leucocytes, oedème péricapillaire. Une grande partie des schistosomules ayant survécu à la migration depuis le point de pénétration dans l'organisme est détruite au niveau des poumons.

Autour des oeufs se développe une intense réaction cellulaire : le granulome périovulaire. Cette réponse est déclenchée par les antigènes d'oeufs (WARREN et coll., 1967)<sup>399</sup>. L'hypersensibilité est transférable à un receveur sain par les cellules spléniques de l'hôte sensible, non par son sérum.

Il est possible d'inhiber la formation de ces granulomes par immunosuppression chimique, par thymectomie et par l'injection de sérum anti-lymphocytaire hétérologue (DOMINGO et coll., 1967<sup>110</sup>; DOMINGO et WARREN, 1967<sup>111</sup> - 1968)<sup>112</sup>.

Le granulome qui se forme autour des oeufs est le facteur aggravant principal de la bilharziose humaine. Ces foyers inflammatoires désorganisent le foie et la rate, entraînant l'hépatite et la splénomégalie typiques de la forme hépatosplénique de la schistosomiase à S. mansoni.

La sensibilisation de la population lymphocytaire de l'hôte parasité est donc responsable de l'aggravation de la maladie. Cependant, de même que l'on a vu les réactions allergiques, avec leur cortège de manifestations cliniques néfastes, être compensées par le rôle favorable des réagines à l'encontre des larves de réinfestation, n'est-il pas possible de découvrir un aspect positif à ces réactions de l'immunité cellulaire ?

Les lymphocytes de rats Fisher infestés depuis 20 jours, cultivés en présence d'antigène total de S. mansoni, libèrent un facteur cytotoxique, une lymphotoxine, qui passe en solution dans le milieu de culture. En effet, le surnageant acellulaire de telles cultures détruit les schistosomules en quatre jours, en absence de complément (CAPRON-DUPONT, 1974)<sup>74</sup>. L'action de cette lymphotoxine sur les schistosomules semble différente de celle observée avec l'anticorps léthal : les images de microscopie électronique montrent un tégument intact mais un cytoplasme fortement vacuolisé et ballonné.

Comme dans le cas du transfert passif du sérum, les essais de transfert de cellules immunes réalisés jusqu'à ces derniers mois, s'étaient soldés par des échecs : chez la souris (HUNTER et coll., 1967)<sup>181</sup> ou chez le rat (MADDISON et coll., 1970b)<sup>247</sup> aucune protection n'était transmise par ce moyen aux receveurs de cellules. Un succès vient d'être obtenu par PHILLIPS et coll. (1975)<sup>309</sup> avec les lymphocytes thymo-dépendants spléniques et d'exudats péritonéaux de rats immunisés depuis 20 à 30 jours.

Notons toutefois que l'élimination des cellules immunocompétentes, chez un singe Rhésus immun, par du sérum anti-lymphocytaire, n'entraîne aucune diminution de la protection acquise (MADDISON et coll., 1971)<sup>248</sup>.

#### - Hypersensibilité retardée et immunité cellulaire

L'hypersensibilité retardée (HSR) est généralement considérée comme un témoin de l'existence d'une immunité cellulaire.

##### - Chez le rat :

Chez le rat, l'infestation entraîne l'apparition de phénomènes d'hypersensibilité retardée, objectivés par les tests in vitro tels qu'inhibition d'étalement des macrophages, transformation lymphoblastique, décelables précocement dès le 10ème jour. Leur maximum se situe aux environs de la 3ème semaine, précédant de peu le rejet de la majeure partie de la population parasitaire qui se produit entre le 21ème et le 36ème jour (CAPRON-DUPONT, 1974)<sup>74</sup>. Ces observations concordent avec celles de PHILLIPS et coll. (1975)<sup>309</sup> qui ont obtenu une certaine résistance d'animaux sains par transfert de cellules provenant d'animaux infectés depuis 3 à 4 semaines. Tous ces auteurs notent toutefois que vers la 5ème semaine, ces manifestations d'une immunité cellulaire semblent disparaître (tests cellulaires in vitro négatifs et transferts cellulaires infructueux).

Une telle situation a été observée dans diverses infections humaines où se produit une disparition brutale des témoins de l'immunité cellulaire précédemment positif. Cet évènement, souvent nommé "désensibilisation" serait provoqué par un relargage antigénique excessif.

Les tuberculeux et certains lépreux, deux cas où sont impliquées les Mycobactéries, présentent des variations cycliques de leurs tests cutanés avec une disparition simultanée au niveau du sang des lymphocytes sensibilisés détectables par la transformation lymphoblastique (MYRVANG et coll., 1973)<sup>276</sup>.

On en trouve un autre exemple dans la leishmaniose, à la fois chez l'homme et chez le cobaye infecté expérimentalement par Leishmania enriettii. La phase évolutive de la maladie semble correspondre avec une disparition temporaire à la fois des tests cutanés positifs et des lymphocytes sensibilisés circulants (BRYCESON et coll., 1974)<sup>51</sup>.

COLLINS et MACKANESS (1970)<sup>87</sup> avaient montré qu'une forte dose intraveineuse de BCG chez la souris n'induit pas de réactivité cutanée à la tuberculine, mais conduit à l'apparition dans la rate d'une population cellulaire capable de conférer cette réactivité à la tuberculine chez un receveur sain.

Récemment, ROOK (1975)<sup>322</sup> a montré que des souris infectées par Mycobacterium ulcerans développent une immunité cellulaire temporaire qui disparaît au fur et à mesure où la charge bactérienne augmente, jusqu'à la mort des animaux. Les cellules ganglionnaires des animaux proches de l'évolution fatale se transforment spontanément in vitro, la tuberculine inhibant cette transformation spontanée. Enfin, les animaux ne présentent pas d'hypersensibilité cutanée.

Ces divers exemples ont un point commun : la surcharge du système immunitaire en antigènes. Or chez le rat, le phénomène de l'élimination spontanée des vers libère dans l'organisme de l'animal, brutalement, une énorme quantité d'antigènes schistosomiens.

Toutefois, on ne peut éliminer la possibilité d'une intervention de cellules suppressives, car cette négativation des témoins de l'immunité cellulaire a été observée dans d'autres affections, dans le cas où il ne semble pas y avoir d'inondation antigénique (GERSHON et coll., 1974<sup>145</sup>; GREENWOOD, 1974)<sup>156</sup>.

Quel est le rôle de l'immunité cellulaire chez le rat ? Dans quelle mesure est-elle responsable du rejet des vers observé dans le phénomène de "self-cure" ? On peut se le demander, puisque les traitements immunosuppresseurs (irradiation aux rayons X, drainage du canal thoracique, utilisation du sérum antilymphocytaire, traitement à l'Imuran ou au Cytoxan) qui abolissent l'immunité cellulaire, sont sans effet sur l'élimination des vers observée chez cet animal.

De plus, si le rejet des vers et l'atténuation des réactions caractéristiques de l'immunité cellulaire semblent correspondre au déclenchement d'une phase humorale, support de la résistance à la réinfection qui apparaît simultanément, l'immunité cellulaire n'est probablement pas abolie et pourrait participer à nouveau aux défenses spécifiques de l'organisme contre les larves de réinfection dès que l'avalanche antigénique provoquée par le rejet des vers serait absorbée et réduite au niveau des cellules phagocytaires, comme cela se produit pour les animaux recevant une trop forte dose de BCG.

Dans ce cas, les mécanismes cellulaires, décrits plus haut, pourraient à nouveau intervenir et participer activement à l'immunité contre la réinfection.

- Chez l'homme

Chez l'homme, on observe un parallélisme étroit entre l'hypersensibilité retardée et le nombre de vers hébergés par l'hôte. 60 % des bilharziens présentent des manifestations d'HSR : réactions intradérmiques et tests cellulaires in vitro positifs (VERNES et coll., 1973<sup>393</sup>; WARREN et coll., 1973 a et b<sup>400</sup>; CAMUS, 1974)<sup>61</sup>. L'intensité de cette HSR semble la conséquence directe de l'intensité de l'infestation, donc du stimulus antigénique.

Toutefois, il est possible de supprimer l'HSR sans supprimer la résistance à une infection, ou inversement d'induire une HSR sans développer de protection.

Chez le cobaye, la désensibilisation à la tuberculine est réalisée sans perte de la protection antituberculeuse. Enfin, il est possible de transférer passivement de l'hypersensibilité retardée à des receveurs sains par des cellules lymphoïdes, sans conférer d'immunité.

Ces diverses manifestations de désensibilisation, phénomène qui semble lié à celui évoqué plus haut dans la "disparition" de l'immunité cellulaire chez le rat au moment de la "self cure", correspondent à une déflation des cellules immunocompétentes circulantes, faisant suite à leur séquestration, induite par l'antigène, au niveau des organes lymphoïdes (HALL et MORRIS, 1965<sup>157</sup>; ZATZ et LANCE, 1971<sup>427</sup>; BULLOCK, 1974)<sup>53</sup>.

La négativation des tests de l'immunité cellulaire, in vivo comme in vitro, ne reflète finalement qu'une profonde modification de la distribution des lymphocytes dans l'organisme selon la situation immunologique, et ne signifie probablement pas l'abolition de l'immunité cellulaire en tant que telle.

Il semble enfin, que l'intensité des réactions d'HSR soit inversement proportionnelle au degré d'adaptation hôte-parasite. Les réactions visant à éliminer les vers pourraient être atténuées chez les hôtes susceptibles par des anticorps bloquants ou une déviation immunitaire entraînant l'induction d'une tolérance. La combinaison de ces différents éléments permettrait à l'hôte de présenter un état de résistance plus ou moins grand à l'infection, une faculté plus ou moins importante de rejeter les schistosomes adultes qu'il héberge, et par voie de conséquence une immunité humorale dont l'efficacité serait en rapport avec la stimulation antigénique ainsi induite. L'immunité à la réinfection serait alors proportionnelle à l'ampleur de cette phase à caractère humoral.

Il est, bien sûr, délicat d'extrapoler d'un système à l'autre, les connaissances acquises dans un couple hôte-parasite. La susceptibilité ou la résistance variable des hôtes vis-à-vis des divers parasites peut entraîner des séquences différentes dans les processus immunologiques mis en oeuvre. Cependant, le schéma observé chez le rat, d'une phase cellulaire pour le rejet des vers, suivie d'une phase humorale porteuse de l'immunité à la réinfection, constitue un modèle extrêmement intéressant dont il convient de rechercher une éventuelle corrélation avec ce qui se passe chez l'être humain.

Il ressort néanmoins de cet ensemble d'éléments que l'immunité cellulaire, en tant que telle, ne joue pas le rôle principal dans l'expression de l'immunité à la réinfection, mais qu'elle participe plutôt à son établissement.

### CONCLUSION

L'observation majeure réalisée dans l'étude des mécanismes de l'immunité à la réinfection par les schistosomes est que cette défense s'exerce contre la forme larvaire immature du parasite, dans les quatre jours qui suivent sa pénétration dans l'organisme. Au delà de cette période, le schistosomule acquiert des antigènes d'hôte qui le mettent relativement à l'abri des défenses immunitaires de l'organisme et permettent la longue survie des vers adultes chez les hôtes susceptibles.

Le second point qui mérite de retenir l'attention est que la cytotoxicité pour les schistosomules, au moins in vitro, résulte de la coopération d'anticorps IgG ou IgE, et parfois du complément, avec diverses cellules, et que ces mécanismes fonctionnent parfaitement avec des cellules normales provenant d'animaux sains.

L'ensemble des défenses actuellement connues, et dont il reste à prouver l'efficacité in vivo, sont représentées par les mécanismes suivants :

- a) un anticorps cytotoxique (ou léthal) de la classe des IgG, dépendant du complément, est directement actif sur la larve en 48 à 72 heures ;
- b) des leucocytes polymorphonucléaires et des neutrophiles, associés à des IgG et du complément, présentent une cytotoxicité marquée à l'égard des schistosomules en 20 à 44 heures ;
- c) des éosinophiles, en collaboration avec des IgG<sub>1</sub> présentes dans le sérum des animaux parasités, sans intervention du complément, sont actifs en une quinzaine d'heures ;
- d) des macrophages "armés" soit à 4°C par des anticorps cytophiles IgG<sub>1</sub>, soit à 37°C par des anticorps réaginique IgE, indépendamment du complément, présentent une importante cytotoxicité contre les larves entre 15 et 24 heures ;
- e) enfin, une lymphotoxine produite par les lymphocytes sensibilisés d'un animal immun lorsqu'ils entrent en contact avec des antigènes schistosomiens est capable de détruire les schistosomules en quatre jours.

On voit que la plupart des mécanismes font intervenir les immunoglobulines. Il est tentant d'essayer de stimuler la production de ces anticorps afin d'accroître l'efficacité des défenses des sujets soumis à une infection.

Voyons comment les immunoglobulines sont synthétisées et comment élever leur taux.

CHAPITRE II

LES STIMULANTS DE LA REPOSE HUMORALE

Les immunostimulants ou adjuvants de l'immunité (du latin "adjuvare : aider") sont des produits qui, employés en association avec des vaccins antigéniques spécifiques, élèvent le niveau de l'immunité au dessus de celui auquel le vaccin injecté seul est capable de parvenir (RAMON, 1926)<sup>315</sup>. Cette définition très générale est moins exclusive que celle donnée par MUNOZ (1964)<sup>270</sup> qui définit un adjuvant comme une substance qui augmente la réponse en anticorps vis-à-vis d'un antigène lorsqu'elle est injectée simultanément ou dans un laps de temps proche de l'injection de l'antigène. Cette définition couvre toute substance qui augmente les réactions d'hypersensibilité directement liées aux anticorps ou supposées liées à la réponse anticorps.

WHITE (1967)<sup>415</sup> accorde l'appellation d'adjuvant aux substances qui, injectées avec un antigène :

- 1) transforment une substance apparemment non-antigénique en un antigène efficace ;
- 2) augmentent le taux d'anticorps circulants ;
- 3) entraînent un état d'hypersensibilité retardée ou l'augmentent ;
- 4) produisent certains états pathogènes tels que thyroïdite, aspermatogénèse, encéphalomyélite allergique, polyarthrite.

JOLLES et PARAF (1973)<sup>181</sup> définissent comme adjuvant ou substance immunostimulante, tout produit qui agit :

- 1) sur un haptène ou un antigène en augmentant ses propriétés ou
- 2) sur les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (ceci comprenant la synthèse d'anticorps, l'anaphylaxie, l'hypersensibilité retardée, les maladies allergiques et les réactions de greffe).

Jusqu'à ces dernières années, la plupart des adjuvants ont été constitués par des corps bactériens entiers, morts ou vivants, dont les effets complexes s'exercent simultanément et indistinctement sur l'immunité humorale et sur l'immunité cellulaire. Or, il apparaît que, dans certains cas, il est préférable de stimuler l'une plutôt que l'autre réponse. Ainsi, pour obtenir l'immunité anti-tumorale la plus efficace avec un rejet de tumeur maximum, il serait nécessaire d'obtenir une forte potentialisation de l'immunité cellulaire et une suppression de la réponse humorale. Inversement, dans la chirurgie des greffes, il serait souhaitable de favoriser plutôt la synthèse d'anticorps facilitants ou bloquants et de supprimer



la réponse cellulaire. Dans une réponse humorale, il peut être intéressant de favoriser la synthèse d'une classe d'immunoglobulines plutôt que les autres : ainsi, dans l'immunité vis-à-vis de la schistosomiase, cherchons-nous à privilégier la production d'anticorps réaginique (IgE) ou d'anticorps cytotoxiques (IgG).

Depuis une dizaine d'années, l'on s'est penché sur le mode d'action des adjuvants, d'une part vis-à-vis des antigènes (DRESSER, 1961<sup>113</sup>; SELA et coll., 1962)<sup>346</sup>, d'autre part vis-à-vis des cellules immunocompétentes (NOWELL, 1960<sup>292</sup>; UNANUE et coll., 1969)<sup>389</sup>. Parallèlement, l'on cherche à déterminer la nature chimique des substances capables de susciter plutôt une réponse humorale ou de solliciter plutôt l'immunité cellulaire (WHITE et coll., 1958<sup>411</sup>; KIND et ROFFLER, 1961)<sup>211</sup>.

Avant d'analyser le mode d'action des adjuvants, voyons tout d'abord le mécanisme normal de la réponse immune.

## I - MECANISMES DE LA REponse HUMORALE

Si la synthèse d'anticorps est assurée par un seul type de cellule, le processus qui aboutit au déclenchement de la production d'anticorps nécessite l'intervention et la coopération de plusieurs cellules.

### A) Les cellules productrices d'anticorps

Selon la théorie clonale (BURNET, 1959)<sup>54</sup> sur l'origine des cellules productrices d'anticorps, l'antigène déclenche, parmi les cellules sensibles aux antigènes, la prolifération du clone cellulaire qui se trouve le plus adapté à ses déterminants antigéniques (théorie de la mutation somatique).

La cellule sensible à l'antigène, dont le précurseur est originaire de la moelle osseuse, est un petit lymphocyte, le lymphocyte B (GOWANS, 1965)<sup>152</sup>. Spontanément tous les lymphocytes B synthétisent une petite quantité d'immunoglobulines (UHR et VITETTA, 1972)<sup>386 bis</sup>.

L'antigène se fixe sur les lymphocytes B au niveau de récepteurs spécifiques répartis à la surface des cellules. Ces récepteurs sont des immunoglobulines dont la spécificité anticorps correspond à l'un des

déterminants antigéniques de l'antigène (MITCHISON, 1967)<sup>262</sup>. La fixation de l'antigène à la surface des cellules B provoque la formation d'un réseau d'immunoglobulines, aggrégées par l'antigène, une sorte de microprécipitation antigène-anticorps permise par la "flottaison" des molécules glycoprotéiniques d'immunoglobulines dans la double couche lipidique.

Une stimulation convenable des lymphocytes entraîne une augmentation de la taille des cellules dont le diamètre atteint 15  $\mu\text{m}$  : ces cellules subissent la transformation blastique.

Pour certains auteurs, la seule liaison de l'antigène sur le lymphocyte B constitue le signal suffisant pour le déclenchement de la transformation lymphoblastique. Ainsi MITCHISON (1968)<sup>262 bis</sup> estime que l'aggrégation des récepteurs par l'antigène, de son propre fait s'il est thymoindépendant, ou avec l'aide des lymphocytes T ou des macrophages s'il est thymodépendant, conduit à la stimulation de la synthèse des anticorps. COUTINHO et MOLLER (1974)<sup>91</sup> adoptent la même position en précisant toutefois que les récepteurs de ce signal unique sont distincts, quoiqu'adjacents, des récepteurs immunoglobuliniques aggrégés par les déterminants antigéniques de la molécule inductrice.

Pour d'autres auteurs, la transformation blastique nécessite deux signaux. Le premier, fourni par la fixation de l'antigène, est tolérogène (DRESSER, 1970)<sup>117</sup>, c'est-à-dire qu'il aboutit à la paralysie de la cellule et à l'absence de synthèse des anticorps correspondants, à moins qu'un second signal, activateur (l'antigène lui-même s'il est thymoindépendant, ou une cellule coopératrice si l'antigène est thymodépendant), n'entraîne le lymphocyte B dans sa transformation et dans la synthèse d'anticorps (BRETSCHER, 1975<sup>48</sup>; COHN, 1975)<sup>83</sup>. Ce second signal peut également être fourni par un adjuvant. Dans cette théorie, la rupture de tolérance par les adjuvants s'explique très bien.

Les antigènes capables de provoquer seuls la prolifération et la maturation des lymphocytes B sont appelés thymo-indépendants, puisqu'ils se passent de l'assistance des lymphocytes T. Ces antigènes sont en général des polymères de grande taille, possédant plusieurs copies du même déterminant antigénique sur leur molécule (le lévane, les polysaccharides du pneumocoque, le polyvinyl-pyrrolidone (PVP), certains virus, la flagelline polymérisée. La répétition des déterminants sur la même molécule facilite probablement la formation d'un réseau stable sur les récepteurs membranaires des lymphocytes B, et permet la stimulation des structures correspondant au

signal initiateur de la transformation lymphoblastique. Dans ce cas, cependant, les antigènes synthétisés sont exclusivement de la classe IgM. Le PVP, toutefois, peut entraîner une synthèse d'IgG (GREAVES et coll., 1974)<sup>155</sup>. Aucune référence ne signale la production d'IgE par des antigènes thymo-indépendants.

Les cellules convenablement stimulées se transforment en plasmocytes excréteurs d'anticorps, par des mitoses accélérées qui les font passer par les stades de grands lymphocytes et de plasmocytes immatures. C'est probablement une modification conformationnelle des protéines des récepteurs de surface qui entraîne l'activation ou l'inhibition de certaines enzymes (adényl ou guanyl-cyclase, phosphodiesterase), ayant pour conséquence une modification du rapport intra-cellulaire des nucléotides cycliques (principalement AMPc et GMPc) aboutissant finalement au déclenchement des mitoses (WATSON, 1975)<sup>402</sup>.

On verra que d'autres molécules que l'antigène peuvent entraîner la transformation blastique : des anticorps anti-immunoglobulines de surface (TAYLOR et coll., 1971)<sup>382</sup>, divers mitogènes végétaux présentant des affinités pour certains résidus glucidiques, des endotoxines bactériennes, des substances sécrétées par les lymphocytes thymodépendants... Il semble que toutes ces substances provoquent la même activation des lymphocytes B que celle obtenue avec la liaison de l'antigène.

Le plasmocyte mûr survit quelques jours, au maximum quelques semaines, sans division. Certains grands lymphocytes n'évoluent pas en plasmocytes mais font retour par division à la forme petits lymphocytes, probablement à l'origine des cellules-mémoires de l'immunité humorale. Ces petits lymphocytes circulants peuvent rester des années sans se diviser (GOWANS et UHR, 1966<sup>153</sup>; MILLER et coll., 1971)<sup>258</sup>.

Un lymphocyte ne sécrète qu'une seule spécificité anticorps à la fois. La classe sécrétée change pendant la réponse immune : IgM pendant les 48 premières heures d'une stimulation antigénique, IgG ultérieurement. NOSSAL et coll. (1971)<sup>291</sup> ont mis en évidence des cellules ayant des IgM en surface et des IgG à l'intérieur. Il se produit donc, dans certaines conditions, une commutation dans la synthèse de l'ARN messager, le "switch" IgM-IgG, qui déclenche un changement dans la transcription de l'ADN des gènes IgM en faveur des gènes IgG, sous l'influence des lymphocytes thymodépendants. Les deux types d'immunoglobulines se combinent au même déterminant antigénique.

On a observé de même, des cellules contenant simultanément des IgG et des IgA (COOPER, 1971)<sup>89</sup>. En revanche, les IgE seraient produites par une classe particulière de lymphocytes B (KISHIMOTO et ISHIZAKA, 1972)<sup>212</sup>.

Il y a une localisation préférentielle des cellules précurseurs à travers l'organisme. Ainsi, les lymphocytes B qui donneront en majorité des IgA, sont principalement localisés dans le tissu sous-épithélial des glandes exocrines et répondent aux antigènes qui entrent localement (ingestion, inhalation) (CRABBE et coll., 1965)<sup>92</sup>. On trouve les IgA dans le lait, le mucus respiratoire et intestinal, la salive, les larmes. Elles protègent les surfaces des muqueuses des invasions microbiennes.

Les lymphocytes B synthétisant les IgE sont abondants dans les muqueuses des tractus respiratoires et gastro-intestinal, ainsi que dans les ganglions qui les drainent (TADA et ISHIZAKA, 1970)<sup>377</sup>. On trouve un taux important d'IgE dans les sécrétions exocrines de la sphère digestive et de la sphère respiratoire.

Il existe probablement certains antigènes capables de stimuler un ou plusieurs clones cellulaires spécifiques de la synthèse des IgE (BROSTOFF et coll., 1969)<sup>49</sup>. Ce point est capital dans le cas des infections parasitaires : quels sont les allergènes porteurs de cette propriété ?

Le plus souvent, cependant, le lymphocyte B seul avec son antigène inducteur est insuffisant pour déclencher la synthèse d'anticorps : il a besoin d'une coopération cellulaire.

## B) La coopération cellulaire

### 1) Les lymphocytes

Des souris privées de tout lymphocyte par thymectomie et irradiation, ne produisent un taux optimum d'anticorps contre des globules rouges de mouton que reconstituées avec les deux types de lymphocytes (B et T). Cette coopération devint évidente avec l'effet "carrier" (MITCHISON, 1971)<sup>266</sup> : lorsqu'un animal est vacciné, dans un premier temps, avec un haptène couplé à une protéine, la réinjection de la même molécule, quelques semaines plus tard, entraîne une synthèse rapide et abondante d'anticorps contre l'haptène et contre la protéine. Mais si cette deuxième injection est réalisée en

couplant l'haptène avec une autre protéine, la forte augmentation de la réponse secondaire n'a pas lieu. Le mécanisme cellulaire nécessite la reconnaissance non seulement de l'haptène, mais de son "porteur" ("carrier"). La cellule responsable de la reconnaissance de la protéine porteuse est le lymphocyte T (thymo-dépendant). Ces cellules T remplissent une fonction d'assistance ("helper"), sur laquelle MITCHISON (1971)<sup>264-5</sup> a émis l'hypothèse de la focalisation : la fixation simultanée d'un antigène sur un lymphocyte B et sur un lymphocyte T, crée des liaisons supplémentaires qui stabilisent la molécule immunogène sur les récepteurs membranaires immunoglobuliniques des lymphocytes B. Cette stabilisation est utile à l'antigène selon la théorie du signal unique, ou utile à la cellule coopérante pour fournir le second stimulus dans la théorie des deux signaux.

Des antigènes tels que la sérumalbumine ou d'autres protéines à une seule chaîne possèdent un déterminant-carrier et un déterminant hapténique ou analogue. Ce qui concorde avec l'observation que généralement les antigènes thymo-dépendant (c'est-à-dire nécessitant l'assistance des cellules T) ont plus d'un déterminant antigénique (RAJEWSKY et coll., 1969)<sup>314 bis</sup>.

Les lymphocytes T sont nécessaires à la production des IgE par les lymphocytes B correspondants (KISHIMOTO et ISHIZAKA, 1973)<sup>213</sup> : en effet, la thymectomie néo-natale déprime la réponse immunitaire à IgE par absence de cellules helper : cependant, la thymectomie chez l'adulte donne une augmentation de la réponse réaginique (peut-être par élimination de cellules suppressives) (OKUMURA et TADA, 1971)<sup>298</sup>. Les souris athymiques présentent un déficit en IgE (MICHAEL et BERNSTEIN, 1973)<sup>254</sup>. Une déplétion en cellules T, par thymectomie et irradiation, déprime la réponse à IgE chez le rat infesté par Nippostrongylus brasiliensis, comme elle déprime les réponses immunes dans d'autres infections parasitaires (OGILVIE et JONES, 1967)<sup>295</sup>; WALLS et coll., 1973)<sup>398</sup>. Le rejet des vers est également déprimé et la production d'oeufs prolongée par rapport aux témoins non traités.

Les cellules T agissent soit par contact direct avec les lymphocytes B, soit par relargage de facteurs diffusibles agissant à courte distance au voisinage des lymphocytes B. De nombreux médiateurs ont été identifiés : certains, libérés spécifiquement par l'antigène, coopèrent de façon non spécifique avec tous les lymphocytes B (l'ESF : enhancing soluble factor) non dialysable (RUBIN et COONS, 1972)<sup>329</sup>, un facteur dialysable libéré par les

lymphocytes T syngéniques sensibilisés (ADAMS, 1975)<sup>5</sup>, le TRF : T replacing factor, de P.M. 45.000, produit par une stimulation allogénique (SCHIMPL et WECKER, 1975)<sup>340</sup>, l'AEF : allogenic effect factor (ARMERDING et KATZ, 1974)<sup>15</sup>; tandis que d'autres médiateurs coopèrent spécifiquement avec les lymphocytes B correspondant à l'antigène inducteur (immunoglobuline X ou T liée à l'antigène (FELDMANN et BASTEN, 1972)<sup>130</sup>, le TCF : T cooperating factor, de P.M. 50.000, possédant des déterminants du gène Ir (TAUSSIG et MUNRO, 1974)<sup>381</sup>.

Des facteurs solubles sont sécrétés par les lymphocytes pour exercer localement, sur les lymphocytes B à IgE, leur action "helper" (KISHIMOTO et ISHIZAKA, 1973<sup>214</sup> et 1975<sup>215</sup>; TADA et coll., 1973) ou une action suppressive (KISHIMOTO et ISHIZAKA, 1974)<sup>214 bis</sup>.

Les lymphocytes B à IgE ne présentent pas la même sensibilité aux diverses influences des lymphocytes T que les lymphocytes B à IgG. Ainsi, les cellules B à IgE sont insensibles au puissant stimulus non spécifique déclenché chez les cellules T par un effet allogénique temporaire, comme une réaction du greffon contre l'hôte, par lequel les lymphocytes B à IgG sont fortement stimulés (KATZ et coll., 1974)<sup>204</sup>.

De faibles doses d'antigène facilitent la réponse à IgE (REVOLTELLA et OVARY, 1969)<sup>318</sup> surtout si les stimulations antigéniques sont espacées (LEVINE et CHANG, 1971)<sup>234</sup>. Les bons allergènes (initiateurs d'IgE) sont de médiocres immunogènes. Pour produire des IgE, les bons immunogènes doivent être placés dans des conditions de faible stimulation.

Des différences génétiques portant sur l'aptitude à produire les IgE ont été signalées chez l'animal (LEVINE et VAZ, 1970)<sup>233</sup>; SCHWARTZMANN et coll., 1971)<sup>342</sup>.

Signalons que les IgG ont un rôle suppressif sur la production d'IgE (TADA et OKUMURA, 1971)<sup>378</sup>; STRANNGARD et BELIN, 1970)<sup>370</sup>; STRANNEGARD, 1971)<sup>371</sup>.

## 2) Les macrophages

Une troisième cellule intervient dans la coopération : le macrophage (FELDMANN, 1972)<sup>129</sup>. Si l'identité exacte de ce troisième type de cellule n'est pas établie (MOSIER et COPPLESON, 1968)<sup>269</sup>; ROWLEY et coll., 1975)<sup>328</sup>, tous les auteurs s'accordent pour reconnaître qu'il s'agit d'une population de

cellules adhérentes dont la présence est nécessaire pour obtenir une réponse immune aux antigènes thymo-dépendants. Les facteurs produits par les lymphocytes T induisent une tolérance chez des cellules spléniques débarrassées des cellules adhérentes (FELDMANN, 1973)<sup>132</sup>. Du sérum anti-macrophage et les agents qui interfèrent avec les fonctions macrophagiques empêchent la pleine expression de la réponse immune.

Des antigènes pauvrement immunogènes lorsqu'ils sont injectés sous forme soluble se révèlent hautement immunogènes lorsqu'ils sont introduits fixés sur des macrophages (UNANUE et ASKONAS, 1968<sup>388</sup>; MITCHISON, 1969<sup>263</sup>; SPITZNAGEL et ALLISON, 1970)<sup>364</sup>. Il n'y a jamais de paralysie immune avec des antigènes hétérologues injectés à un animal sous cette forme. Pour KATZ et UNANUE (1973)<sup>203</sup>, le rôle du macrophage n'est pas purement statique car des molécules antigéniques liées par covalence à la surface de particules inertes n'induisent pas la production d'anticorps. Cette observation ne correspond pas à celle de FELDMANN et coll. (1974)<sup>133</sup> qui ont obtenu une bonne réponse humorale avec un antigène couplé à de la Sépharose.

Le rôle du macrophage (ou du "troisième type cellulaire") dans la réponse humorale concerne : l'élaboration d'antigènes immunogènes ; la présentation de ces antigènes en surface ; le recueil à la surface des lymphocytes T des facteurs de coopération ; et enfin la fabrication de facteurs de coopération ou de facteurs stimulants la prolifération des lymphocytes B.

L'intervention du macrophage doit donc être considérée à deux niveaux :

- a) au niveau du traitement de l'antigène, par l'élaboration d'une molécule immunogène ;
- b) au niveau des lymphocytes, par une régulation de leurs fonctions.

a) Elaboration d'antigènes immunogènes

Le macrophage joue un rôle important dans la régulation des mécanismes immuns, en modulant la quantité d'antigène qui atteint les cellules immunocompétentes. Il diminue les possibilités de développement d'une tolérance, soit de haute zone, en réduisant la quantité d'antigène, soit de basse zone, en concentrant le petit nombre de molécules en circulation.

d) La fixation de l'antigène : Si la plus grande partie des molécules antigéniques qui entrent en contact avec les macrophages sont endocytées et détruites, 1 à 5 % d'entre elles se maintiennent en surface (UNANUE et CEROTTINI, 1970)<sup>390</sup>. Ces molécules préservées semblent responsables de la plus grande partie de l'immunogénicité de l'antigène. En effet, lorsqu'elles sont éliminées par trypsinisation ou masquées par leurs anticorps spécifiques, les macrophages n'induisent plus de réponse immune.

Il y a une relation entre la taille des molécules, le degré de fixation, l'importance de la pinocytose et la persistance des molécules retenues en surface : les grandes molécules, comme l'hémocyanine, se fixent bien aux macrophages, sont rapidement pinocytées et ne subsistent à la surface qu'en petit nombre, capable de persister longtemps. En revanche, les petites molécules, comme l'albumine et les immunoglobulines, sont généralement peu adsorbées et ne sont pas très solidement fixées à la membrane (SCHMIDKE et UNANUE, 1971)<sup>341</sup>. Ces mêmes molécules, polymérisées se fixent mieux aux macrophages et subissent un sort voisin de celui de l'hémocyanine.

La liaison de l'antigène à son anticorps n'est pas nécessaire pour la fixation à la surface des macrophages, mais les immunocomplexes sont mieux retenus que l'antigène libre, les macrophages possédant des récepteurs pour les immunoglobulines et pour le troisième composant du complément.

Des observations en microscopie électronique (citées dans UNANUE, 1975)<sup>391</sup> montrent que les molécules d'hémocyanine fixées aux membranes macrophagiques sont, dans un premier temps, uniformément réparties. Au bout de 2 à 6 heures de culture à 37°C, la plus grande partie des molécules ont disparu, endocytées, mais il subsiste des petits amas de molécules séparés par de larges surfaces nues, comme si ces amas se trouvaient localisés en des points où les phénomènes d'endocytose n'ont pas lieu. Cette répartition n'est pas modifiée si les cellules sont soumises à des conditions qui activent les mécanismes d'endocytose. L'addition d'anticorps spécifiques de l'antigène diminue de moitié le nombre de molécules retenues en surface. En revanche, la quantité d'antigène retenu sur la membrane augmente chez des macrophages activés par un processus immun bactérien (LANE et UNANUE, 1973)<sup>229</sup>.

Le macrophage n'est pas la seule cellule qui retienne de l'antigène en surface. Les cellules dendritiques des follicules ganglionnaires fixent les antigènes complexés à leurs anticorps ; cependant, leur activité pinocyttaire est très réduite (WHITE et coll., 1966)<sup>414</sup>; NOSSAL et coll., 1968)<sup>290</sup>. De même, les fibroblastes peuvent conserver longtemps de l'antigène sur leur membrane.



(3) Le relargage d'antigène : 3 à 20 % de l'antigène endocyté par les macrophages est excrété par les cellules (CRUCHAUD et UNANUE, 1971)<sup>93</sup> au cours d'un processus actif, indépendant du relargage enzymatique. Ces molécules proviennent bien de l'intérieur de la cellule, comme le prouve le fait que cette exocytose persiste après trypsinisation des cellules, qui élimine les protéines de surface (CALDERON et UNANUE, 1974)<sup>58</sup>. En se basant sur l'endocytose et l'exocytose d'hémocyanine, CALDERON et UNANUE (1975)<sup>59</sup> ont constaté que les molécules exocytées sont plus petites que l'antigène natif (un tiers de la taille initiale), et que certains des déterminants antigéniques sont modifiés. Le relargage est en partie influencé par la composition du milieu extracellulaire : ainsi, est-il fortement diminué si les macrophages pinocytent de nouvelles molécules de protéines.

Sur 100 molécules d'hémocyanine adsorbées par un macrophage, 1 à 3 restent sur la membrane, le reste est endocyté. Après 24 heures, sur les molécules pinocytées, environ 3 sont relarguées et une dizaine subsistent à l'intérieur de la cellule. C'est donc près de 90 % des molécules qui sont détruites et qui n'atteindront pas les cellules immunocompétentes.

Nos connaissances sur l'émission par les macrophages d'un superantigène très immunogène, constitué par des molécules antigéniques complexées à du matériel ribonucléique (FISHMAN et ADLER, 1963<sup>138</sup>; ASKONAS et RHODES, 1965)<sup>11</sup> n'ont pas beaucoup avancé depuis les premiers travaux rapportant ce phénomène.

#### b) Interaction avec les lymphocytes

Les macrophages fixent aussi bien les protéines autologues qu'étrangères (SCHMIDKE et UNANUE, 1971<sup>341</sup>; ASKONAS et JAROSKOVA, 1970)<sup>18</sup>. La spécificité de la réponse immune réside donc dans les lymphocytes immunocompétents.

Le contact des macrophages porteurs de l'antigène avec les lymphocytes B est cependant insuffisant pour stimuler la production d'anticorps. Les lymphocytes T sont indispensables à l'induction de la réponse humorale. De plus, il semble nécessaire que s'établisse un contact physique entre cellules adhérentes et lymphocytes B pour obtenir la réponse immune, puisque des cultures de lymphocytes T en mélange avec des macrophages, séparés des lymphocytes B par une membrane imperméable aux cellules, ne donnent pas de synthèse d'anticorps.

L'interaction macrophages-lymphocytes se marque par un double échange : facteurs lymphocytaires (T) agissant sur les macrophages, et facteurs macrophagiques agissant sur les lymphocytes (B).

Parmi les facteurs spécifiques et non-spécifiques produits par les lymphocytes T stimulés par un antigène, rappelons que le facteur immunoglobulinique (IgT ou IgX) de FELDMANN se complexe à l'antigène, et que ce complexe n'est actif sur les lymphocytes B que s'il se fixe sur le macrophage. FELDMANN (1975)<sup>134</sup> note que la fixation simultanée sur des macrophages de deux complexes IgT-antigène ayant des spécificités antigéniques différentes entraîne une paralysie de la réponse. Cet auteur en conclut qu'un complexe donné doit former une matrice homogène de déterminants d'une seule spécificité à la surface du macrophage pour stimuler les lymphocytes B correspondants. S'il se forme une mosaïque de déterminants différents, les lymphocytes B, ou bien entrent en compétition, ou bien ne peuvent se fixer par suite de la répartition trop espacée des déterminants auxquels ils sont réceptifs.

En ce qui concerne les facteurs macrophagiques, GERY et WAKSMAN (1972)<sup>146</sup> ont montré que les macrophages stimulés *in vitro* par les complexes IgT-antigènes sécrètent des facteurs non-spécifiques qui augmentent la prolifération des lymphocytes B et accroissent la réponse en IgG vis-à-vis de tous les antigènes.

Telles sont actuellement les interventions connues du macrophage, ou de la cellule adhérente non identifiée, dans les mécanismes de coopération au niveau de la réponse humorale.

La rencontre des macrophages avec les lymphocytes T et B est favorisée dans les organes lymphoïdes par le phénomène de la séquestration ("trapping").

### 3) La séquestration des lymphocytes

La séquestration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes stimulés par l'antigène est l'un des événements les plus précoces de l'immunisation (ZATZ et LANCE, 1971<sup>427</sup>; FROST et LANCE, 1973)<sup>142</sup>. Elle est induite par des antigènes particuliers ou de haut poids moléculaire (hémocyanine, flagelline, polysaccharide III du pneumocoque, antigènes extraits de tumeurs, globules rouges xénogéniques). Les antigènes incapables de déclencher cette séquestration, sont plutôt des molécules

protéiniques solubles (gamma-globulines bovines, sérumalbumine, toxine tétanique, DNP-polylysine). Les immunogènes puissants sont des déclencheurs efficaces de la séquestration à l'inverse des immunogènes faibles qui ne la provoquent que chez l'animal sensibilisé (c'est-à-dire lors d'une réponse secondaire).

L'organe lymphoïde intéressé par la séquestration dépend de la voie d'administration de l'antigène. Une pénétration intraveineuse ou intrapéritonéale conduit à une séquestration splénique, tandis qu'une inoculation sous-cutanée ou dans un coussinet plantaire intéresse les ganglions lymphatiques drainant le point d'injection. C'est un phénomène très brusque qui se produit déjà 15 minutes après l'injection intraveineuse, mais ne dure que 3 à 4 jours.

Les cellules responsables du déclenchement de la séquestration ne sont pas les lymphocytes, car une déplétion en lymphocytes ne diminue pas ce phénomène. Les cellules en cause sont les macrophages : le fait que la séquestration soit particulièrement marquée avec les antigènes particuliers et de haut poids moléculaire, la possibilité de la produire avec des particules non-immunogènes mais activement phagocytées (silice, carbone, carragénine, latex) sont une indication. D'autre part, des essais de transfert cellulaire chez des receveurs irradiés montrent que les cellules d'un exudat péritonéal sont très actives pour conférer cette propriété, bien plus que les cellules spléniques, elles-mêmes meilleures que les cellules ganglionnaires. Les cellules de la moëlle osseuse sont totalement inactives. Le fractionnement des cellules spléniques en cellules adhérentes et non-adhérentes, montre que ce sont les premières qui emportent l'essentiel de la capacité de provoquer la séquestration.

Pour FROST et LANCE (1973)<sup>142</sup>, ce sont les cellules endothéliales des organes lymphoïdes qui régulent le flot lymphocytaire à la suite d'un signal libéré par les macrophages. Il faut toutefois remarquer que le liquide lymphatique ne subit aucune réduction de débit ; il serait même plutôt augmenté. Les lymphocytes sont probablement retenus par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs de surface. Ceci expliquerait la spécificité de la séquestration qui ne se produit, pour un antigène soluble, que chez des animaux préalablement immunisés par cet antigène.

FROST et LANCE avancent l'hypothèse que l'une des exigences à l'initiation d'une réponse immune est la capacité que possède une substance étrangère dans un organisme de provoquer cette altération du flot des cellules lymphoïdes. Les antigènes qui possèdent en eux-mêmes cette qualité, ont une "adjuvantité" intrinsèque, selon l'expression de DRESSER (1961)<sup>113</sup>. Ceux qui ne peuvent déclencher la séquestration, ont besoin de l'assistance d'une deuxième substance, peu importe que cette substance soit elle-même immunogène ou non ; il suffit qu'elle soit séquestrante. Dans ce sens, les bons adjuvants auraient été empiriquement choisis parce qu'ils sont de bons initiateurs de ce mécanisme.

Signalons enfin que la stimulation antigénique induit également la prolifération des mastocytes dans la zone de drainage de l'injection (JARRETT et coll., 1969 ; ROBERTS, 1970)<sup>320</sup>.  
cf. 365

## II - LES ADJUVANTS HUMORAUX

### A) Mécanismes de l'activité adjuvante

Les adjuvants sont capables de stimuler préférentiellement la formation de l'une ou l'autre classe ou sous-classe d'anticorps. Ils n'agissent pas tous de la même façon que les mécanismes qui viennent d'être rappelés.

A quels niveaux les substances possédant une activité immuno-stimulante interviennent-elles ?

#### 1) Action sur les propriétés des antigènes

DRESSER (1961,<sup>113</sup> 1962)<sup>114</sup>, avait montré que la forme insoluble d'une molécule est immunogène, tandis que sa forme soluble ne l'est pas, à moins d'être mélangée à un adjuvant. Les virus, les bactéries, les tissus n'ont pas besoin d'adjuvants et l'addition de ceux-ci ne modifie pas beaucoup le niveau de la réponse (DRESSER et MITCHISON, 1968)<sup>116</sup>. De même, l'effet d'un adjuvant est plus marqué avec les petites doses d'antigène qu'avec les fortes doses (WEIGLE et coll., 1961)<sup>405</sup>.

L'émission ou l'adsorption sur de l'alun, de la bentonite ou d'autres particules, rend les antigènes particuliers. Cette présentation amène rapidement les antigènes en contact avec la surface des macrophages et des cellules dendritiques des ganglions et de la rate, facilitant et améliorant la coopération avec les lymphocytes. SCHENK et coll., (1969)<sup>339</sup>, montrent que la production d'anticorps vis-à-vis de la séralbumine humaine chez le rat est fortement augmentée lorsque la protéine est liée par des liaisons covalentes avec le LPS d'E. coli. L'effet est moindre par simple mélange, et nul si les deux éléments sont injectés en des points différents. L'effet "carrier" apparaît nettement dans ce cas. HERBERT (1968)<sup>165</sup> a montré que l'ovalbumine dans une émulsion d'eau dans l'huile, donne de bien meilleurs résultats que la même dose d'antigène dans une émulsion d'huile dans l'eau. L'équilibre hydrophile-lipophile joue un rôle primordial dans l'activité des adjuvants huileux (SHAW et coll., 1964)<sup>351</sup>.

La raison en est probablement l'interférence des émulsions adjuvantes avec la couche lipidique des membranes cellulaires, qui modifie l'affinité des récepteurs glycoprotéiniques.

Il y a une relation inverse entre la charge électrique globale d'un antigène et les anticorps qu'il suscite (SELA et coll. 1963<sup>347</sup>; SELA et MOZES, 1966)<sup>348</sup>. Le contrôle du type d'anticorps produit, dépendrait donc de la molécule dans son ensemble et ne serait pas limité au site antigénique (RUDE et coll., 1968)<sup>330</sup>.

En ce sens, les adjuvants, surtout huileux, modifient les propriétés et l'orientation des portions hydrophiles et hydrophobes des antigènes, dévoilant ainsi des résidus aminoacides normalement cachés dans des replis de la molécule.

## 2) Action sur le destin de l'antigène

### a) Fixation

La plupart des supports adjuvants (huile, gels minéraux) provoquent la formation d'un granulome, réaction inflammatoire qui fixe l'antigène au point d'injection et ralentit sa diffusion : ceci permettrait à une forte dose d'antigènes (dose tolérogène) d'être diffusée à des doses infratolérogènes. Il ne faut toutefois pas considérer cet effet dépôt

comme essentiel ; en effet, HOLT (1950)<sup>174</sup> avait observé que si l'antigène peut effectivement demeurer in situ plusieurs mois grâce à l'adjuvant, il semble perdre rapidement (une quinzaine de jours) son rôle stimulant pour le système de synthèse, par un encapsulement fibreux et un emprisonnement dans une barrière de complexe antigène-anticorps dans les mailles de collagène. FREUND et LIPTON (1955)<sup>141</sup> montrent que l'excision du site d'injection de l'antigène en adjuvant complet de Freund, même une demi-heure après la stimulation, ne modifie pas sensiblement le taux d'anticorps, ni l'apparition d'hypersensibilité retardée.

De même, certaines substances ont une action adjuvante, même injectées en un point différent ou à un autre moment (MERRITT et JOHNSON, 1963<sup>242</sup> ; GOLUB et WEIGLE, 1967<sup>150</sup> ; DRESSER, 1968)<sup>115</sup>.

#### b) Localisation

On sait depuis longtemps que l'injection d'un antigène avec son anticorps spécifique favorise la synthèse d'anticorps. Ainsi, la toxine diphtérique injectée en intraveineuse au lapin ne donne pas d'anticorps. Avec un peu d'antitoxine le lapin répond. La sérumalbumine bovine donne le même effet lorsqu'elle est administrée avec son anticorps spécifique (TERRES et coll., 1961<sup>383</sup> et 1962)<sup>384</sup>. WIGZELL (1966)<sup>418</sup> obtient une meilleure production d'IgM en injectant des globules rouges de mouton en présence d'IgM que les globules rouges seuls. Le rôle des immunocomplexes dans l'initiation et la régulation de la réponse immune intrigue les chercheurs : l'antigène qui reste disponible pour les interactions avec les cellules B (dès le 3ème jour de la réponse immune et pendant plusieurs semaines) est localisé à la surface des cellules dendritiques des sinus médullaires ganglionnaires et spléniques (WHITE, 1963)<sup>412</sup>. WHITE et coll. (1970)<sup>416</sup>, pensent que la localisation des immuno-complexes à la surface des cellules dendritiques conduit les cellules B en circulation dans la pulpe blanche splénique à former un centre germinatif. Ces auteurs ont montré, chez le poulet, que les centres germinatifs n'apparaissent pas s'il n'y a pas d'anticorps disponibles. En utilisant de la sérumalbumine humaine marquée, ils constatent que l'antigène persiste dans la circulation jusqu'à ce que les anticorps nouvellement synthétisés commencent à apparaître (après 30 heures environ). Cet événement est signalé par la présence de l'antigène (probablement lié à ses anticorps) à la surface des cellules dendritiques dans la pulpe blanche de la rate. Ces cellules porteuses d'immunocomplexes migrent à travers la pulpe blanche et viennent progressivement s'associer

aux cellules B pour former, dès le 3ème jour après injection de l'antigène, le centre germinatif primitif, qui s'agrandit considérablement par capture progressive de cellules B du 4ème au 7ème jour de la réponse.

Le rôle des centres germinatifs est controversé : pour les uns, ces formations seraient le lieu privilégié de rencontre de l'antigène avec les lymphocytes B sensibles à l'antigène pour une synthèse accrue d'anticorps (HUMPHREY, 1969)<sup>180</sup>, alors que pour les autres, les centres germinatifs auraient un rôle homéostatique de régulation de la synthèse des anticorps par blocage des lymphocytes B en leur sein, les empêchant ainsi d'entrer en contact avec les lymphocytes T (WHITE, 1973)<sup>417</sup>. Cet auteur constate la forte diminution de taille des centres germinatifs de la rate chez les poulets immunisés par de la séralbumine humaine en adjuvant complet de Freund. On observe une corrélation inverse entre la taille de ces formations et le taux en anticorps. Les centres germinatifs des animaux vaccinés avec l'adjuvant sont petits, entourés d'une masse irrégulière de cellules d'apparence épithélioïde formant un granulome capable d'oblitérer totalement, dans certains cas, le centre germinatif, WHITE en déduit que l'adjuvant désorganise le fonctionnement normal du centre germinatif dont le rôle est de limiter la réponse humorale. Le rôle inhibiteur des centres germinatifs serait perturbé avec l'adjuvant complet de Freund et avec la silice (deux bons adjuvants) par destruction des cellules dendritiques.

Pour DRESSER (in WHITE, 1973)<sup>417</sup>, le rôle des substances qui lèsent les macrophages (et qui sont de bons adjuvants) dans l'augmentation de la réponse immune, serait de libérer de l'antigène rendu ainsi disponible pour la stimulation de lymphocytes supplémentaires.

### c) Modification du catabolisme

La vitesse de phagocytose et de digestion de l'antigène influe sur son antigénicité (KIM et coll., 1967)<sup>210</sup>. Les endotoxines, l'adjuvant de Freund et les mitogènes végétaux augmentent la phagocytose et les activités enzymatiques des cellules réticulo-endothéliales (BIOZZI et coll., 1965)<sup>36</sup>; ASKONAS et WHITE, 1956)<sup>16</sup>.

### 3) Action sur les cellules immunocompétentes

Si les actions précédemment décrites étaient essentiellement dues à l'élément support des adjuvants, les effets sur les cellules immunocompétentes sont plutôt provoqués par la constitution chimique ou physico-chimique des substances introduites avec le support adjuvant, huileux ou minéral.

#### a) Métabolisme cellulaire

α) Les phagocytes : En général, les adjuvants augmentent la phagocytose (BIOZZI, 1953)<sup>32</sup>. Cet effet est évalué par l'index phagocytaire qui mesure la disparition de particules de carbone (clearance du carbone) introduites dans la circulation sanguine, et phagocytées, essentiellement au niveau du foie et de la rate. Des substances comme le MER (Méthanol Extraction Residue) (STEINKULLER et coll., 1969)<sup>366</sup>, la PHA (Phytohémagglutinine) (NOWELL, 1960)<sup>292</sup> ou les polynucléotides synthétiques (BRAUN et NAKANO, 1967)<sup>41</sup>; JOHNSON et JOHNSON, 1971)<sup>189</sup> stimulent la phagocytose. Quoique les endotoxines aient plutôt une action de stimulation de l'immunité cellulaire en rendant les macrophages cytotoxiques, SPITZNAGEL et ALLISON (1970)<sup>364</sup> ont mis en évidence un effet potentialisateur du LPS d'E. coli sur la réponse humorale, de même que l'alcool de la vitamine A (le Rétinol) dont l'activité adjuvante s'exerce probablement par ses propriétés liposolubles qui l'incorporent facilement à la membrane cellulaire. Cependant, le lymphocyte T est indispensable pour que l'effet soit maximum (ALLISON et DAVIES, 1971)<sup>8</sup>.

Des macrophages stimulés par Bordetella pertussis ou du sulfate de beryllium, augmentent la réponse humorale à l'hémocyanine lorsqu'ils sont transférés à un receveur qui reçoit simultanément des macrophages porteurs de l'hémocyanine. Il n'y a ni stimulation, ni dépression de la production d'anticorps lorsque sont transférées des cellules lymphoïdes incubés avec les adjuvants.

La cire D des Mycobactéries stimule également les macrophages. Acétylée, elle devient inactive.

β) Les lymphocytes : la bentonite et les adjuvants du type Freund ont un effet très marqué in vivo sur la synthèse d'IgG<sub>2</sub> chez le cobaye



(WILKINSON et coll., 1967)<sup>420</sup>, tandis que chez le lapin des polymères acryliques de 0,8  $\mu$  augmentent la production d'IgM (TORRIGIANI et ROITT, 1965)<sup>386</sup>. Ce ne sont donc pas les mêmes lymphocytes qui sont stimulés.

La transformation cellulaire induite par l'adjuvant de Freund est inhibée par du sérum antilymphocytaire (CURREY et ZIFF, 1968)<sup>94</sup>. ELVES (1967)<sup>123</sup> note que la PHA injectée avant l'antigène supprime la réponse primaire, tandis qu'injectée 6 heures après, elle augmente la réponse en anticorps.

L'un des premiers événements notés après introduction de la PHA est une modification du métabolisme phospholipidique (FISHER et MULLER, 1968)<sup>137</sup>, témoignant d'une action de cette substance sur la membrane cellulaire. Le même phénomène se produit en culture mixte de lymphocytes ou par traitement par des anticorps antilymphocytaires (SELL et coll., 1965)<sup>349</sup>.

Les adjuvants huileux créent une modification de l'équilibre lipophile-hydrophile des membranes cellulaires et déclenchent des mécanismes métaboliques intracellulaires pouvant conduire à la synthèse de médiateurs immunitaires.

#### b) Multiplication cellulaire

L'augmentation du tissu lymphoïde chez des animaux non immunisés est observée avec la silice (rate et ganglions peuvent atteindre dix fois leur taille normale) (PERNIS et PARONETTO, 1962)<sup>307</sup>, avec l'adjuvant de Freund (MOORE et SCHOENBERG, 1964)<sup>268</sup>, le vaccin coquelucheux (B. pertussis) (SLONECKER et RIEKE, 1965)<sup>354</sup>, la PHA (NASPITZ et coll., 1968)<sup>279</sup>.

La PHA possède une affinité particulière pour certains récepteurs membranaires, comme la concanavaleine A en a pour les alfa-glycanes ramifiés (GOLDSTEIN et coll. 1965)<sup>149</sup>. La PHA stimule la transformation lymphocytaire et la division cellulaire in vitro (PHILIPS et ZWEIMAN, 1970)<sup>308</sup>. La stimulation simultanée par deux mitogènes (PHA et Streptolysine) conduit à des effets antagonistes ou synergiques selon le rapport des mitogènes (MÖLLER, 1970)<sup>267</sup>. Il existe un nombre optimum de sites stimulables pour obtenir l'effet mitogène.

L'adjuvant de Freund augmente à la fois le nombre et la taille des plages d'hémolyse en technique de Jerne (KOGA et coll., 1969)<sup>217</sup>, signe d'une action à la fois sur la multiplication des lymphocytes B et sur la quantité d'anticorps produite par chaque cellule.

Le LPS d'E. coli se comporte in vitro comme un mitogène des cellules B (ANDERSSON et coll., 1972<sup>13</sup>; BULLOCK et ANDERSSON, 1973)<sup>53</sup>. Cependant, il peut agir sur la fonction spécifique d'assistance des lymphocytes T en augmentant leur nombre dans la phase initiale de la réponse primaire (NEWBURGER et coll., 1974)<sup>286</sup>. Chez la souris comme chez le cobaye, le LPS agit sur la réponse IgE à des doses 100 fois plus faibles que celles qui stimulent la réponse IgG (PERRINI et MOTA, 1973)<sup>306</sup>.

Il est possible de rapprocher d'un effet sur les lymphocytes T, la potentialisation des IgE spécifiques et non spécifiques provoquée par une infection par Nippostrongylus brasiliensis chez le rat. En effet, ce parasite déclenche une forte poussée du taux des réagines spécifiques d'un antigène (ovalbumine par exemple) injecté une semaine auparavant en présence de Bordetella pertussis (ORR et BLAIR, 1969)<sup>299</sup>. Toutefois, cette potentialisation de la réponse IgE est limitée à cette classe d'immunoglobulines et ne touche pas les IgG (JARRETT et coll., 1972<sup>186</sup>; BLOCH et coll., 1973)<sup>40</sup>. Ce qui indique la production par les vers vivants d'un facteur stimulant les immunocytes programmés pour une production d'IgE et agissant aussi bien sur les lymphocytes spécifiques des antigènes parasitaires que sur ceux déjà stimulés par l'injection préalable. Cette substance peut d'ailleurs aussi bien agir sur les lymphocytes B que sur les lymphocytes T (qu'ils aient une fonction helper ou une fonction suppressive).

Le lentinan, polysaccharide fongique extrait de Lentinus edodes (CHIYARA et coll., 1969)<sup>80</sup>, le rétinol, le béryllium, les polynucléotides synthétiques exerceraient une partie de leur effet adjuvant par une stimulation préférentielle des lymphocytes T (ALLISON, 1973<sup>10</sup>; DRESSER et PHILLIPS, 1974)<sup>118</sup>.

#### EN RESUME

Les adjuvants interviennent :

- a) au niveau de l'antigène en lui fournissant une adjuvantité qui lui procure une immunogénicité accrue. Les actions sont variées : modifications de conformation spatiale, de charges, de solubilité, ralentissement du catabolisme, immobilisation de l'antigène dans un foyer granulomateux, modification de sa localisation dans les organes lymphoïdes.

b) au niveau de l'hôte à la fois sur les cellules immunocompétentes et sur les systèmes non spécifiques de régulation de la synthèse protéique ou de la multiplication cellulaire.

Les adjuvants, à ce titre, sont impliqués :

- 1) dans la transformation des macrophages et des lymphocytes ;
- 2) dans la multiplication des histiocytes, macrophages, lymphocytes et plasmocytes ;
- 3) dans la synthèse d'hormones variées, telles que la cortisone ou l'ACTH qui modifient à leur tour la synthèse protéique ;
- 4) dans l'augmentation du rapport nombre de cellules immunitaires sur nombre de molécules antigéniques.

#### B) Les adjuvants humoraux d'origine mycobactérienne

En 1929, DIENES<sup>108</sup> remarque que l'injection d'ovalbumine dans une lésion tuberculeuse provoque une augmentation de la production d'anticorps contre l'ovalbumine. En 1935, COULAUD<sup>90</sup> montre que l'addition d'huile de paraffine aux mycobactéries facilite le développement de l'hypersensibilité retardée à la tuberculine. Puis FREUND et coll. (1937)<sup>140</sup> précisent les conditions de réalisation de l'adjuvant qui porte son nom. La phase huileuse, qui constitue l'adjuvant incomplet, se compose d'huile de paraffine purifiée (BAYOL ou DRAKEOL) et d'un émulsifiant (ARLACEL A.). L'addition de Mycobactéries tuées (en général 5 mg/ml) donne l'adjuvant complet de Freund (ACF). L'antigène à injecter est introduit en solution aqueuse émulsionnée avec la phase huileuse. Au fil des années, plusieurs espèces de Mycobactéries, outre Mycobacterium tuberculosis var hominis et var bovis se sont révélées actives comme adjuvants : M. smegmatis, M. phlei, M. butyricum, M. avium, M. leprae, etc...

Cependant, l'injection de l'adjuvant complet entraîne toute une série d'effets tels que granulome persistant au point d'injection, sensibilisation aux endotoxines des bactéries gram négatives, développement d'une polyarthrite rhumatoïde allergique par dépôt d'immunocomplexes, déclenchement de maladies autoimmunes et, bien entendu, induction de l'hypersensibilité à la tuberculine.

Ces inconvénients, dont certains sont liés aux mécanismes adjuvants eux-mêmes, empêchent son application à la vaccination humaine. Aussi, depuis quelques temps, on a cherché à modifier la composition de la phase huileuse, en remplaçant l'huile minérale, peu ou pas métabolisée, par des huiles catabolisables. C'est ainsi qu'ALLISON et GREGORIADIS (1974)<sup>12</sup> proposent l'utilisation de liposomes, sphères concentriques constituées de phospholipides en double couche moléculaire, séparés par des compartiments aqueux contenant le ou les antigènes. Les lipides en sont la lécithine, le cholestérol, la stéarylamine, l'acide phosphatidique ou le dicétylphosphate. De même, AUDIBERT et CHEDID (1975)<sup>20</sup> proposent l'émulsion des antigènes et des substances à activité adjuvantes avec des huiles végétales métabolisables. HILLEMANN (1972)<sup>171</sup> préconise l'huile d'arachide...

Depuis la découverte du bacille de KOCH, mais surtout depuis la révélation de leur rôle stimulant, les Mycobactéries ont fait l'objet de nombreux travaux destinés à identifier les constituants porteurs des activités biologiques (RAFFEL, 1948)<sup>314</sup>.

La richesse des Mycobactéries en lipides contraste avec la composition pariétale des autres bactéries qui, comme elles, prennent la coloration de Gram, et qui sont caractérisées par une paroi cellulaire essentiellement glycopeptidique, pauvre en lipides. Le pourcentage de matériel lipidique atteint le quart de la cellule entière et plus de la moitié de la paroi dans le BCG. Aussi, l'étude des lipides mycobactériens, entreprise dans les années 20 par R.J. ANDERSON, à l'Université Yale, a constitué un élément important du bilan chimique de ces microorganismes. Aujourd'hui encore, l'analyse des structures chimiques, même non lipidiques, s'articule autour du schéma de fractionnement d'ANDERSON, complété par LEDERER et ASSELINEAU (cf. ASSELINEAU, 1962)<sup>19</sup>.

### 1) La paroi et ses constituants

L'isolement de structures chimiques actives s'est fait selon deux voies qui ont aboutit à des molécules très semblables. Tandis que certains auteurs extrayaient par divers solvants organiques des substances à partir du corps bactérien entier, d'autres traitaient par ces solvants, et diverses enzymes, les parois purifiés de ces germes. Il était en effet

apparu que la paroi purifiée, débarrassée des contaminants tels que lipides libres et protéines, est adjuvante et développe une immunité non spécifique vis-à-vis de germes pathogènes non mycobactériens, au même titre que les bactéries entières (AZUMA et coll., 1971)<sup>23</sup>. Les parois sont également arthrogènes et douées de propriétés antitumorales (ZBAR et coll., 1972)<sup>428</sup>; CHEDID et LAMENSANS, 1974)<sup>79</sup>.

La délipidation des parois aux solvants organiques et une digestion enzymatique par la trypsine, la chymotrypsine et le lysozyme, permettent l'isolement d'une fraction hydrosoluble, le WSA (Water Soluble Adjuvant), plus active que les parois (ADAM et coll., 1972)<sup>1</sup>. Cette substance est adjuvante sans être arthrogène, mais n'est plus antitumorale (CHEDID et coll., 1972)<sup>78</sup>; de plus elle ne sensibilise pas aux endotoxines.

La même fraction a été extraite à partir des bactéries entières délipidées (Arlette ADAM et coll., 1973)<sup>2</sup>, non seulement chez les Mycobactéries, mais dans un genre très voisin, les *Nocardia* (NWSM : *Nocardia* Water Soluble Mitogen).

Le fractionnement des Mycobactéries entières par les solvants organiques selon le schéma d'Anderson, fournit plusieurs types de lipides présentant des solubilités diverses aux solvants. L'une des fractions les plus étudiées, les cires D, fraction chloroformosoluble des lipides libres des souches humaines de *M. tuberculosis*, peut remplacer les bactéries entières dans l'adjuvant de Freund (WHITE et coll., 1955)<sup>410</sup> et 1964)<sup>413</sup>. Elle est adjuvante et arthrogène, mais pas antitumorale. Les cires D semblent provenir des parois (KOTANI et coll., 1963)<sup>219</sup> dont elles se détacheraient par autolyse pariétale. On en trouve 6 à 8 % dans les souches virulentes et 2 % dans les espèces saprophytes de Mycobactéries. Entre 1968<sup>256</sup> et 1972,<sup>257</sup> MIGLIORE-SAMOUR et JOLLES ont isolé du germe entier un polysaccharide peptidoglycane (POLY-PA) adjuvant, dépourvu d'activité arthrogène.

A la même époque, HIU (1972)<sup>172</sup> extrait du BCG une fraction adjuvante et antitumorale, MAAF (Mycobacterial Adjuvant and Antitumoral Fraction), dépourvue de toxicité, adjuvante par la synthèse d'anticorps contre l'ovalbumine et capable de développer une hypersensibilité retardée à cette protéine.

Enfin, récemment, STEWART-TULL et coll. (1975)<sup>368</sup> rapportent l'isolement d'un glycopeptide hydrosoluble, ST 208, à partir du milieu de culture de la souche DT de Mycobacterium tuberculosis. Ce glycopeptide est fortement adjuvant, avec l'ovalbumine, chez le cobaye, n'est pas toxique chez la souris, ne développe pas de polyarthrite chez le rat et de granulome dans le poumon de lapin. En revanche, il déclenche une forte réponse granulomateuse de la patte injectée du cobaye.

Nous avons cité à la suite ces diverses substances extraites des Mycobactéries, soit directement de la cellule entière, soit de la paroi isolée, car elles se sont révélées des morceaux plus ou moins importants d'une même structure pariétale, leur taille et leur composition dépendant de la technique d'extraction utilisée. Cette structure majeure, dont toutes les autres sont issues, est représentée par les cires D : d'un poids moléculaire supérieur à 50.000, ce sont des peptido-glycolipides dans lesquels les acides mycoliques, acides gras de 60 à 90 carbones, sont estérifiés par un polysaccharide contenant du galactose et de l'arabinose (arabino-galactane) (AZUMA et coll., 1969<sup>22</sup>; MISAKI et coll., 1970)<sup>261</sup>; une fraction azotée contient des sucres aminés (N-acétyl-glucosamine et acide N-glycolyl-muramique) en liaison ester avec un peptide composé d'alanine, d'acide glutamique et d'acide alpha-epsilon-diamino-pimélique. Cette dernière fraction constitue le peptidoglycane qui est l'élément-clé des adjuvants mycobactériens d'origine pariétale. Le glycolipide serait associé au peptidoglycane par une liaison phosphodiester (figure 2).

Le WSA isolé initialement représentait la même molécule mais sans les lipides (acides mycoliques). Puis, Arlette ADAM et coll. (1974 a<sup>3</sup> et b)<sup>4</sup> ont démontré que l'arabino-galactane n'est pas non plus indispensable à l'activité adjuvante. Des préparations de WSA contenant moins de 3 % de sucres neutres, et d'autres n'en contenant pas du tout, ont une activité adjuvante sur la production d'anticorps et sur l'hypersensibilité retardée et induisent un granulome au point d'injection.

MISAKI et coll. (1966)<sup>260</sup> avaient déjà montré que le peptidoglycane du BCG, ne contenant plus que 2,3 % de sucres neutres sous forme d'arabinose, stimule la résistance non spécifique de souris infectées par Staphylococcus aureus comme le font les parois entières de BCG.

WSA = même molécule, sans lipide (acide mycolique)

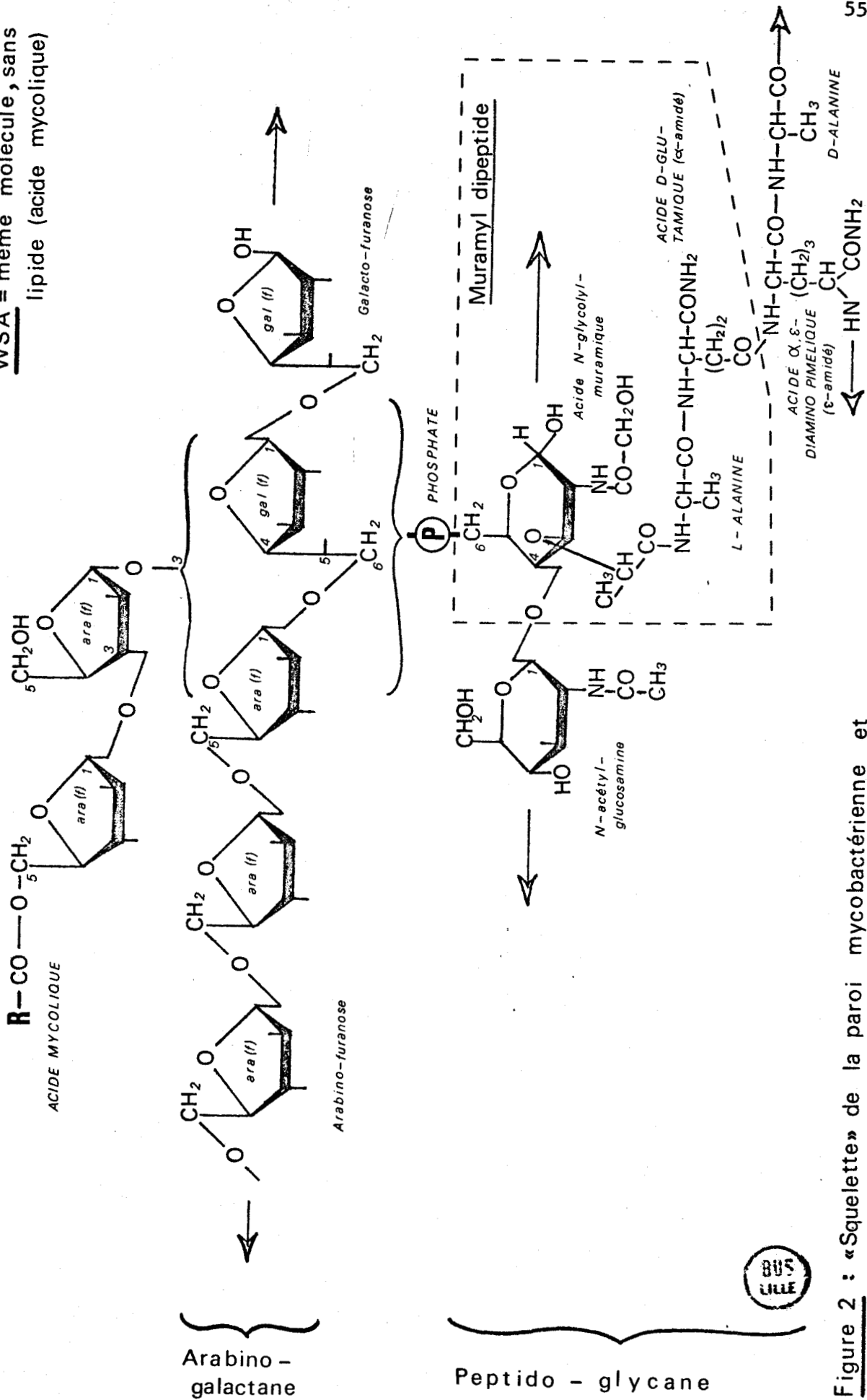


Figure 2 : «Squelette» de la paroi mycobactérienne et structure principale de la cire D



Des peptidoglycane très semblables ont été isolés de nombreuses autres bactéries et ont permis de préciser les structures impliquées dans l'effet adjuvant. NGUYEN-DANG et coll. (1973)<sup>287</sup> remarquent une forte stimulation de l'immunité humorale par les parois de C. parvum et de B. megaterium. Des peptidoglycane de B. megaterium et d'E. coli (DAMAIS et coll., 1975)<sup>95</sup>, de Proteus vulgaris, Moraxella et Neisseria (NAUCIEL et coll., 1973)<sup>281</sup> possèdent une activité adjuvante humorale et sur l'HSR.

On est ainsi arrivé à une structure minimum, conservant encore une activité adjuvante : le 3'-muramyl-dipeptide, c'est-à-dire la molécule d'acide muramique estérifiée par le dipeptide L-alanyl-acide-D-glutamique, qu'il est possible d'obtenir par synthèse (ELLOUZ et coll., 1974)<sup>122 bis</sup>.

#### Mode d'action

L'arabino-galactane semble responsable de l'effet arthrogène des parois, mais perdrait cette propriété en dessous d'une certaine longueur (STEWART-TULL et coll., 1975)<sup>368</sup>. Ce qui explique la disparition de la polyarthrite du rat avec le WSA, le POLY-A, le ST 208 et toutes les molécules plus petites.

La possibilité de déclencher une encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), en mélangeant du tissu nerveux ou des protéines myéliniques avec des fractions mycobactériennes, n'existe qu'avec des fractions pariétales insolubles dans les solvants organiques. WSA et MAAF sont actifs à ce titre (MEYER et coll., 1975)<sup>253</sup>.

La réponse anticorps augmentée, observée avec l'ensemble de ces adjuvants, semble liée au fait que ces substances sont des mitogènes des lymphocytes B : le NWSM est un mitogène B chez la souris (BONA et coll., 1974)<sup>41</sup> et chez le lapin (BONA et coll., 1975)<sup>42</sup>, comme l'est le peptidoglycane d'E. coli (DAMAIS et coll., 1975)<sup>95</sup>. Notons toutefois pour ce dernier exemple que, réduit à son monomère (muramyl-dipeptide), le peptidoglycane d'E. coli n'est plus mitogène alors qu'il est encore adjuvant.

Les peptidoglycane ont un effet direct sur les structures de surface des macrophages, qui conduit à l'immobilisation de ces cellules (HEYMER et coll., 1973)<sup>167</sup>.



## 2) Le cord-factor

La cire C d'ANDERSON contient le cord-factor, lui aussi glycolipide pariétal, responsable de la toxicité et peut-être de la virulence des Mycobactéries pathogènes (H. BLOCH, 1950)<sup>38</sup>. Le cord-factor a été identifié comme le 6,6'-dimycolate de tréhalose (figure 3) (NOLL et Coll., 1956)<sup>289</sup>.

Le cord-factor, injecté par voie intraveineuse à des souris, à la dose de 10 à 20 microgrammes, produit des granulomes pulmonaires absolument identiques à ceux obtenus par une immunisation par le BCG. Les animaux ainsi traités sont protégés contre les infections tuberculeuses par aérosol et contre les tumeurs pulmonaires induites à l'uréthane (BEKIERKUNST, 1969)<sup>25</sup>. Cette substance est adjuvante, puisqu'elle stimule la production des anticorps contre les globules rouges de mouton lorsqu'elle est injectée, à raison de 100 µg par souris, 5 jours avant les hématies, dans la même patte que les cellules. Cet effet adjuvant est observable tant que persistent les réactions inflammatoires déclenchées au point d'inoculation et dans le ganglion drainant, c'est-à-dire pendant près de 30 jours. Ce glycolipide provoque l'accumulation des macrophages et leur transformation en cellules épithélioïdes (BEKIERKUNST, 1971)<sup>26</sup>.

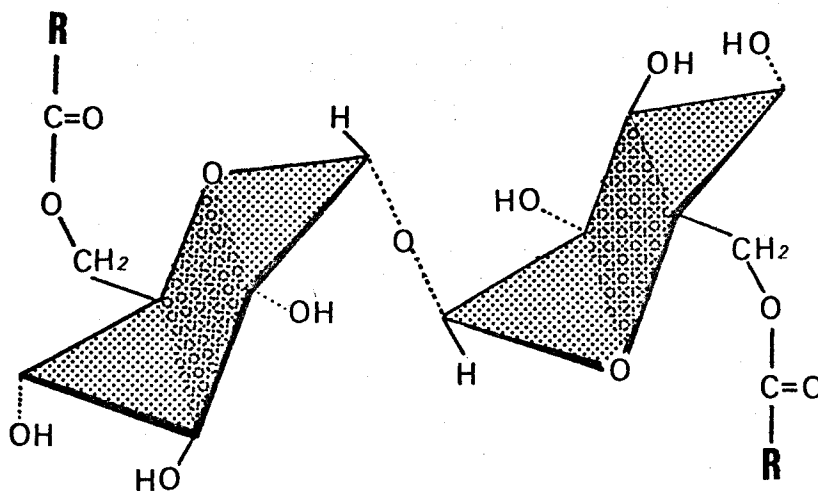
Le cord-factor est la seule substance isolée des Mycobactéries qui soit porteuse de la propriété d'alcoolo-acidorésistance, caractéristique des techniques de coloration de ces bactéries. C'est lui qui est responsable du développement de l'hyper-réactivité aux endotoxines (SUTER et coll., 1958)<sup>373</sup>

Les mêmes effets ont été obtenus avec des analogues du cord-factor et notamment avec le dipalmitate de tréhalose.

### Mode d'action

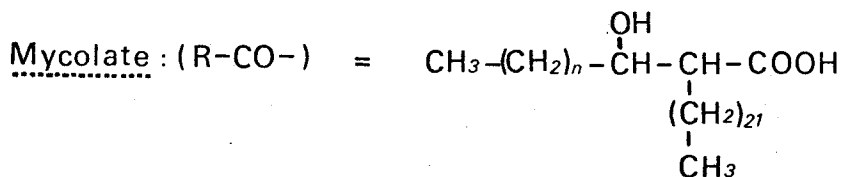
Introduit avec du BCG vivant dans un animal, le cord-factor stimule la multiplication des bactéries. Il désintègre la membrane mitochondriale et inhibe les chaînes de phosphorylation et d'oxydation cellulaire (KATO <sup>202</sup>., 1971 et <sup>202 bis</sup>1973). C'est une molécule hapténique qui n'induit la synthèse d'anticorps qui lui sont spécifiques que lorsqu'elle est couplée à une protéine support (la sérumalbumine méthylée, par exemple). Le cord-factor complexé à son anticorps spécifique n'est

Figure 3

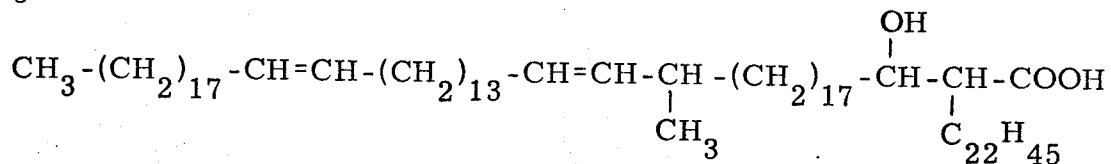
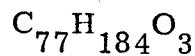
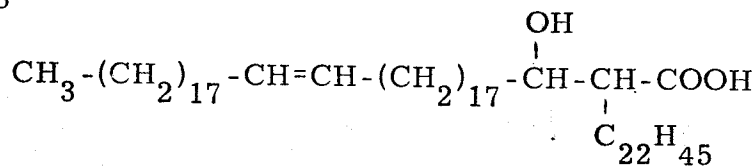
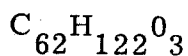


CORD-FACTOR: 6,6'- dimycolate de tréhalose

Tréhalose: 1-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside



2 acides mycoliques identifiés chez M. smegmatis :



d'après E. LEDERER, La Recherche, 1973, 4 (n°40, décembre).

plus toxique. De même, son acétylation complète l'inactive. Par ses effets toxiques, le cord-factor protégerait le bacille tuberculeux des mécanismes cytolytiques des cellules réticuloendothéliales et lui permettrait de survivre et de se développer dans les cellules animales (YAMAMURA, 1959)<sup>423</sup>.

### 3) Le M. E. R.

L'extraction des Mycobactéries par l'acétone et le méthanol permet d'isoler le MER (Methanol Extraction Residue) (WEISS et coll., 1964)<sup>406</sup>. Cette substance de nature phospholipidique stimule le système réticulo-endothélial et semble agir principalement sur les cellules T (développement d'une HSR, immunité cellulaire antitumorale, accroissement du nombre de cellules formant des rosettes théta). Le MER a cependant un effet sur l'immunité humorale probablement par une action sur les cellules helper et peut-être également sur les lymphocytes B et les macrophages (JACOBS et coll., 1974)<sup>184</sup>.

### 4) Le P P D

On sait le rôle principal des tuberculo-protéines dans la révélation de l'hypersensibilité retardée tuberculique. Du mélange complexe de protéines et de lipo-polysaccharides que constitue la tuberculine brute, ont été isolées des fractions plus simples : les divers tuberculo-polysaccharides de Florence SEIBERT (depuis 1938)<sup>344</sup> et surtout les PPD (Purified Protein derivatives) (SEIBERT, 1955<sup>345</sup>; YAMAMURA, 1968<sup>473bis</sup>, 1969<sup>474</sup>; TAKAHASHI, 1969)<sup>380</sup>.

Ces dérivés protéiques purifiés sont des mitogènes B (SULTZER et NILSSON, 1972)<sup>372</sup> : ils déclenchent une production polyclonale d'anticorps dans les cellules spléniques de souris normales (NILSSON, 1972).<sup>288</sup>

Cet effet est très rapide puisque l'augmentation du taux d'anticorps est sensible dès le 2ème jour. Ce pouvoir mitogène est indépendant des lymphocytes T.

Le PPD est également adjuvant pour la réponse humorale à un antigène donné. Il est meilleur que le LPS d'E. coli, ou que le polysaccharide S III de pneumocoque pour une réponse spécifique des globules rouges de mouton. Cependant, contrairement au LPS et au S III qui sti-

mulent directement les lymphocytes B, le PPD nécessite la présence des lymphocytes T dans le cas d'une réponse spécifique à un antigène.

Ajouté à des cellules spléniques hyperimmunisées contre des globules rouges de mouton, le PPD augmente le nombre de cellules productrices d'anticorps (KREISLER et MOLLER, 1974)<sup>224</sup>. En réponse secondaire, le PPD agit à des doses 100 fois plus faibles qu'en réponse primaire, les fortes doses étant même inhibitrices de la production d'anticorps.

On voit, par cette revue rapide des substances immuno-stimulantes extraites des Mycobactéries, que, si les progrès dans notre connaissance des structures porteuses d'une activité adjuvante sont remarquables, le mécanisme intime de cette action nécessite encore un certain nombre de travaux complémentaires. Son élucidation apportera un élément primordial dans la compréhension du phénomène adjuvant.

CHAPITRE III

LES STIMULANTS DE LA REPOSE A MEDIATION CELLULAIRE

## I - LE MACROPHAGE DANS L'IMMUNITE CELLULAIRE

Longtemps relégué aux seules fonctions du nettoyage de l'organisme, le macrophage suscite, depuis quelques années, un renouveau d'intérêt par le rôle fondamental qu'il joue au niveau des réactions spécifiques et non spécifiques de l'immunité.

Nous avons vu son intervention, encore mal élucidée, dans la réponse humorale. Examinons sa participation dans l'immunité à médiation cellulaire.

### A) Rôle du macrophage dans l'immunité cellulaire

#### 1) Immunité spécifique

Si les macrophages d'un sujet normal sont capables de s'opposer au développement d'une grande variété de microorganismes (BLANDEN et coll., 1966)<sup>37</sup>, ceux d'un sujet immunisé présentent des propriétés accrues et mêmes nouvelles. En particulier, leur pouvoir microbicide est fortement augmenté et parvient à empêcher le développement intramacrophagique d'agents infectieux capables de se multiplier dans les cellules phagocytaires mononucléées, tels que BCG, Brucella abortus, Pasteurella pestis, Listeria monocytogenes, Histoplasmes, Toxoplasmes et virus. Les macrophages ont été stimulés par le processus infectieux initial.

D'autre part, les macrophages sont impliqués dans le rejet des cellules tumorales, surtout dans la phase précédant l'intense vascularisation d'une tumeur (GORER, 1956)<sup>151</sup>. Il est en effet possible de transférer l'immunité antitumorale, ce transfert étant plus efficace avec les cellules d'un exudat péritonéal, riche en macrophages, qu'avec les cellules ganglionnaires ou spléniques, principalement constituées de lymphocytes (cf. revue de NELSON, 1968)<sup>285</sup>. Des macrophages isolés ont permis de transférer l'immunité antitumorale (BENNETT, 1965)<sup>29</sup>.

Enfin, les macrophages jouent également un rôle dans le rejet des greffes (DIMITRIU et coll., 1975)<sup>109</sup>.

## 2) Immunité non spécifique

Il est rapidement apparu qu'un certain degré de protection se développe simultanément vis-à-vis d'agents infectieux sans rapport avec celui qui est responsable de l'immunisation. C'est une résistance non spécifique qui peut, lorsqu'elle s'atténue, être réactivée par le germe spécifique de l'infection initiale.

Ainsi, les macrophages provenant d'animaux tuberculeux ou immunisés avec le BCG, montrent in vitro un pouvoir bactéricide important vis-à-vis de Listeria monocytogenes (MACKANESS, 1964)<sup>241</sup>, de diverses Salmonelles (MACKANESS, 1968)<sup>242</sup> ou de Brucella melitensis (ELBERG et coll., 1957)<sup>162</sup>, propriété corrélée par la résistance de ces animaux aux infections par de tels germes. Des souris infectées par Toxoplasma gondii ou Besnoitia jellisoni, protozoaires parasites, résistent à une infection par Mycobacterium leprae (KRAHENBUHL et coll., 1974)<sup>222</sup>.

C'est toutefois dans le cadre de l'immunité antitumorale que cette activation non spécifique des macrophages a été le plus largement analysée. Le traitement d'animaux par BCG, Corynebacterium parvum, ou bien l'infection chronique à Toxoplasma gondii, Besnoitia jellisoni (HIBBS et coll., 1971)<sup>168</sup> et 1972)<sup>169</sup> augmentent la résistance de ces animaux aux tumeurs (BIOZZI et coll., 1959)<sup>35</sup>; HALPERN et coll., 1966)<sup>159</sup>.

Des souris infectées par le nématode Trichinella spiralis présentent une diminution d'incidence de tumeurs mammaires naturelles (WEATHERLY, 1970)<sup>403</sup>.

En général, les macrophages péritonéaux d'animaux ainsi immunisés ont acquis un pouvoir bactéricide accru vis-à-vis de Listeria ou de virus et se montrent cytotoxiques pour des cellules tumorales syngéniques ou allogéniques en culture.

La croissance du sarcome de Walker est supprimée chez des rats infectés depuis moins de dix jours par Nippostrongylus brasiliensis, parasite nématode, et augmentée chez les animaux infectés depuis 10 à 30 jours. En revanche, le développement d'un adénocarcinome syngénique chez la souris est inhibé par l'infection à N. brasiliensis quelque soit le temps d'inoculation de la tumeur ou du parasite (KELLER et coll., 1971)<sup>207</sup>. Les animaux résistants au parasitisme (Rats infectés par S. mansoni) rejettent des cellules tumorales BHK21, quelque soit le moment de leur administration par rapport à l'infestation. L'inhibition de la greffe tumorale chez les animaux réceptifs au parasite (Hamster) n'a lieu que si les

cellules cancéreuses sont injectées en même temps que les cercaires. Administrées 30 jours après l'infection parasitaire les tumeurs ont une croissance facilitée (CAPRON et coll., 1972)<sup>65</sup>. Les macrophages péritonéaux activés par l'infection parasitaire, ou même simplement par une injection de protéose-peptone, transfèrent l'immunité antitumorale à des animaux syngéniques (KELLER et JONES, 1971)<sup>208</sup>. Les macrophages normaux en sont incapables.

Une telle immunité non spécifique peut être instaurée in vivo et in vitro en traitant les macrophages par les substances les plus diverses : endotoxines bactériennes, ARN bicaténaire (ALEXANDER et EVANS, 1971)<sup>6</sup>, polynucléotides synthétiques (JOHNSON et JOHNSON, 1971)<sup>189</sup> et d'autres molécules ayant par ailleurs une activité adjuvante (YASHPHE, 1971)<sup>425</sup>.

## B) Mécanisme de l'activation

### 1) Armement spécifique

En injectant des lymphocytes immuns, sensibilisés contre une tumeur, à des souris porteuses de cette tumeur, on observe la destruction des cellules néoplasiques, alors qu'in vitro, ces mêmes lymphocytes les laissent intactes. C'est la preuve de l'intervention d'un autre facteur identifié comme étant le macrophage (EVANS et ALEXANDER, 1970,<sup>124</sup> 1972)<sup>126</sup>. D'une manière générale, il est possible de rendre les macrophages d'un animal normal cytotoxiques vis-à-vis d'un organisme pathogène, en lui transférant les lymphocytes thymo-dépendants d'un animal immunisé contre cet organisme, à condition d'injecter en même temps l'agent infectieux ou des antigènes de cet agent. En présence de l'antigène auquel ils sont sensibles, les lymphocytes libèrent des médiateurs (lymphokines) capables de stimuler les macrophages en augmentant leur pouvoir cytotoxique : les lymphocytes thymo-dépendants d'une souris porteuse d'un lymphome sont capables d'armer des macrophages normaux qui acquièrent alors une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses (BENNETT, 1965)<sup>29</sup>. Les macrophages peuvent être ainsi armés avec les surnageants acellulaires de cellules lymphoïdes immunes incubées avec l'antigène (EVANS et ALEXANDER, 1971)<sup>125</sup>. Cet armement spécifique des macrophages est réalisé par un facteur soluble libéré dans le milieu par les lymphocytes au moment du contact avec les antigènes de l'organisme-cible : ce facteur spécifique, EVANS et ALEXANDER (1973)<sup>127</sup>, lui ont donné les initiales S.M.A.F. (Specific Macrophage Arming Factor). Il est produit par les lymphocytes thymo-dépendants



et, selon une suggestion des auteurs, aurait une activité cytophile pour le macrophage et une structure de reconnaissance spécifique pour la cellule-cible (Immunoglobuline T ? FELDMANN et NOSSAL, 1972)<sup>131</sup>.

Des macrophages de souris deviennent également cytotoxiques en présence d'une allogreffe : il est probable que le contact des lymphocytes d'origines différentes entraîne une sécrétion de S.M.A.F.

## 2) Armement non spécifique

Dans la cytotoxicité non spécifique les macrophages sont également armés par des lymphokines produites par les lymphocytes incubés avec l'antigène auquel ils sont sensibles (LOHMANN-MATTHES et coll., 1973)<sup>236</sup>; KRAHENBUHL et coll., 1973)<sup>221</sup>. Car l'effet inhibiteur de l'infection par Nippostrongylus brasiliensis sur la croissance d'une tumeur chez la souris est supprimé par traitement des animaux au sérum antilymphocytaire (KELLER et JONES, 1971)<sup>208</sup>. Or les surnageants de culture des lymphocytes d'animaux immuns n'ont pas d'activité cytotoxique, mais rendent cytotoxiques des macrophages normaux (JONES et YOUNG, 1973)<sup>193</sup>. C'est donc bien un facteur soluble lymphocytaire qui arme les macrophages. De nombreux auteurs ont identifié des produits activateurs du macrophage, libérés par les lymphocytes : FOWLES et coll., 1973<sup>139</sup>; GODAL et coll., 1971<sup>147</sup>; KRAHENBUHL et REMINGTON, 1971<sup>220</sup>; MACKANESS, 1971<sup>244</sup>; PATTERSON et YOUNG, 1970<sup>303</sup>. Ces divers facteurs qui arment non spécifiquement les macrophages sont globalement désignés actuellement sous les initiales de M.A.F. (Macrophage Arming Factor).

Notons ici que les macrophages doivent être présents pendant la culture des lymphocytes T sensibles à des antigènes thymo-dépendants pour que certaines (sinon toutes) lymphokines soient produites, telles que facteur chimotactique des monocytes (CFT) et facteur d'armement des macrophages (MAF), alors qu'avec un antigène thymo-indépendant, les lymphocytes B seraient activés directement et capables de sécréter leurs lymphokines (WAHL et coll., 1975)<sup>396</sup>. L'on retrouve dans cette différence de comportement, le schéma d'activation des lymphocytes déjà décrit dans la réponse humorale.

A côté des lymphokines, les macrophages peuvent être armés par des anticorps cytophiles, soit de la classe IgG (GRANGER et WEISER, 1966)<sup>154</sup>, soit de la classe IgE (CAPRON et coll., 1975)<sup>71</sup>.

Enfin, des macrophages stimulés in vivo par de la protéose-peptone sont capables d'inhiber in vitro le développement de tumeurs syngéniques (KELLER, 1973)<sup>209</sup>.

Si l'armement des macrophages par un facteur spécifique ne pose pas trop de problème quant à la sélectivité d'action des cellules sur la cible, il n'en va pas de même dans le cadre de l'immunité non spécifique. Selon quel critère les macrophages armés "choisissent"-ils parmi toutes les cellules de l'organisme celle qui doivent être détruites ?

HIBBS et coll. (1972)<sup>169</sup> émettent l'hypothèse que l'action non spécifique des macrophages armés s'exerce à l'encontre de cibles présentant des caractéristiques anormales de croissance. PIESENS et coll. (1975)<sup>310</sup> constatent de même que l'activité antitumorale non spécifique de macrophages armés par des surnageants de culture lymphocytes-antigène, s'exerce contre des cellules tumorales syngéniques, mais pas vis-à-vis de cellules syngéniques normales. Ces observations sont malheureusement en désaccord avec celle de JONES et coll. (1975)<sup>192</sup> qui notent que des souris stimulées intrapéritonéalement par du Corynebacterium tué ont des macrophages cytotoxiques pour des cellules embryonnaires syngéniques normales. La cytotoxicité est mesurée par relargage de chrome 51, méthode peut-être plus sensible que l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA des cellules tumorales habituellement utilisée dans les tests antitumoraux. Cette cytotoxicité est abolie par le traitement des macrophages à la trypsine.

Remarquons toutefois pour tenter de réconcilier ces observations apparemment contradictoires, que les cellules embryonnaires choisies par JONES sont également des éléments à croissance "anormale".

Que ce soit par des facteurs lymphocytaires ou des facteurs sériques immunoglobuliniques, dans l'immunité spécifique comme dans l'immunité non-spécifique, les macrophages armés ne sont "activés" qu'au moment du contact avec l'organisme-cible (EVANS et ALEXANDER, 1972)<sup>125</sup>.

Que se passe-t-il dans les macrophages au moment de leur activation et quel est le support de leur cytotoxicité.

## C) Mécanismes cellulaires de la cytotoxicité

### 1) Phagocytose accrue

L'une des premières manifestations de l'activation des macrophages est une endocytose accrue (phagocytose de particules ou pinocytoses de milieu liquide) : les particules de carbone (clearance du carbone) ou des germes radiomarqués sont plus rapidement éliminés de la circulation sanguine chez les animaux tuberculeux (BIOZZI et coll., 1954)<sup>33</sup> ou immunisés par Salmonella typhi (BIOZZI et coll., 1955)<sup>34</sup> et Corynebacterium parvum (HALPERN et coll., 1963)<sup>158</sup>. Il en est ainsi avec la plupart des agents qui déclenchent l'activation des macrophages. Ces cellules possèdent sous la membrane plasmique un réseau de microfilaments de type actomyosinique qui semble jouer un rôle très important dans l'endocytose (ALLISON et coll., 1971)<sup>7</sup>. Ce système est bloqué de manière réversible par la cytochalasine. La même substance inhibe le phénomène inverse (l'exocytose d'histamine et de sérotonine) au niveau des mastocytes au moment de la fixation d'un antigène sur les IgE spécifiques localisées sur la membrane mastocytaire. Endocytose et exocytose nécessitent la présence d'ion  $Ca^{++}$  (RABINOVITCH, 1967)<sup>313</sup>.

Parmi les facteurs avancés pour expliquer cet accroissement de la phagocytose, les plus importants semblent les opsonines et les anticorps cytophiles. Les anticorps cytophiles ont été définis par BOYDEN (1964)<sup>45</sup> comme des composants globuliniques du sérum qui s'attachent à certaines cellules en les rendant capables d'adsorber spécifiquement un antigène. Ces anticorps sont le plus souvent de la classe des IgG<sub>2</sub> chez la souris et le cobaye. Les macrophages possèdent des récepteurs spécifiques des IgG et des IgM (HUBER et FUDENBERG, 1968<sup>177</sup>; HUBER et coll., 1971)<sup>178</sup>. Le traitement par la trypsine abolit la capacité de destruction de la cellule-cible, activité qui est retrouvée par incubation des macrophages dans le sérum d'un animal immun.

La fixation des anticorps cytophiles aux macrophages les rend spécifiquement récepteurs aux antigènes des cellules-cibles, permettant leur spécificité d'action.

La présence sur la membrane macrophagique de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, rend les macrophages capables d'adhérer à des cellules recouvertes d'opsonines, anticorps spécifiques des antigènes de l'organisme-cible, fixés par leur extrémité Fab, et dont l'extrémité Fc est disponible pour les récepteurs du macrophage. L'étroit contact qui découle de la fixation du macrophage à la cellule-cible, par les anticorps cytophiles ou par les opsonines, conduit soit à l'endocytose, soit à la lyse.

La fixation d'immunoglobulines natives n'induit pas d'endocytose. En revanche, la jonction de l'anticorps à son déterminant antigénique spécifique, induit une altération de configuration (transition allostérique) de l'immunoglobuline, qui se répercute au niveau du récepteur Fc du macrophage et déclenche le processus d'endocytose et d'activation. C'est ainsi que des immunoglobulines agrégées par chauffage sont suffisamment altérées pour induire ce mécanisme (HESS et LUSCHER, 1970)<sup>166</sup> et que certains immunocomplexes sont rapidement endocytés (SORKIN et BOYDEN, 1959)<sup>362</sup>. Leur fixation entraîne l'activation du macrophage (HEISE et coll., 1968)<sup>163</sup>. Une activation semblable est obtenue au moment de la fixation d'un macrophage à la cellule-cible par l'intermédiaire des anticorps cytophiles (ALLISON, 1972)<sup>9</sup>.

Il faut noter toutefois que ces anticorps cytophiles sont facilement déplacés : il est probable que la facilitation de la croissance tumorale observée par KELLER et JONES (1971)<sup>208</sup> chez des rats infectés par Nippostrongylus brasiliensis depuis plus de 10 jours est la conséquence d'un tel déplacement. En effet, les anticorps cytophiles anti-tumoraux seraient déplacés à la surface des macrophages par l'inondation des anticorps cytophiles à spécificité parasitaire, entraînant une augmentation de la croissance de la tumeur. Cet effet de facilitation est d'ailleurs transférable par le sérum des rats parasités.

L'injection du dérivé protéique purifié (PPD) qui est une forme purifiée de la tuberculine, dans la cavité péritonéale de rats immunisés par BCG, fait chuter le nombre de macrophages péritonéaux (NELSON et BOYDEN, 1961,<sup>282</sup> 1963<sup>283</sup> ; NELSON et NORTH, 1965)<sup>284</sup>. Les macrophages qu'il est encore possible de récupérer, ne forment pas de rosettes avec des hématies

recouvertes de PPD. Cette réaction négative est due au blocage des anticorps cytophiles présents sur les macrophages, par le PPD injecté avant le prélèvement de l'exudat péritonéal (SODOMANN et HAFERKAMP, 1969)<sup>361</sup>.

L'accroissement de la phagocytose semble donc une conséquence de la fixation d'immunocomplexes à la surface des macrophages. En plus des récepteurs du Fc, les macrophages possèdent des récepteurs pour le composant C3 du complément, qui leur permettraient la fixation d'immunocomplexes porteurs du complément, ou au moins du C3, entraînant l'activation et l'endocytose (WELLEK et coll., 1975)<sup>408</sup>.

Enfin, l'endocytose est accrue par des préparations contenant de l'interféron (HUANG et coll., 1971)<sup>176</sup>.

## 2) Mobilité diminuée

Lorsque s'installe l'hypersensibilité tuberculinique chez le cobaye, les lymphocytes incubés avec du PPD provoquent un arrondissement des macrophages péritonéaux d'un animal normal. Les phagocytes perdent leur mobilité et s'aggrègent aux lymphocytes (SALVIN et coll., 1971)<sup>336</sup>.

Ces mêmes transformations des macrophages s'observent avec les surnageants acellulaires des cultures de lymphocytes avec l'antigène auquel ils sont susceptibles. GALINDO (1972)<sup>144</sup> observe en microcinématographie un phénomène analogue avec des macrophages alvéolaires de lapins, immunisés par du bacille tuberculeux, en présence de PPD : les macrophages non seulement forment des amas mais fusionnent en cellules géantes multinucléées telles que ROKITANSKY en décrivait en 1855<sup>321</sup> dans les tissus tuberculeux, et telles qu'on en trouve dans toutes les réactions inflammatoires d'hypersensibilité retardée au point d'injection de l'antigène spécifique. Cette perte de mobilité est mise en évidence et utilisée en diagnostic dans l'inhibition de la migration des macrophages par le M.I.F. (facteur inhibiteur des macrophages, lymphokine produite par les lymphocytes immuno-compétents).

Il est à noter que l'injection de MIF quelques heures avant l'implantation d'hépatocytes tumoraux au même site supprime la croissance de la tumeur (BERNSTEIN et coll., 1971)<sup>30</sup>. L'analyse histologique du site de la réaction ne le distingue pas d'une réaction d'hypersensibilité retardée : infiltration lymphocytaire et cellules épithélioïdes géantes.

Cette observation rejoint celle de Mc GREGOR et LOGIE (1975)<sup>239</sup> qui montrent que la croissance du parasite Francisella tularensis est inhibée au niveau du point d'inoculation lorsqu'il est injecté en mélange avec du BCG chez un animal immun à Listeria. Cette inhibition n'a pas lieu si l'on inverse les germes par rapport au germe d'immunisation. Les auteurs notent une abondante infiltration de monocytes et de lymphocytes au point d'inoculation du mélange parasite-bactéries.

L'injection intraveineuse de l'antigène spécifique chez un animal hypersensible est suivie de l'apparition dans son sérum de deux lymphokines : MIF et interféron de type II (SALVIN et coll., 1973,<sup>337</sup> 1975<sup>338</sup> ; YOUNGNER et SALVIN, 1973)<sup>426</sup>.

Cette immobilisation des macrophages favorise la fixation de l'agent infectieux au point de pénétration dans l'organisme et crée un microenvironnement défavorable à son développement, étant agressé par les mécanismes de cytotoxicité spécifique et non spécifique localement activés.

### 3) Surface modifiée

L'altération de la mobilité et de la forme des macrophages est probablement liée au fait que la surface des phagocytes activés par un médiateur est modifiée : l'adhérence des cellules au support est très forte pendant 48 heures (DY et coll., 1974)<sup>121</sup> et la mobilité des voiles hyaloplasmiques est augmentée (NATHAN, 1971)<sup>280</sup>, l'activité de l'adényl-cyclase membranaire (REMOLD-O'DONNELL et REMOLD, 1974)<sup>317</sup> et l'incorporation de la glucosamine (HAMMOND et DVORAK, 1972)<sup>160</sup> sont également accrues.

La microscopie électronique révèle une décroissance de la densité aux électrons du matériel de surface (DVORAK et coll., 1972)<sup>119</sup>. L'activation in vivo entraîne également des altérations de surface (MACKANESS, 1970)<sup>243</sup>. Cet éclaircissement de surface dans les images de microscopie électronique s'observe aussi in vivo au niveau des macrophages qui participent au rejet de tumeur, ainsi que dans les macrophages inhibés par le MIF (DVORAK et coll., 1973)<sup>120</sup>.

Les cellules tumorales et les cellules transformées présentent aussi des altérations de surface, telles que différence de charge, différence d'agglutinabilité par les lectines, différence d'activité glycosyltransférase et modifications des glycoprotéines et des glycolipides. Il est tentant de supposer que les macrophages activés ont une capacité accrue de se fixer à ces cellules, et d'expliquer ainsi l'apparente sélectivité d'action des macrophages vis-à-vis de cellules néoplasiques.

#### 4) Production de toxines

Des cobayes sensibilisés par du BCG, ou de la sérumalbumine picrylée, ou de la gamma-globuline bovine, possèdent des macrophages qui, en présence des lymphocytes et de l'antigène sensibilisant, sont armés pour développer une importante bactéricidie vis-à-vis de Listeria monocytogenes. Or cette activité listericide subsiste après élimination par lavage des lymphocytes et des antigènes (SIMON et SHEAGREN, 1971)<sup>353</sup>.

Par conséquent, les macrophages mettent en oeuvre un mécanisme de cytotoxicité propre déclenché par le contact avec la cellule cible.

Après 48 heures de culture avec les cellules cibles (EVANS et ALEXANDER, 1970)<sup>124</sup> ou 48 heures après l'activation par une endotoxine (ALEXANDER et EVANS, 1971)<sup>6</sup>, l'activité cytotoxique disparaît. Elle peut cependant être ranimée par une nouvelle stimulation par l'endotoxine (REED et LUCAS, 1975)<sup>316</sup>. Ces derniers auteurs ont identifié une toxine, libérée par les macrophages, même normaux, dès leur fixation sur le support de culture in vitro et qui est produite pendant la période de cytotoxicité de 48 heures, mais dont le maximum est atteint déjà entre 4 et 8 heures. Il y a moins de toxine dans le milieu lorsque les cellules-cibles sont présentes dans la culture.

SETHI et coll. (1974)<sup>350</sup> ont identifié une substance listericide dans les surnageants de 5 heures de culture de macrophages péritonéaux d'animaux immunisés avec Listeria monocytogenes en présence de germes tués. Les surnageants de ces cultures s'opposent à la croissance des bactéries in vitro et montrent de la cytotoxicité vis-à-vis de cellules T. Le taux extracellulaire des enzymes lysosomiales n'est pas plus élevé que celui obtenu avec des macrophages normaux cultivés dans les mêmes conditions. Ces macrophages immuns présentent l'aspect "activé" habituel et sont le siège d'une forte activité listericide intracellulaire.

Plusieurs cytotoxines excrétées par les macrophages ont été identifiées (HEISE et WEISER, 1969<sup>164</sup>; PINCUS et coll., 1970<sup>311</sup>; Mc IVOR et WEISER, 1971<sup>240</sup>; KRAMER et GRANGER, 1972<sup>223</sup>; MELSOM et coll., 1974<sup>251</sup>; CALDERON et coll., 1974)<sup>57</sup>.

##### 5) Inflation enzymatique et exocytose des hydrolases

Morphologiquement, le macrophage activé est caractérisé par une augmentation de la taille des cellules, un développement important de l'appareil de Golgi, une augmentation du nombre des mitochondries et des lysosomes (SUTTON, 1967)<sup>374</sup>. C'est cependant essentiellement au niveau du métabolisme que les macrophages activés se distinguent des macrophages quiescents : les enzymes hydrolytiques, localisées par fractionnement cellulaire dans les lysosomes, augmentent fortement (HARD, 1970<sup>161</sup>; SAITO et SUTER, 1965<sup>334-5</sup>; JOSEPH, 1974)<sup>198</sup>; les macrophages qui s'accumulent localement au niveau d'une réaction d'hypersensibilité retardée présentent un net accroissement des activités bêta-glucuronidase, bêta-galactosidase, phosphatase acide, succinodeshydrogénase et cytochrome oxydase (DANNENBERG, 1968)<sup>98</sup>. Les taux enzymatiques de ces macrophages sont plus élevés que ceux relevés dans les macrophages de n'importe quel autre point de l'organisme.

Toutes les substances ou infections qui provoquent des réactions inflammatoires in vivo, sont responsables d'une exocytose des enzymes lysosomiales des macrophages : amiante (DAVIES et coll., 1974)<sup>99</sup>, plaque dentaire (PAGE et coll., 1973)<sup>301</sup>, immuncomplexes (CARDELLA et coll., 1974)<sup>75</sup>, parois cellulaires de Streptocoques (DAVIES et coll., 1974)<sup>100</sup>; PAGE et coll., 1974)<sup>302</sup>, la cytochalasine B (DAVIES et coll., 1973)<sup>101</sup>. Ce relargage massif et rapide, se produit en absence de toute mort cellulaire et s'accompagne d'un accroissement considérable du taux des enzymes cytoplasmiques (lacticodeshydrogénase, leucine-bêta-naphtylamidase, par exemple). En revanche, la silice, qui est toxique pour les macrophages et dont les groupements hydroxylés forment des ponts hydrogènes avec les phospholipides de la membrane macrophagique, ne provoque pas de relargage enzymatique. L'importance de cette exocytose dans la cytotoxicité médiée par les macrophages est encore problématique.



Il est possible que les réactions d'hypersensibilité retardée provoquent in situ un relargage enzymatique (SAITO et SUTER, 1965)<sup>334</sup>. Les hydrolases acides, surtout la bêta-glucuronidase, augmentent fortement dans le plasma de souris vaccinées avec du BCG.

La plus grande partie des travaux consacrés à la stimulation des fonctions macrophagiques a été réalisée avec les divers lipopolysaccharides (LPS) (ou lipopolyosides) des bactéries gram-négatives.

L'addition de LPS d'E. coli à une culture de macrophages péritonéaux de souris, donne une augmentation des phosphatases acides et de la bêta-N-acétylglucosaminidase avec leur relargage sélectif dans le milieu. Il semble que la bêta-glucuronidase et la bêta-galactosidase ne sont pas stimulées (ALLISON et coll., 1973)<sup>10</sup>. Les enzymes non-lysosomiales (évaluées sur le taux de LDH et de leucine-naphtylamidase) doublent leur taux et restent dans les cellules.

L'endotoxine de Salmonella abortus equi active les macrophages péritonéaux murins in vitro (COHN et BENSON, 1965)<sup>85</sup>: augmentation de la taille et du nombre des granules à activité phosphatasique acide, hypertrophie de l'appareil de Golgi, augmentation du nombre et de la taille des lysosomes (COHN et coll., 1966)<sup>86</sup>. Un microgramme par ml de LPS augmente la phagocytose d'or colloïdal et de bactéries.

Le LPS stimule l'activité bactéricide des polynucléaires (COHN et MORSE, 1960)<sup>84</sup> et des macrophages (AUZINS et ROWLEY, 1962)<sup>21</sup>; ces dernières cellules voient également leurs phosphatases acides augmenter. WEISSMANN et THOMAS (1962)<sup>407</sup> ont montré que l'injection au jeune lapin d'endotoxine d'Enterobacter aerogenes augmente la labilité des lysosomes isolés immédiatement après; le taux sérique des hydrolases acides s'accroît. Ces deux effets sont atténués par l'induction d'une tolérance à l'endotoxine (JANOFF et coll., 1962)<sup>185</sup>.

L'exocytose enzymatique des macrophages est probablement la cause de l'hyperréactivité des animaux aux endotoxines, à la suite de certaines immunisations. En effet, s'il faut injecter plus d'un milligramme de LPS d'E. coli à des souris normales pour tuer la moitié des animaux et tripler le taux de bêta-glucuronidase plasmatique, l'injection de 0,4 microgrammes seulement de cette endotoxine à des souris immunisées par le BCG depuis dix à quinze jours, entraîne la mort de

80 p. cent des animaux et accroit de 100 fois le taux plasmatique de bêta-glucuronidase. Par une série d'injections intrapéritonéales de doses minimales mais croissantes de LPS, il est possible de désensibiliser les souris immunisées par le BCG. Ces animaux ne libèrent plus autant de  $\beta$ -glucuronidase et leur mortalité diminue aux fortes doses de LPS. Or le taux intracellulaire (foie, macrophages péritonéaux, leucocytes sanguins) de cette enzyme est identique avant et après désensibilisation. L'endotoxine intervient probablement au niveau de la membrane lysosomiale (SAITO et SUTER, 1965)<sup>335</sup>.

Il a été possible de détoxifier 3  $\mu$ g/ml d'endotoxine de Salmonella enteritidis par des extraits cellulaires de macrophages péritonéaux, alvéolaires et hépatiques de rats (les concentrations protéiques des extraits étant de 0,5 mg/ml). Avec les fractions lysosomiales de ces broyats, l'endotoxine est détoxifiée par des concentrations protéiques minimum de 12 microgrammes par ml. Les broyats de monocytes et de polynucléaires sont inefficaces (FILKINS, 1971a<sup>135</sup> et b)<sup>136</sup>.

Ces observations laissent supposer que les lysosomes des macrophages jouent un rôle important dans les germes pathogènes d'une infection.

Les parois cellulaires des streptocoques du groupe A produisent également une activation des macrophages. Jusqu'à 10  $\mu$ g/ml l'augmentation des enzymes est purement intracellulaire. Au delà et jusqu'à 50  $\mu$ g/ml, il y a une forte exocytose des enzymes lysosomiales dans le milieu, sans traumatisme cellulaire (les enzymes non lysosomiales augmentent dans les cellules mais ne sont pas exocytées). Chez le sujet normal, l'injection de ces parois cellulaires provoque une réaction inflammatoire chronique infiltrée de macrophages (PAGE et coll., 1974)<sup>302</sup>.

L'élévation du taux enzymatique lysosomal chez le macrophage activé constitue-t-elle un mécanisme de la cytotoxicité ? On peut se le demander car, si HIBBS (1974)<sup>170</sup> a montré le passage de vésicules lysosomiales dans les cellules-cibles, et par M. CAPRON (1974)<sup>74</sup> des images de microscopie électronique présentant une véritable trépanation des schistosomules de S. mansoni par des pseudopodes macrophagiques, plusieurs auteurs ont relevé un blocage des mécanismes enzymatiques autour d'agents infectieux intracellulaires vivants :

HART et ARMSTRONG (1974)<sup>162</sup> notent que les mycobactéries ingérées par des macrophages péritonéaux de souris in vitro, et contenues dans les phagosomes peuvent être classées, par microscopie électronique, en deux catégories : "endommagées" et "intactes". La fusion des lysosomes secondaires, marqués à la ferritine, avec les phagosomes contenant des organismes endommagés (présumés morts) est générale pour toutes les espèces mycobactériennes examinées par les auteurs. En revanche, la fréquence de fusion avec les phagosomes contenant des populations intactes (probablement vivantes) semble dépendre de la virulence du germe pathogène, cette fusion étant beaucoup moins fréquente avec du bacille tuberculeux virulent qu'avec une souche avirulente.

Le même phénomène a été observé par JONES et HIRSH (1972)<sup>195</sup> avec le parasite Toxoplasma gondii pour lequel les lysosomes ne fusionnent pas avec les phagosomes contenant des parasites vivants.

Ces éléments indiquent donc que l'agression enzymatique n'est pas le mécanisme de la cytotoxicité, mais qu'il complète un ou d'autres processus mis en oeuvre par les macrophages contre la cible choisie.

#### 6) Autres mécanismes cytotoxiques

L'existence d'autres mécanismes cytotoxiques dont disposeraient les macrophages pour vaincre les agents infectieux sont beaucoup plus conjecturales.

Pour ALLISON (1972)<sup>9</sup>, l'un des mécanismes cytotoxiques du macrophage pourrait être une activation locale d'une partie du système du complément dont les macrophages possèdent plusieurs composants. De toute façon, la cytotoxicité des macrophages ne nécessite pas de complément extrinsèque (Mc IVOR et WEISER, 1971)<sup>240</sup>.

FAUVE et HEVIN (1971)<sup>128</sup>, quant à eux, soulignent l'importance des radicaux libres dans l'activité bactéricide des macrophages, dont l'origine serait le système transferrine-acide ascorbique. On sait que les macrophages synthétisent la transferrine, et leur teneur en acide ascorbique est importante. Il serait intéressant de connaître dans quelle mesure les divers immunostimulants utilisés sont capables de modifier l'efficacité bactéricide d'un tel système.

- CONCLUSION

Le macrophage est un acteur capital des mécanismes d'immunité à médiation cellulaire, spécifique et non spécifique. Son intervention in vivo semble se produire en deux étapes :

- a) une phase d' "information" ou de sensibilisation, par des lymphokines sécrétées par les lymphocytes lorsqu'ils entrent en contact avec l'antigène auquel ils sont sensibles ; cette phase aboutit à l'armement spécifique ou non spécifique du macrophage et à son attraction sur les lieux de l'intrusion d'antigènes étrangers ; et
- b) une phase d'activation, lorsque le macrophage entre en contact avec l'antigène contre lequel il a été armé.

Cet armement des macrophages est réalisé soit par les médiateurs lymphocytaires, qui ont probablement une activité cytophile pour les cellules phagocytaires mononucléées, soit par des anticorps cytophiles IgG et des réagines IgE.

Quant à l'activation des macrophages, elle aboutit à les rendre cytotoxiques pour de nombreux organismes, tels que bactéries, champignons, parasites, cellules tumorales ou greffes allogéniques.

Cette activation se marque par une phagocytose intense ou par une adhérence très forte à la cible, deux phénomènes facilités par les anticorps cytophiles et opsonisants. Elle se traduit également par une immobilisation des macrophages au point d'action sur les cellules-cibles, immobilisation qui semble être sous la dépendance de lymphokines.

Le macrophage activé voit sa surface se modifier. Il excrète des toxines qui semblent porteuses d'une importante activité bactéricide. Son métabolisme s'accroît considérablement et principalement son contenu en enzymes lysosomiales hydrolytiques. Le rôle des enzymes dans la cytotoxicité est cependant loin d'être clair : ALEXANDER et EVANS (1971)<sup>6</sup> notent que les endotoxines bactériennes, qui déclenchent une forte synthèse enzymatique dans les macrophages et un relargage de ces protéines vers l'extérieur, rendent des cellules péritonéales capables de tuer non spécifiquement des cellules-cibles avec lesquelles elles entrent en contact.

Il est possible que l'activité cytotoxique soit la résultante de toute une gamme de mécanismes parmi lesquels il faut ajouter des composants du complément que possède le macrophage et l'intervention de radicaux libres dans un système d'oxydoréduction basé sur l'acide ascorbique et la transferrine.

Ce tableau impressionnant des remarquables propriétés des macrophages activés ne doit cependant pas faire oublier qu'ils ne sont pas les seuls participants de l'immunité cellulaire et que l'immunité non spécifique a des limites : des rats immunisés avec Listeria monocytogenes s'opposent à la croissance du même germe mais pas à celle du parasite Francisella tularensis, alors que des rats immunisés avec le parasite s'oppose à la croissance des deux types de microorganismes (Mc GREGOR et LOGIE, 1975)<sup>239</sup>. La composition chimique et le métabolisme de ces agents infectieux jouent probablement un rôle primordial sur la nature et l'ampleur des mécanismes immunitaires stimulés.

C'est ce qui conserve tout son intérêt à l'analyse biochimique détaillée des organismes infectieux et de leurs diverses fractions.

## II - LES STIMULANTS DU MACROPHAGE

Très peu de publications rapportent des expériences de stimulation directe des macrophages dans un système in vitro débarrassé des autres cellules susceptibles d'interférer. La plupart des observations concernant l'activation des macrophages ont été réalisées in vivo, où les interactions cellulaires jouent certainement un grand rôle.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les substances qui stimulent non spécifiquement les macrophages sont innombrables.

La simple introduction de liquide de Hanks stérile dans la cavité péritonéale d'un animal déclenche une ascite où les macrophages constituent en quelques heures la population dominante.

La banale injection intrapéritonéale d'eau physiologique modifie légèrement le taux enzymatique des macrophages par rapport à celui des cellules non "irritées".

Cependant, cette simple irritation des macrophages est insuffisante pour activer efficacement et durablement les phagocytes vis-à-vis des cellules-cibles. Les substances stimulantes interfèrent directement ou indirectement avec des récepteurs de surface ou des composants de la membrane des macrophages, modifiant ainsi leur métabolisme et leur physiologie, tel que nous l'avons décrit précédemment.

#### A) Adjuvants mycobactériens

Certaines des fractions extraites des Mycobactéries, qui possèdent une activité adjuvante sur l'immunité humorale, aboutissent à une stimulation des macrophages.

##### 1) Le cord-factor

L'injection intrapéritonéale de cord-factor à des souris augmente l'activité phosphatasique acide des macrophages péritonéaux (BEKIERKUNST et coll., 1971)<sup>26</sup> et protège les animaux contre des infections non spécifiques ou contre la croissance d'une tumeur ascitique d'Ehrlich.

Il se produit une importante infiltration de macrophages dans le granulome formé par le cord-factor injecté en émulsion d'huile dans l'eau, au niveau des coussinets plantaires de souris, et dans les ganglions drainants.

L'injection intratumorale de parois délipidés et déprotéinisés de BCG additionnés de cord-factor en émulsion dans l'huile, permet la régression des tumeurs chez 83 % des animaux, alors que les parois seules ne donnent que 33 % de régressions (BEKIERKUNST, 1974)<sup>28</sup>.

##### 2) La cire D

KELLER et SORKIN (1967)<sup>206</sup> ont proposé le terme de cytotaxines pour les substances douées de propriétés chemotactiques pour les macrophages et les autres leucocytes. Telle serait la cire D qui présente une importante activité

granulomateuse lorsqu'elle est injectée dans une émulsion d'eau dans l'huile (WHITE et coll., 1955)<sup>410</sup>. Cette activité est cependant très faible lorsque la cire D est introduite sur des gouttelettes d'huile en suspension dans l'eau (BERKIERKUNST et coll., 1971)<sup>27</sup>. Les macrophages infiltrés dans les granulomes sont fortement activés.

### 3) Le M E R

Le résidu de l'extraction méthanolique des mycobactéries stimule la résistance aux tumeurs en potentialisant la réponse cellulaire aux antigènes tumoraux (KUPERMAN et coll., 1972)<sup>227</sup>. Les macrophages participent efficacement à l'activité anti-tumorale induite par cet extrait.

### 4) Le Poly-Pa

Le polyglycane-glycopeptide azoté de Danièle MIGLIORE et JOLLES (1972)<sup>257</sup> ne stimule pas le pouvoir phagocytaire du système réticulo-endothélial de la souris, mais montre une certaine action anti-tumorale (WERNER et coll., 1974)<sup>409</sup>.

### 5) Le M A A F

Le facteur mycobactérien adjuvant et antitumoral stimule l'immunité antitumorale lorsqu'il est injecté avec des cellules leucémiques tuées (HIU, 1972)<sup>172</sup>. S'agit-il d'une activation directe des macrophages ou d'une stimulation spécifique par les lymphokines dont la production est facilitée par la présence de MAAF ? Il est difficile actuellement de le préciser.

### 6) Le W S A

JOHNSON et coll., 1974<sup>190</sup> ont obtenu une activation in vitro des macrophages en incubant des cellules d'un exudat péritonéal de souris pendant 18 à 24 heures avec 50 µg de WSA. Les cellules présentent une cytotoxicité de 50 % vis-à-vis de cellules leucémiques syngéniques.

7) L' I P M

L'Interphase Material, isolé au cours du fractionnement de parois de M. smegmatis par des solvants organiques et qui est une préparation microparticulaire, riche en lipides, est capable d'activer in vivo et in vitro des macrophages qui deviennent capables d'inhiber la croissance du mastocytome P815 (JUY, 1974)<sup>199</sup>.

B) Autres stimulants des macrophages1) L' E B P

L'extrait bactérien phospholipidique de FAUVE et HEVIN (1975)<sup>128</sup> accélère la clearance de Klebsiella ou de Salmonella chez la souris. Le pouvoir bactéricide des macrophages hépatiques et spléniques est très augmenté envers Listeria. Ce mélange de phospholipides, extraits de toute une série de bactéries, n'est pas toxique et n'entraîne que peu de modification de la formule sanguine ; on ne note pas d'aplasie thymique ni d'hépatome et de splénomégalie.

Il semble que l'EBP, qui est également un mitogène B, agisse principalement sur les macrophages, améliorant ainsi la coopération T - B lymphocytes dans la réponse humorale (MARCHAL, 1975)<sup>250</sup>.

2) Le N W S M

Le mitogène hydrosoluble de Nocardia stimule in vivo et in vitro des macrophages qui deviennent capables d'inhiber la croissance de mastocytomes et celle des cellules L 1210 (BONA et coll., 1974)<sup>40bis</sup>.

3) Corynebacterium parvum

Ce microorganisme donne des macrophages cytotoxiques même chez des souris thymodéficientes, alors que le polynucléotide synthétique poly I : C n'agit pas chez des souris sans thymocytes (WOODRUFF, 1974)<sup>422</sup>.



#### 4) Le LPS

Les endotoxines des bactéries gram-négatives (en général le lipopolysaccharide d'E. coli ou celui de S. typhosa) sont responsables d'une forte augmentation des activités lysosomiales des macrophages (ALLISON, 1974)<sup>11</sup>.

GERY et WAKSMAN (1972)<sup>146</sup> indiquent que les macrophages traités par le LPS libèrent un facteur qui stimule les lymphocytes. Ce même facteur a été partiellement purifié par CALDERON et coll. (1975)<sup>60</sup>. Il faut rapprocher ces observations de celles de DIAMANTSTEIN et ULMER (1975)<sup>107</sup> qui notent que la stimulation de la synthèse d'ADN par les lymphocytes lors d'addition exogène de GMP nécessite la présence des macrophages. Ceux-ci relarguent un facteur non-dialysable, actif également en présence d'autres mitogènes (PHA, LPS) et qui stimule essentiellement les lymphocytes T. Ce nucléotide cyclique serait donc mitogène, au moins partiellement, par l'intermédiaire d'une activation des macrophages.

5) Signalons enfin que de très faibles quantités d'histamine augmentent l'activité phagocytaire des macrophages (KATO et GOZSY, 1964)<sup>201</sup>, mécanisme qui pourrait intervenir dans le problème principal de notre travail : l'immunité à la réinfection dans la schistosomiase expérimentale.

#### CONCLUSION

Nous évoquions, dans l'introduction du chapitre 2, le bienfait que constituerait l'identification et l'isolement de constituants actifs soit sur l'immunité à médiation humorale, soit sur l'immunité à médiation cellulaire, selon le but souhaité de la thérapeutique.

Or, il apparaît qu'avec la plupart des substances actuellement isolées, il est possible de stimuler aussi bien l'un que l'autre type d'immunité, en partie parce que le macrophage intervient aux deux niveaux pour augmenter l'efficacité des mécanismes.

Cependant, il convient de mettre à part le muramyl-dipeptide isolé de la paroi de la plupart des bactéries, maintenant synthétisé industriellement, et qui semble être un adjuvant purement humoral. On aurait là une structure, sinon la structure, de base des substances stimulatrices de la

synthèse des immunoglobulines. Il est possible que l'immunité cellulaire, quant à elle, puisse être potentialisée, et elle seule, par d'autres molécules bien définies. Il apparaîtrait alors que si le macrophage intervient dans l'un et l'autre cas, c'est par l'activation de deux fonctions distinctes, déclenchées chacune par l'une des molécules attachées à ce rôle et contenues dans les microorganismes, capables de développer l'immunité spécifique et non spécifique. Il n'est d'ailleurs pas exclu que ces deux fonctions distinctes soient assurées par des classes différentes de macrophages que l'expérimentation commence à révéler (WALKER, 1974)<sup>397</sup>.

TRAVAUX PERSONNELS

---

---

## INTRODUCTION

L'immunité à la réinfection par Schistosoma mansoni chez le rat, se caractérise par une importante augmentation des immunoglobulines E (ou réagines).

Or, l'un des mécanismes principaux par lesquels les animaux parviennent à détruire les larves de réinfestation et à se protéger contre une nouvelle infection, est constitué par l'armement spécifique des macrophages avec les IgE et plus précisément avec des immunocomplexes IgE-antigènes parasitaires lorsque ceux-ci sont libérés dans la circulation au cours du rejet des vers adultes de l'infection initiale.

Cet armement des macrophages leur permet, au moins in vitro, d'adhérer étroitement et durablement aux schistosomules et d'exprimer une cytotoxicité importante capable de tuer un fort pourcentage de larves en une vingtaine d'heures.

Dans ce travail, nous avons cherché, par l'utilisation de quelques substances adjuvantes, à stimuler non spécifiquement l'activité métabolique des macrophages pour augmenter leur cytotoxicité dans le système in vitro macrophage - IgE - schistosomules.

Pour cela, nous avons tout d'abord testé l'effet d'un certain nombre de substances, in vivo et in vitro, sur des macrophages péritonéaux de rats normaux, en mesurant le taux intra et extracellulaire de quelques enzymes lysosomiales et cytoplasmiques.

Puis, nous avons armé les macrophages, ainsi activés, avec les IgE contenues dans le sérum de rats infestés depuis des temps variables, et avons évalué leur cytotoxicité vis-à-vis de larves de schistosomes marquées par du chrome 51 radioactif. Le chrome, fixé sur les protéines intracellulaires, est relargué dans le milieu de culture à la mort des cellules et permet de juger de l'intensité de l'agression macrophagique sur sa cible, par la mesure de la radioactivité gamma libérée dans le surnageant.

L'activation du macrophage a donc constitué l'une des voies de potentialisation du mécanisme destructeur des larves par ces cellules. L'autre aspect du problème est lié aux immunoglobulines E.

Le taux sérique global des IgE augmente fortement entre le 20ème et le 40ème jour de l'infection par S. mansoni chez le rat Fischer, pour atteindre un maximum entre 40 et 50 jours. Nous avons cherché à potentialiser la production de ces immunoglobulines en injectant aux animaux, au moment de l'infestation expérimentale, des adjuvants humoraux susceptibles d'augmenter le taux maximum observé chez les animaux non immunostimulés.

Nous avons utilisé : une bactérie connue pour son effet potentialisateur des réagines : Bordetella pertussis (agent de la coqueluche), le LPS de Salmonella typhosa (agent de la typhoïde), une lipoprotéine extraite du liquide hydatique du parasite Echinococcus granulosus, le WSA (Watersoluble adjuvant) isolé de Mycobacterium smegmatis, et un antigène mycobactérien isolé par nous-mêmes de M. smegmatis et M. phlei. La première partie du chapitre suivant a pour but de décrire l'isolement, la caractérisation physico-chimique et les propriétés biologiques de cette dernière substance.

CHAPITRE IV

IMMUNOSTIMULATION HUMORALE ET MACROPHAGIQUE

## I - ISOLEMENT D'UNE FRACTION ANTIGENIQUE MYCOBACTERIENNE : L'ANTIGENE R (Ag R)

L'étude des antigènes des Mycobactéries a fait l'objet d'innombrables recherches, non seulement depuis la découverte du bacille de KOCH, mais surtout depuis l'observation de l'effet immunostimulant spécifique et non spécifique de ce genre bactérien dans les divers supports adjuvants utilisés en immunologie.

Ces travaux présentent trois intérêts principaux :

- a) classification des Mycobactéries,
- b) compréhension de leur pouvoir pathogène, et
- c) compréhension de l'effet stimulant exercé par les fractions chimiques et les constituants cellulaires de ces microorganismes sur le système immunitaire de l'hôte.

Des recherches, initialement à but taxonomique (ROOS et coll., 1967<sup>323</sup>a et b)<sup>324</sup>, nous ont conduit à isoler un antigène spécifique des Mycobactéries, dont nous avons examiné l'effet immunostimulant dans diverses situations immunologiques.

### A) Obtention de l'antigène

Le fractionnement a été originellement réalisé sur Mycobacterium phlei, souche saprophyte non pathogène à croissance rapide, puis étendu à d'autres espèces.

#### 1) Culture et broyage

Selon la quantité de bactéries nécessaire, une culture de Mycobacterium phlei 689 (Hauduroy, Lausanne) est réalisée soit en fiole d'un litre, soit en fermenteur de 15 litres, sur un milieu synthétique sans protéines ni peptides : le milieu liquide de SAUTON (cf. pages techniques 178).

Après cinq à six jours de culture agitée ou en voile à 37°C, les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. Elles sont recueillies stérilement et lavées à l'eau distillée. Une fiole à toxine d'un litre de milieu fournit une dizaine de gramme (poids humide) de bactéries, un fermenteur de 15 l, 150 à 200 g.

La masse bactérienne est broyée, soit par cryobroyage pour des quantités supérieures à 10 g (ROOS et coll., 1967b)<sup>324</sup>, soit par la zéolithe (aluminosilicate de synthèse) pour les masses bactériennes inférieures à 10 g (JOSEPH et coll., 1970) (cf. pages techniques 178).

## 2) Séparation des parois et du contenu cellulaire

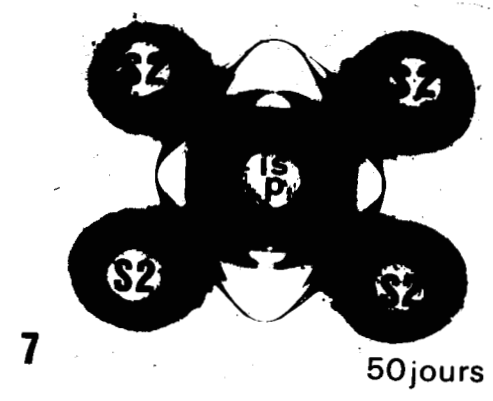
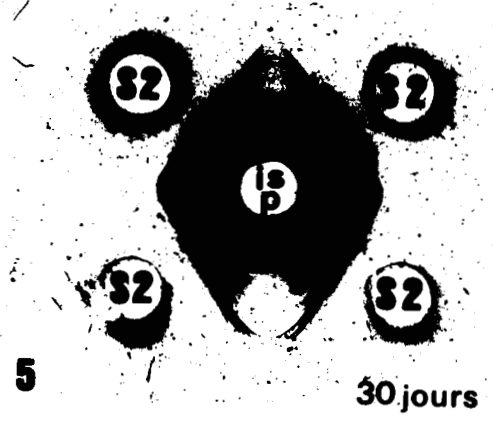
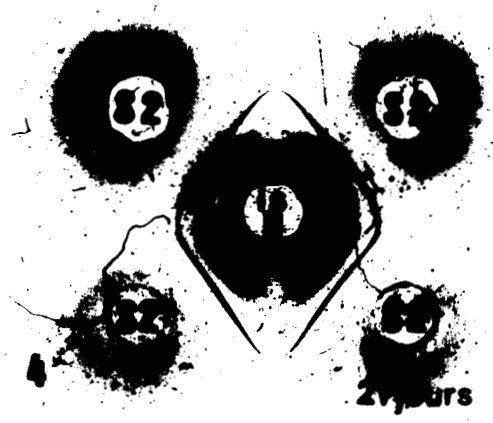
Les broyats repris dans un tampon Tris  $10^{-2}$ M,  $MgCl_2$   $10^{-2}$ M pH 7,2, sont soumis à une centrifugation à 600 g pendant dix minutes pour éliminer les bactéries intactes qui subsistent.

Puis une centrifugation du surnageant précédent à 12.000 g pendant une heure, sépare les parois bactériennes et grands fragments de membrane cytoplasmique d'un surnageant constitué des éléments solubles et particuliers du contenu cellulaire.

Dans nos conditions de préparation (50 ml de Tris pour 10 g -poids humide- de bactéries), ce surnageant 12.000 g (ou S2) contient de 10 à 15 mg de protéines par ml (dosage de LOWRY -1951-<sup>237</sup> avec la sérumalbumine comme référence). En électrophorèse sur gel d'acrylamide, à pH 8,3, il présente un grand nombre de protéines. Injecté en sous-cutanée à des lapins, émulsionné avec de l'adjuvant incomplet de Freund (injections hebdomadaires dans les flancs pendant deux mois, d'1 ml de surnageant émulsionné avec 1 ml d'adjuvant huileux), ce surnageant fournit un sérum riche en anticorps précipitants, mis en évidence par immunodiffusion en gélose (technique d'OUCHTERLONY)<sup>300</sup> ou en immunoélectrophorèse bidimensionnelle (LAURELL, 1965)<sup>230</sup> (cf. pages techniques 182).

Parmi tous les antigènes mycobactériens ainsi révélés, il en est un qui apparait précocement et de manière très nette par rapport aux autres (planche I).





### 3) Isolement de l'antigène R

Une étude du fractionnement des antigènes du surnageant S2 avait conduit ROOS (1970)<sup>325</sup> à déposer cette solution sur un gradient de saccharose 10 à 20 %. Après 16 h de centrifugation à 90.000 g et 4°C, il identifiait dans le culot quatre antigènes parmi lesquels l'antigène signalé ci-dessus, arbitrairement nommé pour la commodité de l'exposé, antigène R.

Cet antigène était isolé par filtration sur colonne de Sephadex G50, d'où il était exclu, élué dans les premières fractions succédant au volume mort de la colonne.

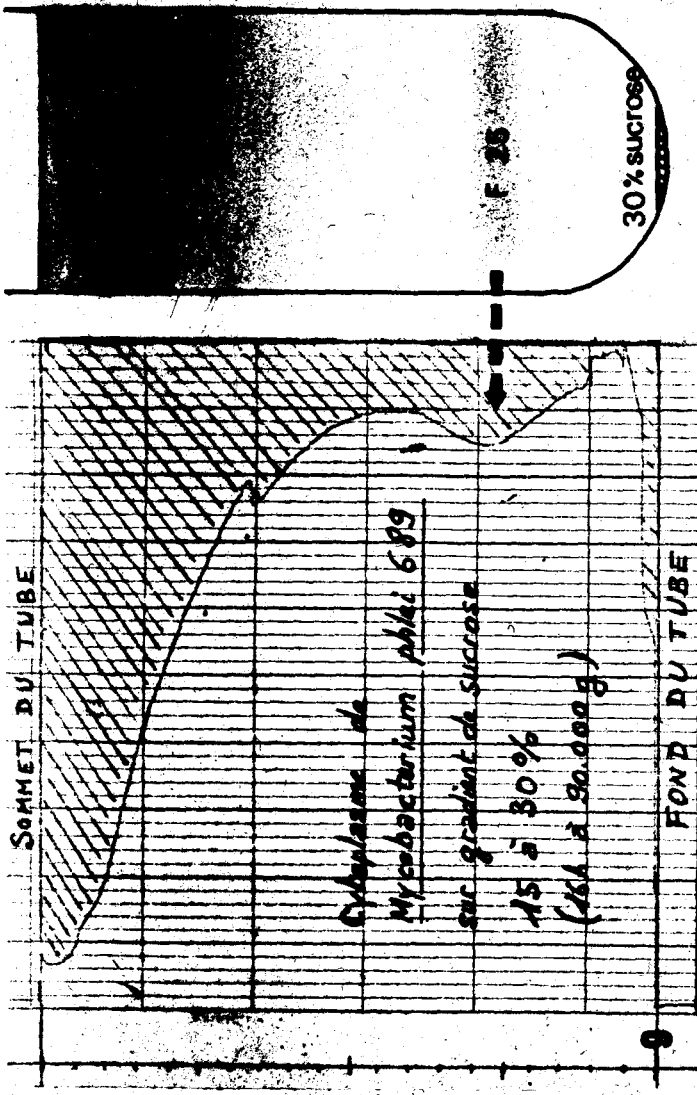
Les premières observations sur cet antigène R semblaient intéressantes : en particulier l'antigène se révélait spécifique des Mycobactéries et commun aux diverses espèces de ce genre.

Aussi avons-nous choisi d'en étudier quelques propriétés biologiques, et plus particulièrement immunologiques. Nous en avons modifié la purification, afin d'en assurer un isolement plus rigoureux que celui qu'il est possible d'obtenir dans un pic d'exclusion sur Sephadex.

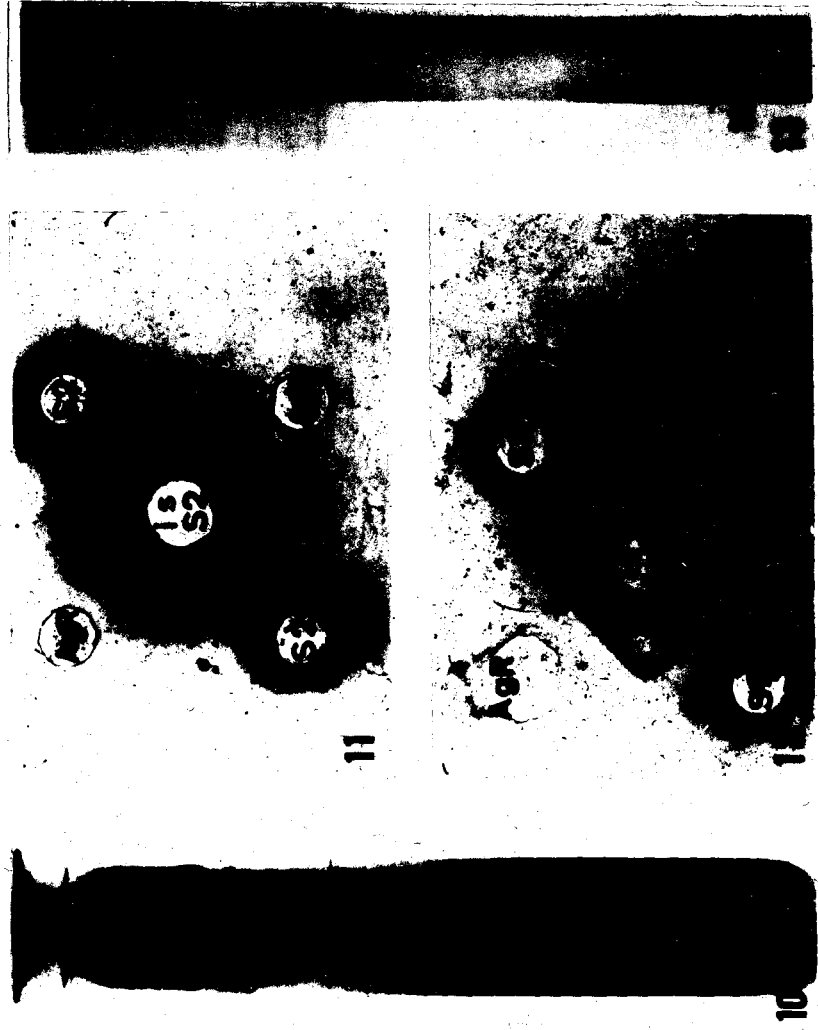
#### Modifications de la technique initiale

Afin d'éviter la descente de l'antigène R dans le culot lors de la centrifugation sur gradient de saccharose 10 à 20 %, culot constitué d'antigènes particuliers, débris de membranes cytoplasmiques et de mésosomes, nous avons augmenté la densité de la solution de saccharose par l'utilisation d'un gradient de 10 à 30 %. Dans ces conditions, une centrifugation de 16 h à 90.000 g et 4°C permet de séparer l'antigène R du culot.

Avec le contenu cellulaire de M. phlei, une zone colorée en jaune est visible dans le dernier tiers du gradient entre 24 et 27 % de saccharose environ. Nous appelons cette partie du gradient fraction 25 (25 %). L'enregistrement en continu de l'absorbance du gradient complet à 280 nm, pour les protéines, donne la courbe de la fig. 9 où la fraction 25 apparaît nettement. Cette zone est constituée presque exclusivement de l'antigène R et se trouve débarrassée des éléments particuliers (planches II et III, clichés 10 et 19).



Cytoplaste de  
*Mycobacterium phlei* 689  
 sur gradient de sucrose  
 15 à 30%  
 (16 à 30.000g)



BUS  
 LUIE

PLANCHE II

En électrophorèse sur gel d'acrylamide à 7,5 %, cet antigène de M. phlei apparaît très nettement, sans révélation spécifique des protéines, sous forme d'un étroit disque jaune foncé. Aussi avons-nous injecté directement à un lapin la partie du gel d'acrylamide contenant l'antigène. Pour cela, nous découpons un disque de 1 cm de diamètre sur 3 mm d'épaisseur au niveau de la bande colorée, le broyons au Virtis et mettons en suspension la pâte obtenue dans 2 ml de tampon phosphate physiologique. Ce type de préparation est injecté en sous-cutanée dans le flanc pendant deux mois à raison d'une injection hebdomadaire et nous donne un immunosérum unispécifique de l'AgR (planche II).

Les propriétés biologiques de l'AgR ont été étudiées après son isolement par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide. Le sérum unispécifique permet également une purification de l'AgR à partir de la fraction 25, par passage sur un immunoadsorbant réalisé par couplage des immunoglobulines G de ce sérum sur de la Sepharose activée au bromure de cyanogène. Cependant, si théoriquement cette dernière technique est préférable, en pratique nous avons obtenu un isolement plus pur par électrophorèse préparative sur acrylamide.

Une troisième technique, que nous n'avons pas utilisée, pourrait être employée : l'électrofocalisation de la fraction 25 sur ampholytes.

## B) Nature de l'antigène R

### 1) Caractérisation

L'électrophorèse de la Fraction 25 du gradient de saccharose sur gel de polyacrylamide à 7,5 %, pH 8,3, entraîne l'isolement de l'AgR sous forme d'une bande de RF égal à 0,125, colorable au Bleu de COOMASSIE R et au Noir Amide 10B (Photos 10 et 13, planche II), coloration caractéristique des protides.

Une précoloration de la fraction 25 au Noir Soudan B, selon la technique de MAC DONALD et KISSANE (Analyt. Biochem., 1960, 2, 178), avant électrophorèse, ne donne pas de coloration de l'AgR. Par conséquent, si la fraction AgR contient des lipides, ceux-ci ne sont pas colorables au Noir Soudan.

Dans le même type de séparation sur gel de polyacrylamide, il n'a pas été possible de mettre en évidence de sucres par l'oxydation périodique de Schiff.

De même, l'AgR n'est catabolisé ni par la RNase, ni par la DNase.

L'électrophorèse en gélose à pH 8,6 de l'AgR révèle une migration très anodique (Photos 19 et 20, planche III), qui est empêchée en gel de polyacrylamide à 7,5 % par la taille importante de la fraction.

La technique actuellement utilisée pour récupérer l'AgR consiste à découper la partie du gel d'acrylamide qui le contient (soit par sa coloration propre chez M. phlei ou M. smegmatis, soit par analyse du tube d'acrylamide dans un spectrophotomètre à U.V. dans le cas de souches non colorées, BCG par exemple), à le laisser diffuser dans de l'eau distillée, avant de dialyser la solution obtenue, pour éliminer les sels de l'électrophorèse, et terminer par une lyophilisation.

Au cours de cette opération, nous avons remarqué, dans certains cas, une instabilité de la fraction purifiée, instabilité qui réduit une partie plus ou moins importante de molécules en peptides ayant, lors d'une nouvelle électrophorèse sur acrylamide, un RF de 1,0. Indépendamment de la labilité des protéines en solution purifiée, nous ne pouvons écarter la possibilité que l'AgR comporte ou soit une fraction à activité protéinase.

Il ne nous a pas été possible de réaliser une analyse chimique précise de ce protide, car, dans nos conditions de fractionnement et de diffusion, nous entraînons une importante quantité de polymères d'acrylamide, non retenus sur filtres 0,2  $\mu$ m. Toutefois, du point de vue immunologique, cette fraction extraite du gel d'acrylamide est pure.

- Acide-Aminé N-terminal : Nous avons déterminé l'acide-aminé N-terminal par dansylation en présence de dodecylsulfate de sodium (SDS) selon la méthode de ISHITANI et coll. (1975)<sup>182</sup>.

La dansylation de l'AgR, purifié sur gel d'acrylamide en tampon Tris-borate pH 8,3 pour éviter le glyco-colle du tampon habituel (Tris-glyco-colle), a donné un seul acide-aminé N-terminal : l'histidine, révélé en chromatographie sur couche mince.

Il demeure possible qu'une autre chaîne existe dont l'acide-aminé serait bloqué et donc non révélable par dansylation. Cependant les expériences de réduction rapportées ci-dessous semblent confirmer que l'AgR ne possède qu'une seule chaîne.

## 2) Poids moléculaire

La descente de cet antigène dans le culot de centrifugation d'un gradient de saccharose 10 à 20 %, alors que la totalité des autres protéines solubles du contenu cellulaire restent dans le premier tiers du tube après 16 h à 90.000 g, et sa stabilisation dans une fraction avoisinant 25 % de saccharose (qui, à 5°C, possède une densité de 1,108 et une viscosité de 4,03) sur le gradient 15 à 30 %, indiquent une masse importante. Son exclusion de la Sephadex G50 place son poids moléculaire au dessus de 30.000.

Une électrophorèse sur acrylamide à 7.5 % après réduction au mercaptoéthanol, en présence de SDS amène l'AgR au même niveau que le dimère de la sérumalbumine, c'est-à-dire à un poids moléculaire de 146.000. Sans aucun traitement réducteur, l'AgR descend, en gel d'acrylamide, un peu plus bas que le tétramère de l'ovalbumine (P.M. 160.000). Notons toutefois que les glycoprotéines comportant plus de 10 % de sucres fixent moins de SDS que les protéines standards, ce qui peut leur donner un poids moléculaire apparent supérieur à leur poids réel (SEGREST et JACKSON, 1972)<sup>343</sup>.

La réduction de l'AgR par le mercaptoéthanol en présence de SDS à 100°C pendant 2 mn ne semble pas entraîner de dissociation de la molécule, puisqu'après ce traitement on la retrouve à la même distance de migration sur acrylamide, sans apparition de nouvelles fractions plus légères.

Le gel d'acrylamide à 7,5 % possède des pores de 30 Å et permet la migration de molécules protéiniques ayant un poids moléculaire maximum de 300.000.

Ces résultats, joints à l'identification d'un seul acide-aminé-N-terminal, ainsi que l'absence ou la rareté de la cystéine révélée par l'hydrolyse de la molécule, rend très vraisemblable la conclusion que l'AgR comporte une protéine monocaténaire d'un poids moléculaire compris entre 145.000 et 150.000.

### 3) Localisation cellulaire

Un marquage des anticorps spécifiques de l'AgR avec de la ferritine, selon la méthode d'ANDRES et coll. (1967)<sup>14</sup>, a donné une localisation intracellulaire, apparemment sur la face interne de la membrane cytoplasmique (ROOS et JOSEPH, 1970)<sup>326</sup>. Ce marquage, réalisé sur une suspension de parois et de membranes isolées après broyage, ne donne aucune indication sur une éventuelle présence de l'antigène sur des structures cytoplasmiques. Il ne nous a pas été possible de fixer spécifiquement les immunoglobulines sur une coupe de la bactérie entière. Le marquage de la face interne de la membrane cytoplasmique est dû, soit à la liaison spécifique des anticorps sur les déterminants antigéniques des glycoprotéines disposées sous la membrane ou émergeant à la surface interne de celle-ci.

Cet antigène est encore identifiable dans les lysats phagiques et dans les sphéropastes des Mycobactéries, deux cas où les parois sont détruites, seule étant préservée la membrane cytoplasmique.

En conclusion, le fractionnement du contenu cellulaire de Mycobacterium phlei sur gradient de saccharose 15 à 30 %, suivi d'une électrophorèse de la fraction à 25 % de saccharose de ce gradient sur gel de polyacrylamide à 7,5 %, pH 8,3, fournit une fraction protidique d'un poids moléculaire voisin de 150.00. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique dont l'acide aminé-N-terminal est l'histidine.

Elle ne provient pas de la paroi cellulaire, mais semble d'origine cytoplasmique ou membranaire.

L'isolement de cette fraction nous a incité à rechercher si elle ne possède pas certaines des propriétés biologiques de structures mycobactériennes déjà connues ou identifiées. C'est pourquoi, nous avons analysé les divers aspects immunologiques de cette molécule : antigénicité, rapport avec les sensitines (telles que tuberculine et dérivés protéiques purifiés), effet adjuvant sur l'immunité humorale et sur les fonctions des macrophages.

Voyons tout d'abord les propriétés antigéniques de cette fraction.

## II - PROPRIETES DE L'ANTIGENE R

### A) Propriétés antigéniques

#### 1) Communauté mycobactérienne

Un premier sondage (ROOS, 1970)<sup>325</sup> avait indiqué la présence de l'antigène R chez huit souches de Mycobactéries.

Nous avons étendu cette étude à 27 espèces. Sur ces 27 souches, 26 ont révélé la présence de l'antigène R, soit par immunodiffusion en gélose de leur contenu cellulaire contre le sérum unispécifique de l'AgR de M. phlei, soit par immunodiffusion de l'AgR de M. phlei contre les immunosérums spécifiques du contenu cellulaire de ces espèces. Une seule, M. clegg, n'a pas donné d'immunoprécipité indubitable correspondant à l'AgR. Quant à M. thamnopheos, certains toxonomistes la considèrent comme faisant partie des Nocardia. Elle a cependant donné un arc dans les deux conditions d'immunodiffusion signalées ci-dessus.

Nous avons isolé, selon le même protocole que celui de M. phlei 689, des fractions correspondant à l'AgR à partir du contenu cellulaire de M. phlei 356 et 525, de M. smegmatis ATCC 21.732 (§) et BCG Kosloff (Inst. Pasteur Paris).

Ces diverses préparations représentent bien la même molécule puisqu'elles donnent un arc de précipitation en immunodiffusion face à l'immunosérum unispécifique de l'AgR de M. phlei 689.

---

(§) cette souche gracieusement offerte par Monsieur CHEDID est celle à partir de laquelle fut préparé le premier WSA.



Cependant, si la communauté antigénique est absolue entre les trois variétés de M. phlei que nous avons étudiées, ou entre les variétés de BCG, il n'en est pas de même entre les diverses espèces : l'antigène possède une spécificité d'espèce qui fait apparaître un éperon au niveau de la jonction des arcs d'espèces différentes (Planche 3).

Signalons que l'antigène R de M. smegmatis, bien que coloré en jaune, l'est moins que celui de M. phlei, et que celui de BCG n'est pas coloré. Or les bactéries de ces trois espèces sont pigmentées selon la même gradation : M. phlei est très jaune, M. smegmatis plutôt rouge et BCG est blanc. Nous n'avons pu définir si la coloration de l'antigène R est intrinsèque à sa molécule ou consécutive à une fixation non spécifique des pigments cellulaires libérés au moment du broyage.

Nous n'avons pas recherché cet antigène dans le bacille tuberculeux humain. En revanche, un essai d'immunodiffusion en gélose de quatre sérums de malades à tuberculose pulmonaire contre l'AgR de M. phlei n'a fait apparaître aucun arc de précipitation. Il conviendrait d'essayer dans ce cas, soit une technique d'hémagglutination, soit une technique d'hémolyse conditionnée.

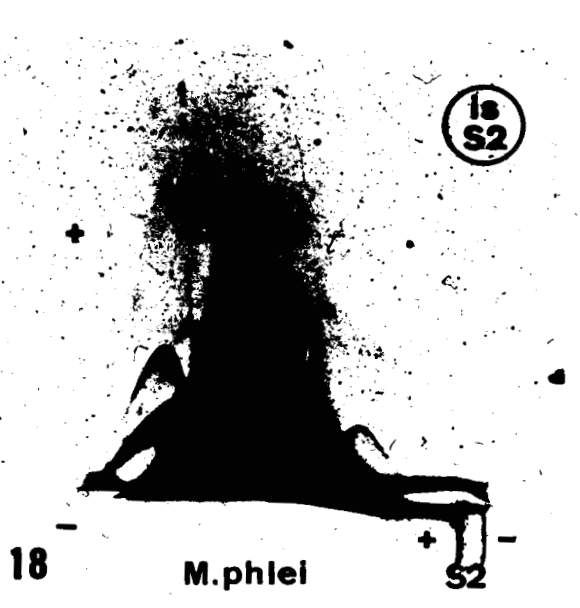
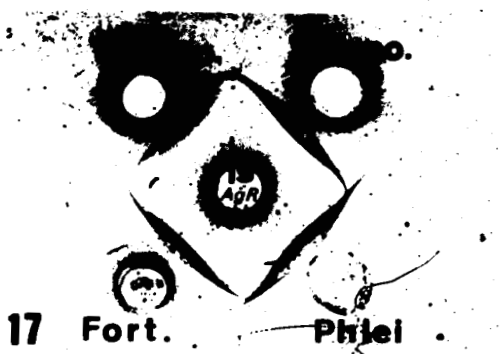
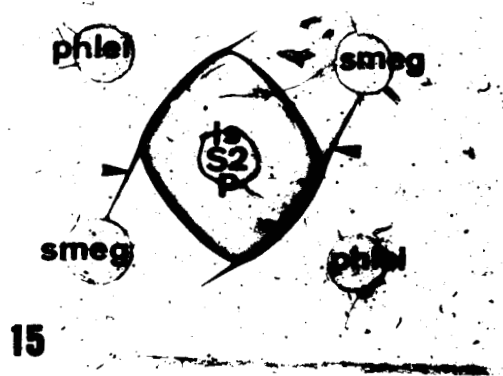
Cet antigène commun à la plupart, sinon à toutes les Mycobactéries, se retrouve-t-il dans d'autres genres bactériens ?

## 2) Spécificité mycobactérienne

La classification de certaines espèces dans le genre Nocardia ou dans le genre Mycobacterium pose au taxonomiste de délicats problèmes, malgré une importante batterie de tests biochimiques, tant ces deux genres bactériens sont proches.

Nous avons recherché la présence de l'AgR dans le contenu cellulaire de 14 souches de Nocardia.

Deux variétés de Nocardia pellegrino (906 et 107) ont donné un arc de précipitation avec l'immunsérum spécifique de l'AgR de M. phlei. Une variété de Nocardia rhodochrous (8139), que d'autres tests semblent classer parmi les Mycobactéries (TACQUET, 1971)<sup>376</sup> s'est également révélée positive en ce qui concerne l'antigène mycobactérien. Les 11 autres espèces ne contiennent par l'AgR. L'épuisement du sérum unispécifique de l'AgR par les broyats de ces espèces ne supprime pas le précipité obtenu en immunodiffusion entre l'antigène mycobactérien et ses anticorps spécifiques.



Cette étude serait utilement complétée en introduisant la recherche systématique de l'AgR parmi les différents tests réalisés dans le cadre d'un typage bactérien à but taxonomique (qui n'était pas le nôtre). Ceci permettrait de vérifier la validité d'une telle détermination pour l'identification des mycobactéries.

La mise en oeuvre de ce test ne nécessite que la récolte d'une culture sur un seul tube de milieu de Löwenstein-Jensen, le broyage en 60 secondes des germes dans un Potter en présence de zéolithe, l'addition d'un à deux ml de tampon Tris-Magnésium, une centrifugation, et l'immunodiffusion, ou encore mieux l'électrophorèse, du surnageant face à l'immunsérum spécifique de l'antigène.

\*

Les protéines bactériennes sont souvent le support d'une activité de révélation de l'hypersensibilité retardée aux germes dont elles proviennent. Nous allons voir maintenant si ce n'est pas le cas pour l'AgR mycobactérien.

## B) Propriétés biologiques

### 1) Hypersensibilité retardée

#### a) Révélation (tests cutanés)

Nous avons voulu déterminer si l'AgR est capable de révéler une hypersensibilité retardée de type tuberculinique chez des animaux immunisés un mois auparavant avec des Mycobactéries.

α) Des cobayes Hartley sont vaccinés avec 2,6 mg de M. phlei vivant dans 0,25 ml d'une émulsion d'eau physiologique dans de l'adjuvant incomplet de Freund DIFCO (volume à volume) inoculés en intramusculaire dans les cuisses. Au bout de 33 jours, les tests intradermiques sont réalisés avec 0,1 ml de diverses solutions de tuberculine et d'AgR et lus 48 heures plus tard. Les résultats sont présentés dans le tableau 21 :

4 cobayes <u>M. phlei</u>	Tuberculine 1/10 (1000 U.I ou 200 µg)	Tuber- culine 20 µg	AgR phlei 20 µg	Eau physio.
Intensité de la réaction cutanée	++	0	+++	0
Diamètre induration	4 mm $\pm$ 0,5	0	7 mm $\pm$ 1	0

Tableau 21 : Révélation de l'HSR tuberculinique par diverses solutions mycobactériennes chez des cobayes immunisés 33 jours auparavant par M. phlei vivant en intramusculaire.

On voit qu'avec 20 µg d'AgR la réaction intradermique est plus forte qu'avec la dilution de tuberculine habituellement utilisée (100 unités internationales, soit 200 µg de protéine en dosage de LOWRY) qui contient dix fois plus de protéines. Chez ces animaux, la tuberculine à 20 µg par dose injectée ne donne pas de réaction.

( $\beta$ ) Des cobayes ont été vaccinés dans les mêmes conditions par 2,6 mg de BCG-S (Pasteur). Trente trois jours plus tard ils reçoivent en intradermique 0,1 ml de diverses solutions d'antigènes mycobactériens (Tableau 22).

6 cobayes BCG	Tuberculine 1/10=100 µg	Tuberculine 20 µg	AgR-Phlei 20 µg	AgR-BCG 20 µg	Eau physiol.
Intensité de la réaction cutanée	+++	++	++	+++	0
Diamètre de l'induration	9 mm $\pm$ 1	4 mm $\pm$ 0,5	4 mm $\pm$ 0,5	4 mm $\pm$ 1	0

Tableau 22 : Révélation de l'HSR tuberculinique par diverses solutions mycobactériennes chez des cobayes immunisés 33 jours auparavant par du BCG vivant en intramusculaire.

Dans ce cas, les réactions d'HSR sont d'intensités semblables avec 20 µg d'AgR de BCG et 200 µg de tuberculine brute, et avec 20 µg d'AgR de M. phlei et 20 µg de tuberculine.

Il apparaît donc que l'AgR mycobactérien est une sensitine assez spécifique d'espèce, c'est-à-dire plus active chez les animaux sensibilisés vis-à-vis du germe dont elle provient, que chez les animaux immunisés avec d'autres espèces.

#### b) Induction

L'antigène R est-il capable d'induire l'apparition d'une hypersensibilité à la tuberculine ?

α) Des cobayes ont reçu en intramusculaire 260 µg d'AgR de M. smegmatis dans 2 ml d'une émulsion volume à volume d'eau physiologique et d'adjuvant incomplet de Freund (A.I.F.). Des témoins ont reçu le même volume de l'émulsion seule sans AgR.

Trente six jours plus tard, tous les animaux reçoivent une injection intradermique de 0,1 ml de tuberculine brute au 1/10 et 0,1 ml

d'AgR (2 µg). Quarante huit heures plus tard, les points d'injection ne présentent aucune induration avec la tuberculine et une très légère coloration indurée de 2 à 3 mm avec l'AgR.

(β) Un lapin a été hyperimmunisé par des injections d'AgR de M. smegmatis pendant deux mois, à raison d'une inoculation hebdomadaire, pour obtenir un sérum unispécifique de la molécule.

A la fin de cette période, l'injection intradermique de 20 µg d'AgR de M. smegmatis en eau physiologique ne donne pas de réaction. Une injection de 200 µg donne une légère induration de 2 à 3 mm.

L'antigène mycobactérien ne déclenche donc pas d'hypersensibilité retardée vis-à-vis de lui-même, ni vis-à-vis de la tuberculine. Est-il cependant capable d'en déclencher une vis-à-vis d'une protéine injectée en même temps que lui ?

Des cobayes immunisés avec de l'ovalbumine (5 mg) et divers adjuvants développent en 30 jours une hypersensibilité retardée vis-à-vis de l'ovalbumine que ce soit avec l'adjuvant complet ou incomplet de Freund. En revanche, l'addition de 200 µg d'AgR à l'adjuvant incomplet de Freund n'ajoute rien à l'effet de l'AIF seul (tableau 23).

BUS  
LILLE

	Ovalbumine		Tuberculine	AgR
	10 µg	100 µg	1/10	Smegmatis 2 µg
Adjuvant COMPLET ( <u>M. butyricum</u> )	4 : 12	7 : 19	3 : 9	1 : 6
Adjuvant INCOMPLET	2 : 6	5 : 9	0 : 4	0 : 3
AIF + AgR 200 µg	2 : 5	4 : 7	0 : 2	1 : 3

Tableau 23 : Développement de l'HSR chez des cobayes Hartley immunisés avec 5 mg d'ovalbumine MILES et trois adjuvants différents dans les coussinets plantaires. L'HSR est évaluée 30 jours plus tard par injection intradermique de deux quantités différentes d'ovalbumine en solution dans l'eau physiologique, avec de la tuberculine brute au 1/10 et 2 µg d'AgR de M. smegmatis. Le 1er chiffre donne le diamètre en mm de la nécrose et le 2ème celui de l'érythème cutané observés après 48 heures (moyenne de 5 cobayes).

Si la présence de l'AgR dans l'AIF n'augmente pas l'HSR vis-à-vis de l'ovalbumine, il est intéressant de remarquer que l'AIF seul, comme support de l'ovalbumine, est capable d'induire un état d'hypersensibilité à la protéine.

c) Révélation de l'HSR par inhibition de migration des macrophages

α) Hypersensibilité tuberculinique :

Le caractère de sensitine présenté par l'antigène R nous a conduit à utiliser la migration des macrophages pour mettre en évidence un état d'hypersensibilité retardée à la tuberculine par un test in vitro ou éventuellement une action directe de l'antigène sur les macrophages.

Si le rôle des macrophages alvéolaires dans les mécanismes immunitaires reste problématique, leur sensibilité au facteur inhibiteur de la migration (MIF), produit par les lymphocytes immunocompétents en présence de l'antigène sensibilisant, a été observée par de nombreux auteurs (GALINDO et MIRVIK, 1970<sup>143</sup>; POLLOCK et coll., 1971<sup>312</sup>; JOHNSON et coll., 1975)<sup>90bis</sup>.

Nous avons donc utilisé les cellules de lavages alvéolaires des poumons du cobaye, selon la technique de MYRVIK et coll. (1971)<sup>277</sup> (cf. pages techniques 195). Les macrophages obtenus chez les animaux vaccinés par trois agents mycobactériens différents : BCG, M. smegmatis et M. phlei ont été mis en migration en présence de diverses concentrations de l'AgR correspondant à la Mycobactérie sensibilisante. Les inhibitions exprimées en pour cent de la migration obtenue en absence d'AgR (milieu BEM) sont rapportées sur le tableau 24 :

	AgR 20 µg/ml	AgR 2 µg/ml	AgR 0,2 µg/ml
Cobayes normaux	25 % ( $\pm$ 2)	11 % ( $\pm$ 2)	0 %
Cobayes BCG	44 % ( $\pm$ 3)	25 % ( $\pm$ 4)	0 %
Cobayes smegmatis	61 % ( $\pm$ 3)	44 % ( $\pm$ 5)	14 %
Cobayes phlei	37 % ( $\pm$ 4)	16 % ( $\pm$ 1)	2 %

Tableau 24 : Pourcentage d'inhibition des macrophages alvéolaires de cobayes sensibilisés par des Mycobactéries, en présence des lymphocytes et de l'AgR (moyenne de 5 animaux et 4 surfaces de migration par animal et par test, soit 20 surfaces de migration/test  $\pm$  E.T.).

L'inhibition de la migration des macrophages en présence de l'AgR est significativement plus élevée chez les animaux immunisés avec les Mycobactéries que chez les animaux témoins. Par ailleurs, l'existence d'une légère inhibition des macrophages de cobayes non immunisés en présence de 20 µg/ml d'AgR serait le signe d'une action directe de l'AgR sur les macrophages.

L'observation d'une culture pure de macrophages alvéolaires en microcinématographie nous a montré qu'en présence de 20 µg d'AgR, les macrophages s'étalent fortement sur leur support et émettent des prolongements cytoplasmiques filiformes à des distances correspondant à plusieurs diamètres cellulaires.

### β) Hypersensibilité à la sérumalbumine bovine

Dans la partie de ce travail consacrée à l'effet adjuvant humoral de l'AgR vis-à-vis de la sérumalbumine bovine, nous avons testé parallèlement le développement de l'hypersensibilité retardée à cette protéine chez des souris C57 Black mâles, par l'utilisation d'un test d'inhibition de migration des macrophages. Dans ce cas, nous nous sommes orientés vers un test mixte dans lequel les lymphocytes ganglionnaires immunocompétents des souris sont cultivés pendant deux jours en présence et en absence de la protéine spécifique, pour une éventuelle production de MIF, les surnageants acellulaires étant ensuite utilisés pour la migration de macrophages péritonéaux de cobayes normaux (cf. pages techniques 196). Les résultats sont rapportés dans le tableau 25, pour l'hypersensibilité à 21 jours en réponse primaire, et à 35 jours en réponse secondaire après une injection de rappel le 21<sup>ème</sup> jour.



	21 jours	35 jours
Adjuvant complet de Freund	0,93	0,74
Adjuvant incomplet de Freund	0,89	0,82
AgR smegmatis (50 µg)	0,93	0,92

Tableau 25 : Sensibilisation des souris C57 Black/6 à la sérum-albumine bovine en réponse primaire (21 jours) et en réponse secondaire (35 jours). Mesure par l'inhibition de la migration des macrophages dans les surnageants de culture des lymphocytes immunocompétents mis en présence de 40 µg/ml de sérum-albumine bovine pendant 48 heures.

Au 21<sup>ème</sup> jour, les souris sont peu sensibilisées à la sérum-albumine bovine, quelque soit l'adjuvant utilisé. L'injection de rappel, qui a lieu le 21<sup>ème</sup> jour, développe une bonne sensibilisation des souris ayant reçu la protéine en émulsion avec de l'adjuvant complet de Freund et une légère sensibilisation des animaux vaccinés avec l'adjuvant incomplet.

L'addition d'AgR à l'AIF, en revanche, semble diminuer l'effet de l'adjuvant incomplet seul, comme cela est observable en réaction cutanée chez le cobaye vis-à-vis de l'ovalbumine dans l'expérience rapportée dans le paragraphe précédent.

#### Conclusion :

L'AgR est donc capable de révéler l'existence d'une hypersensibilité retardée de type tuberculinique, plus spécifiquement chez les animaux immunisés avec la souche d'où provient l'antigène utilisé. On peut se demander si l'AgR n'est pas un constituant de la tuberculine. Or, par immunodiffusion en gélose, que ce soit contre l'immunsérum du contenu cellulaire bactérien, ou contre l'immunsérum spécifique de l'AgR, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de communautés antigéniques entre cet antigène et les protéines contenues dans la tuberculine brute ou le PPD.

De plus, nous n'avons pas mis en évidence l'AgR dans le filtrat des cultures des bactéries ayant servi à la production de l'antigène, alors que la tuberculine et PPD sont isolés de ces filtrats.

Il semble donc bien que l'AgR soit une molécule différente des sensitines tuberculiniques jusqu'ici identifiées.

Enfin, cette fraction mycobactérienne ne déclenche pas elle-même, d'hypersensibilité retardée à la tuberculine ou à sa propre molécule. Elle ne semble pas non plus en déclencher une vis-à-vis des protéines injectées avec elle dans un organisme, tout au moins dans le support huileux que constitue l'adjuvant incomplet de Freund.

Les bactéries entières et certaines molécules qui en sont issues ont souvent des effets physiologiques importants sur les animaux à qui elles sont injectées : formation de granulomes, hyperplasie de certains organes (foie, rate, poumons, ganglions). Nous avons donc étudié quelques-uns de ces paramètres physiologiques après injection de l'AgR.

## 2) Effets physiologiques

### a) Poids des animaux

Les animaux immunisés avec de l'ovalbumine et l'antigène R de *M. smegmatis* ont pris moins de poids en 30 jours que ceux ayant reçu la protéine dans de l'adjuvant complet ou incomplet de Freund (Tableau 26).

	Différence de poids en g entre J0 et J30		$\Delta$ %
A.I.F.	+ 91 ( $\pm$ 8)		+ 27,75 %
A.C.F.	+ 85 ( $\pm$ 25)	: N.S.	+ 25,75 %
AgR SMEG en AIF	+ 47 ( $\pm$ 24)	{ t=2,9547 p<0,05	+ 13,70 %

Poids moyen au jour zéro : 333 g ( $\pm$  20 g)

Tableau 26 : Prise de poids des cobayes Hartley immunisés avec de l'ovalbumine et trois adjuvants différents dans les coussinets plantaires postérieurs (moyenne de 10 animaux par adjuvant). La différence entre AgR et A.I.F. est significative au risque de 5 %.

b) Granulome

L'antigène R, dans la même expérience que ci-dessus, ne déclenche pas dans les pattes, de granulome beaucoup plus important que n'en donne l'adjuvant incomplet (Tableau 27) :

	Différence de poids en g entre J0 et J30	Poids corps Poids pattes
A.I.F.	1,99 ( $\pm$ 0,05)	210
A.C.F.	2,91 ( $\pm$ 0,12)	143
AgR SMEG en AIF	2,06 ( $\pm$ 0,09)	190

$\left. \begin{array}{l} \{ t=25,80 \\ p < 0,001 \end{array} \right\}$   
 $\left. \begin{array}{l} \{ t=2,7841 \\ p < 0,02 \end{array} \right\}$

Tableau 27 : Effet de l'AgR sur les pattes ayant servi de site d'injection de l'ovalbumine, 30 jours après l'immunisation des cobayes.

Les différences entre les trois groupes sont significatives.

Le poids des pattes ramené au poids des animaux donne un indice très voisin pour l'adjuvant incomplet et l'AgR. L'adjuvant complet induit une augmentation de 50 % du poids des pattes par rapport aux deux autres stimulants.

c) Volumes du foie, de la rate et des poumons

Dans cette expérience d'immunisation par l'ovalbumine, nous avons mesuré le poids du foie, de la rate et des poumons des animaux, le 30ème jour après la vaccination. Le poids de ces organes est ramené au poids du corps dans le rapport poids du corps sur poids de l'organe (Tableau 28) :

	Poids du corps (en g)	Poids du Foie + de la rate (g)	Poids du corps Poids foie et rate	Poids Poumons (en g)	Poids corps Poumons
A.I.F.	419 $\pm$ 12	16,97	24,69	3,7 $\pm$ 0,2	112
A.C.F.	415 $\pm$ 21	19,41	21,38	4,2 $\pm$ 0,3	98
AgR SMEG en AIF	391 $\pm$ 29	15,33	25,50	4,4 $\pm$ 0,5	89

Tableau 28 : Effet de l'AgR sur le foie, la rate et les poumons du cobaye vacciné dans les coussinets plantaires postérieurs (moyenne de 10 animaux).

Les volumes du foie et de la rate sont très semblables chez les animaux recevant l'adjuvant incomplet ou l'AgR de M. smegmatis. En revanche, l'ACF développe une hépato et une splénomégalie.

Au niveau des poumons, l'AgR semble déclencher une réaction légèrement plus marquée que l'ACF.

Enfin, la propriété biologique qui pouvait, à priori, présenter le maximum d'intérêt, était la possibilité de stimuler l'immunité humorale.

### 3) Effet adjuvant

#### a) Effet adjuvant sur les anticorps spécifiques de l'ovalbumine

L'antigène R a été utilisé chez le cobaye Hartley en association avec de l'ovalbumine en adjuvant incomplet de Freund pour examiner un éventuel effet adjuvant sur la synthèse des anticorps.

Dix cobayes Hartley mâles ont reçu dans les deux coussinets plantaires postérieurs 0,1 ml d'une émulsion volume à volume de Freund incomplet DIFCO et d'une quantité fixe d'ovalbumine (2,5 mg) en solution aqueuse physiologique, complétée par des quantités variables d'antigène R de M. smegmatis : 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g et 200  $\mu$ g.

Dix cobayes ont reçu 0,1 ml d'une émulsion d'adjuvant complet de Freund et d'une solution d'ovalbumine (2,5 mg par animal).

Dix cobayes ont reçu 0,1 ml d'une émulsion d'adjuvant incomplet de Freund et d'une solution d'ovalbumine (2,5 mg par animal).

Après 21 jours, les animaux sont saignés et le taux sérique en immunoglobulines spécifiques de l'ovalbumine, évalué par hémagglutination d'hématies de moutons sensibilisées avec de l'ovalbumine (Tableau 29) (cf. pages techniques 189) et mises en évidence en immunodiffusion en gélose.

	Inverse de la dilution maximum hémagglutinante ( $\pm$ E.T.M.)
A.C.F.	3698 ( $\pm$ 525)
A.I.F.	640 ( $\pm$ 171)
AgR 200 $\mu$ g	3214 ( $\pm$ 502)
AgR 10 $\mu$ g	1088 ( $\pm$ 367)
AgR 1 $\mu$ g	1296 ( $\pm$ 476)

Tableau 29 : Effet adjuvant anti-ovalbumine de diverses quantités d'AgR injectées, avec la protéine, dans les pattes arrières de cobayes, 21 jours auparavant.

Dans ces conditions, l'AgR, injecté à raison de 200  $\mu$ g par cobaye, révèle une activité adjuvante équivalente à l'adjuvant complet de Freund.

A dix et même un  $\mu$ g par animal, il reste largement supérieur à l'adjuvant incomplet de Freund.

b) Effet adjuvant sur les anticorps anti-sérumalbumine chez la souris

Des souris C57 black 6 mâles de 5 à 6 semaines reçoivent 0,2 ml, répartis dans les quatre coussinets plantaires, d'un mélange contenant 300 µg de sérumalbumine bovine (ARMOUR PHARMACEUTICAL Co. Chicago) en eau physiologique, représentant un tiers du volume, émulsionnés dans de l'adjuvant incomplet de Freund additionné de substance adjuvante à tester, représentant les deux autres tiers.

Au 21ème jour, la moitié des souris sont saignées pour évaluer le taux d'anticorps anti-sérumalbumine, et sacrifiées pour les tests cellulaires évoqués précédemment. La seconde moitié est revaccinée avec une demi-dose de sérumalbumine et d'adjuvant, soit 0,1 ml réparti entre les deux coussinets plantaires postérieurs.

Au 35ème jour, ces souris sont saignées et sacrifiées pour la réponse humorale et cellulaire secondaires.

Les immunoglobulines antisérumalbumine sont dosées par hémagglutination de globules rouges de mouton sensibilisées avec cette protéine (cf. pages techniques 190).

Les adjuvants utilisés ont été : l'AgR de M. smegmatis à 50 et à 10 µg par souris, WSA à 50 et 10 µg et comme références : l'ACF et l'AIF (Tableau 30).

	21 jours		35 jours	
	Moyenne géométrique	Moyenne arithmétique	Moyenne géométrique	Moyenne arithmétique
AgR <i>M. smegmatis</i> 50 µg	105 66 ↔ 169	206 ± 78	479 326 ↔ 705	625 ± 82
AgR <i>M. smegmatis</i> 10 µg	60 37 ↔ 92	70 ± 13	645 400 ↔ 1050	1493 ± 433
WSA 50 µg	51 34 ↔ 75	75 ± 14	211 134 ↔ 333	311 ± 70
WSA 10 µg	45 21 ↔ 199	74 ± 24	630 254 ↔ 1561	1165 ± 280
A.C.F.	36 26 ↔ 49	62 ± 10	498 282 ↔ 880	1073 ± 240
A.I.F.	27 18 ↔ 40	56 ± 10	306 202 ↔ 463	490 ± 80

= Inverse des dilutions maxima hémagglutinantes

Tableau 30 : Effet adjuvant de divers immunostimulants sur la réponse humorale primaire (21 jours) et secondaire (35 jours) à la sérum-albumine bovine chez la souris C57 Black 6 mâle.

Les doubles chiffres, sous la moyenne géométrique, sont les limites du domaine de confiance de 95 % ; le chiffre sous la moyenne arithmétique représente l'écart-type de la moyenne ; les chiffres à cheval sur les colonnes représentent le nombre de souris dans chaque cas.



En réponse primaire, tous les adjuvants stimulent identiquement les animaux, à l'exception de l'AgR de M. smegmatis à 50 µg par souris qui donne 2 à 3 fois plus d'immunoglobulines que les autres substances ou concentrations. En réponse secondaire, l'AgR à 10 µg prend l'avantage et dépasse l'adjuvant complet de Freund.

Il apparaît ainsi que la propriété biologique majeure de l'AgR mycobactérien est d'être un adjuvant de l'immunité humorale.

Sa nature chimique la distingue nettement des structures isolées jusqu'ici des Mycobactéries et présentant une telle propriété. Les adjuvants humoraux mycobactériens sont généralement extraits de structures pariétales glycopeptidiques.

Nous sommes ici en présence d'une protéine de grosse taille, contre laquelle les animaux vaccinés par le contenu bactérien total synthétisent rapidement et en plus grande quantité des précipitines mises en évidence par immunodiffusion en gélose. A l'inverse du WSA, cette molécule est, elle, très immunogène et pourrait être adjuvante par cette qualité même.

En raison de sa nature immunostimulante, nous l'avons employée lors des tests de potentialisation des IgE dans la schistosomiase expérimentale du rat, comme nous l'exposerons au cours du chapitre V.

En revanche, cette molécule ne semble pas très active sur les phénomènes liés à l'immunité cellulaire, tels qu'hypersensibilité retardée ou induction de granulomes.

Il reste cependant possible que l'AgR ait un effet sur les macrophages. C'est pourquoi nous l'avons utilisé également dans les essais de stimulation et d'activation de ces cellules, résultats que nous allons aborder maintenant.

### III - ACTIVATION DES MACROPHAGES

Le fonctionnement intime de la membrane macrophagique reste encore mal connu. Si l'on commence à entrevoir quelques-uns des stimuli



qui activent la cellule, l'on demeure dans une large ignorance des mécanismes par lesquels certaines molécules étrangères au macrophage peuvent rester en surface sans être pinocytées ou phagocytées et exercer depuis ce point leur action activatrice (inhibition des fibrilles contractiles sous membranaires ? interférence avec les glycoprotéines ou les phospholipides de membranes ?). D'autres substances, au contraire, exercent leur effet activateur une fois pénétrées dans les cellules (le cord-factor au niveau des mitochondries ; le LPS au niveau de la membrane lysosomiale).

Le résultat habituel de l'action de ces agents est une modification des activités enzymatiques et du contenu protéique global des cellules. C'est pourquoi nous avons choisi comme critère d'activation des macrophages le dosage des protéines solubles totales, celui de quelques enzymes lysosomiales, telles que bêta-glucuronidase, bêta-galactosidase ou cathépsine C, et le dosage d'une enzyme cytoplasmique, la leucine-bêta-naphtylamidase. Cette dernière renseigne sur l'état des cellules et permet de vérifier si un éventuel relargage d'enzymes lysosomiales dans le milieu de culture est un phénomène actif, une exocytose, n'entraînant aucune lyse cellulaire, ou un phénomène passif, uniquement dû à la mort des macrophages.

La stimulation des macrophages par les diverses substances utilisées, a été réalisée de deux manières : d'une part, in vitro, sur des cultures de macrophages péritonéaux débarrassés de toutes les cellules non adhérentes (lymphocytes, mastocytes, polynucléaires) et, d'autre part, in vivo, par injection des produits dans la cavité péritonéale, en général 7 jours avant la récolte des exudats péritonéaux. Dans ce dernier cas, le dosage des enzymes cellulaires a été effectué après une culture in vitro de 5 à 6 heures destinée à éliminer les cellules non adhérentes et ne doser que les macrophages.

#### A) Activation in vitro

##### 1) Substances utilisées

Nous avons utilisé les substances suivantes :

- AgR (de M. smegmatis)

- WSA (de M. smegmatis)
- Muramyl-dipeptide
- IPM (de M. smegmatis)
- Lipoprotéine d'Echinococcus granulosus
- LPS de Salmonella typhi

Toutes sont solubles en milieu aqueux, l'I.P.M., de constitution microparticulaire, nécessitant toutefois un traitement d'une dizaine de minutes aux ultrasons pour obtenir une suspension homogène opalescente. Les solutions-mères, réalisées en eau physiologique, sont diluées, aux concentrations choisies, dans le milieu de culture utilisé systématiquement dans toutes nos expérimentations :

- milieu de Eagle (Minimum essential medium : MEM) complété par 100 U.I./ml de pénicilline et 50 µg/ml de Streptomycine, et contenant 10 % de sérum d'embryon de bovin décomplémenté

Ce milieu, ainsi enrichi, est ci-après désigné comme le milieu MEM +.

Pour l'ensemble des produits testés dans l'activation in vitro des macrophages, nous avons adopté trois concentrations : 1,2 µg/ml, 12 µg/ml et 120 µg/ml, le milieu MEM + servant de témoin.

## 2) Cultures cellulaires

Les macrophages péritonéaux de rats consanguins HOODED LISTER sont récupérés par lavage péritonéal avec 20 ml de MEM hépariné. Les cellules de plusieurs rats, lavées et poolées (10 à 12 millions de macrophages par rat en moyenne), sont déposées en boîtes de Petri FALCON pour culture cellulaire de 5 cm de diamètre, à raison de 2,5 à 3 millions de macrophages par boîte.

- Toutes les cultures ont lieu à 37°C en atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>

Une préculture de 2 à 3 heures permet l'adhérence de 95 à 100 % des macropahges.

La couche cellulaire est alors lavée trois fois par agitation circulaire énergique des boites avec 2 à 3 ml de MEM + tempéré, pour éliminer les cellules non adhérentes.

Deuxmillilitres cinq de milieu contenant les substances à tester sont déposés dans les boites (soit 3 µg, 30 µg ou 300 µg/boite de chaque substance selon la concentration), sans omettre les boites témoins de MEM +. On prépare 3 boites pour chaque concentration.

Les cellules sont cultivées ainsi pendant 16 heures.

Les milieux sont ensuite récupérés, centrifugés à 2000 t/min., pour séparer les macrophages détachés. Les surnageants sont aussitôt placés dans la glace. De leur côté, les boites sont lavées trois fois avec du PBS froid (tampon phosphate physiologique), les cellules lysées dans 1 ml de Triton X 100 à 0,1 % en tampon Tris  $10^{-2}$ ,  $MgCl_2$ ,  $10^{-2} M$  à pH 7,2. Chaque lysat est remis avec le culot de la centrifugation des milieux correspondants.

L'on est ainsi en possession de 1 ml de lysat cellulaire et de 2,5 ml de milieu contenant d'éventuelles enzymes relarguées, par boite de culture. Le Triton assure la solubilisation de la membrane lysosomiale et libère ainsi toutes les hydrolases macrophagiques.

### 3) Dosages

Les dosages suivants sont réalisés, à la fois sur le milieu et sur les cellules :

- protéines (dosage de Lowry, cf. pages techniques 199) ;
- leucine- $\beta$ -naphthylamidase (enzyme non lysosomiale qui n'est pas exocytée lorsque les macrophages sont dans des conditions physiologiques normales ; cf. pages techniques 205) ;
- bêta-glucuronidase (enzyme lysosomiale ; cf. pages techniques 200).

Parfois, d'autres enzymes ont été dosées, mais pas systématiquement : bêta-galactosidase, cathépsine C, LDH, phosphatases acides (cf. pages techniques 201).

Pour les tests de relargage dans le milieu, nous avons retenu la bêta-glucuronidase, car la bêta-glucuronidase du sérum d'embryon de bovin présent dans les milieux est détruite par le chauffage à 56°C pendant 30 min. de la décomplémentation, ce qui n'est pas le cas de la cathépsine C ou de la leucine-naphtylamidase qui donnent un bruit de fond assez élevé.

#### 4) Résultats

Le tableau 31 résume l'ensemble des résultats obtenus pour chaque "stimulant". Ce sont les moyennes de 2, parfois 3, expériences à raison de 3 boîtes par concentration.

Entre les diverses séries existe une légère variation des taux relevés dans les cellules non stimulées (première ligne de chaque série). Ces différences sont imputables à l'état des animaux au moment de la récolte. En effet, les rats, bien que consanguins, n'ont pas été utilisés toujours au même âge ni dans un délai identique après leur arrivée dans l'animalerie.

Le taux protéique exprime, dans une certaine mesure, l'activation cellulaire. Lorsque certaines hydrolases sont exocytées, le taux protéique cellulaire n'augmente que faiblement, et peut même baisser, alors que des protéines sont activement synthétisées par les cellules. Les résultats sont donnés en  $\mu\text{g}$  de protéines par million de macrophages.

La leucine-naphtylamidase renseigne sur la qualité des cellules en fin de culture. C'est une enzyme cytoplasmique qui n'est pas libérée dans le milieu lorsque les hydrolases le sont par le mécanisme normal d'une exocytose active. Le taux de leucine-naphtylamidase peut augmenter lorsque la cellule est fortement stimulée. Lorsqu'il diminue, c'est généralement le signe d'une souffrance cellulaire ayant entraîné une lyse, responsable d'un relargage passif de l'ensemble des enzymes macrophagiques. Les taux rapportés ici sont des nanomoles de substrat hydrolysé par heure et par million de cellules.

(	(Protéi- : Leu-naphtyl :)				Béta-glucuronidase					
	nes	Cell.	Mil.	Cell.	$\Delta$	Milieu	Act tot:	$\Delta$	% ds mil)	
(	<u>AgR de M. smegmatis</u>									
(	0	49,3	5,7	0	19,7	-	0	19,7	-	0
(	1,2	54,0	5,9	0	18,9	- 4,1 %	1,4	20,3	+ 3 %	7 %
(	12	60,0	5,5	0	21,5	+ 9,5 %	3,1	24,6	+ 25 %	12,5 %
(	120	46,2	3,3	2	12,6	- 36 %	10,1	22,7	+ 16 %	44,5 %
(	<u>Muramyl-dipeptide</u>									
(	0	50,2	3,2	0	18,6	-	0	18,6	-	0
(	1,2	50,2	3,7	0	20,0	+ 7,5 %	0	20,0	+ 7,5 %	0
(	12	50,6	4,5	0	21,7	+ 16,6 %	0	21,7	+ 16,6 %	0
(	120	67,0	4,45	0	25,0	+ 34,3 %	0	25,0	+ 34,4 %	0
(	<u>WSA</u>									
(	0	41,5	3,1	0	18,5	-	0	18,5	-	0
(	1,2	45,6	3,1	0	15,9	- 14 %	2,6	18,5	0	14 %
(	12	47,2	3,4	0	14,6	- 22 %	3,4	18,1	- 2 %	18,8 %
(	120	43,2	3,6	0	20,1	+ 8,7 %	5,8	25,8	+ 39,5 %	22,5 %
(	<u>IPM</u>									
(	0	56,6	2,6	0	20,8	-	0	20,8	-	0
(	1,2	52,7	3,1	0	20,0	- 3,8 %	2,4	22,4	+ 7,7 %	10,7 %
(	12	52,8	3,9	0	18,9	- 9,1 %	4,2	23,1	+ 11 %	18,1 %
(	120	51,9	3,1	0,3	8,2	- 61 %	14,4	22,6	+ 8,7 %	64 %
(	<u>Lipoprotéine</u>									
(	0	64,7	3,4	0	12,0	-	0	22,0	-	0
(	1,2	67,0	3,9	0	25,1	+ 14 %	0	25,1	+ 14 %	0
(	12	69,0	3,8	0	27,7	+ 26 %	0	27,7	+ 26 %	0
(	120	76,0	4,2	0	29,1	+ 32 %	5,9	35,0	+ 59 %	16,8 %
(	<u>LPS</u>									
(	0	54,0	2,6	0	18,4	-	0	18,4	-	0
(	1,2	54,0	2,5	0	16,0	- 13 %	1,5	17,5	- 4,9 %	8,6 %
(	12	51,0	2,2	0,3	14,9	- 19 %	1,5	16,4	- 11 %	9,1 %
(	120	49,0	1,6	0,5	11,0	- 40 %	2,1	13,1	- 29 %	16 %

Tableau 31 : Les doses d'agents immunostimulants sont données en  $\mu\text{g/ml}$  de milieu.



Effets in vitro de divers immunostimulants sur les macrophages de rat.

Les protéines sont données en  $\mu\text{g}/10^6$  cellules.

La leucine-naphtylamidase et la  $\beta$ -glucuronidase sont données en nanomoles de substrat hydrolysé par heure et par  $10^6$  cellules.

La synthèse de la béta-glucuronidase est généralement fortement stimulée par les agents activateurs, ainsi que l'indique l'activité totale correspondant à la somme des activités intra et extra-cellulaires. Une exocytose active est objectivée par le taux de leucine-naphtylamidase cellulaire qui reste constant ou est augmenté, avec un taux extracellulaire faible ou nul, lorsque la glucuronidase se retrouve en forte proportion dans le milieu.

a) Le muramyl-dipeptide, glycopeptide minimum porteur d'une activité adjuvante humorale, présente un cas simple : la stimulation de l'ensemble des paramètres intracellulaires mesurés. On note un léger accroissement des protéines (+ 34 %) à la concentration la plus élevée du produit, un accroissement régulier de la leucinamidase (jusqu'à 39 %) et de la béta-glucuronidase (jusqu'à 34 %), mais pas de relargage extracellulaire de ces molécules macrophagiques.

b) La lipoprotéine de kyste hydatique, antigène ubiquitaire extrait du liquide hydatique d'Echinococcus granulosus (BOUT et coll., 1974)<sup>43</sup> présente une action très semblable au muramyl-dipeptide, avec cependant une légère exocytose d'hydrolases lorsqu'elle est à la concentration de 120 µg/ml : 17 % de la glucuronidase se retrouve dans le milieu où l'on ne met pas en évidence de leucine-naphtylamidase cellulaire.

c) Le lipopolysaccharide (LPS) d'Enterobactéries, en revanche, se révèle toxique pour les macrophages, légèrement à 1,2 µg/ml, mais beaucoup plus nettement à 12 et 120 µg/ml, avec une chute de près de 40 % de la leucine-naphtylamidase cellulaire et de près de 30 % de l'activité totale de la glucuronidase, alors que la glucuronidase libre dans le milieu ne représente que 16 %. Ce "trou" dans les proportions de glucuronidase provient du fonctionnement défectueux des cellules en présence du LPS dès le temps zéro de la culture, alors que les cellules témoins, en MEM +, ont synthétisé de la glucuronidase pendant les 16 heures de culture.

d) Le WSA est stimulant pour les macrophages et entraîne une exocytose de glucuronidase dont on retrouve 22,5 % de l'activité totale dans le milieu à 120 µg/ml. Cependant à 1,2 et 12 µg/ml, le WSA semble entraîner une exocytose d'hydrolases sans accroissement de leur activité globale.

e) L'AgR de M. smegmatis provoque, à 12 µg/ml, une augmentation de 25 % de la bêta-glucuronidase, mais seulement de 16% à 120 µg/ml. A cette dernière concentration, 45 % de la glucuronidase passe dans le milieu de culture, le contenu cellulaire diminuant de 36 % par rapport à la concentration dans les cellules-témoins. Comme le taux intracellulaire de leucine-naphtylamidase tombe de 42 % et celui des protéines de 6 %, on doit considérer l'AgR à 120 µg/ml comme toxique pour les cellules, ce qui confirme les observations de microcinématographie.

A 12 µg/ml, en revanche, le taux protéique des cellules augmente de 22 %, celui de leucine-naphtylamidase est stationnaire et celui de la glucuronidase s'accroît de 9 % dans les cellules et de 12,5 % dans le milieu. A cette concentration, l'AgR est stimulant in vitro, sans toxicité pour les cellules, avec un léger pouvoir d'exocytose des hydrolases.

f) L'I.P.M. est certainement le stimulant le plus spectaculaire de ceux que nous avons étudiés. Il provoque une énorme exocytose de glucuronidase sans marquer de toxicité cellulaire notable, sinon très légère à 120 µg/ml, où l'on dose 9 % de la leucine-naphtylamidase dans le milieu, mais insuffisante pour rendre compte du relargage massif de bêta-glucuronidase (64 %) dans le milieu. L'activité globale en cette enzyme augmente avec chaque concentration d'IPM.

L'on retrouve avec cette substance, l'effet des éléments particuliers (amiante, immuncomplexes, etc...) relevé par ALLISON et son laboratoire sur les macrophages et leurs enzymes hydrolytiques. La présence de particules ou d'antigènes particuliers augmente ou provoque le relargage des enzymes lysosomiales et elles-seules.

Une culture de macrophages avec des particules de latex a donné un relargage spécifique de la bêta-glucuronidase (tableau 32) :

Latex	Protéi- nes	Leu- Na	Cell.	Bêta-glucuronidase				
				$\Delta$	Milieu	Total	$\Delta$	% Milieu
0	56,0	4,5	22,7	-	0	22,7	-	0
0,1 ml	68,3	6,1	31,0	+ 36 %	0	31,0	+ 36 %	0
0,5 ml	66,3	7,1	30,2	+ 33 %	6,7	36,9	+ 62 %	18 %

Tableau 32 : Effet du latex sur des macrophages péritonéaux de rats WISTAR en culture in vitro. Une suspension de latex 0,8  $\mu$ m DIFCO, diluée au 1/40 dans du milieu MEM+, a été distribuée selon les quantités indiquées, dans les 2,5 ml finals de la culture de macrophages.

On voit que parallèlement à une augmentation de l'activité intracellulaire de leucine-naphtylamidase et de l'activité totale en bêta-glucuronidase, il y a un relargage de cette dernière enzyme dans le milieu de culture. Notons une certaine adsorption des protéines relarguées, sur les particules de latex non phagocytées.

En conclusion, l'ensemble des molécules utilisées stimulent, à des degrés divers, les macrophages en culture in vitro, l'IPM étant le stimulant le plus actif, au moins sur l'exocytose spécifique des enzymes lysosomiales qu'il provoque. L'AgR à ce titre possède une très légère action, mais se révèle toxique à trop forte concentration.

#### 5) Stimulation avec du sérum de rats infectés par S. mansoni

Selon le même protocole de culture des macrophages que celui utilisé avec les stimulants décrits ci-dessus, nous avons appliqué pendant 16 heures, à des macrophages péritonéaux de rats FISHER, 10 % de



sérum de rats syngéniques sains ou infestés par Schistosoma mansoni.  
Les dosages ont donné les résultats du tableau 33.

	Sérum de rat sain	Sérum de rat infesté depuis 70 j	$\Delta$
( Protéines ( $\mu\text{g}/10^6$ cells) )	44,6 $\pm$ 5,2	45,6 $\pm$ 8,5	% 2,2 %
( Cathépsine C (nM substrat/ $10^6$ cell/h) )	66 $\pm$ 3,4	62 $\pm$ 2,5	- 6 %
( $\beta$ -glucuronidase ( " ) )	29 $\pm$ 7,5	39 $\pm$ 11,5	+ 33,5 %
( $\beta$ -galactosidase ( " ) )	89 $\pm$ 14	101 $\pm$ 17	+ 13,5 %
( Phosphatases acides ( " ) )	114 $\pm$ 20	119 $\pm$ 22	+ 4,4 %

Tableau 33 : Effets comparatifs d'une sérum de rat FISHER sain et d'un sérum de rat infesté par S. mansoni depuis 70 jours, sur divers paramètres de macrophages péritonéaux de rats syngéniques en culture in vitro

On remarque, qu'à l'exception de la cathépsine C qui décroît, toutes les autres activités augmentent en présence du sérum de rat infesté, la bêta-glucuronidase présentant un taux supérieur de près de 34 % à celui obtenu avec du sérum de rat sain.

Quel peut être l'effet d'antigènes parasitaires sur des macrophages ainsi "armés" ?

Après 16 heures de contact macrophages-sérums de rat, nous avons ajouté aux milieux 50  $\mu\text{l}$  d'un broyat frais de vers adultes de S. mansoni et avons laissé les cultures 3 heures supplémentaires. Les

dosages n'ont été réalisés que sur les cellules, car les milieux contiennent une forte proportion des diverses enzymes dosées, apportées tant par le sérum de rat que par les broyats de schistosomes (Tableau 34).

	Sérum de rat sain	Sérum de rat infecté	$\Delta$
	+ broyat de schistosomes		
Protéines ( $\mu\text{g}/10^6$ cell)	39,6 $\pm$ 2,3	43,1 $\pm$ 2,3	+ 8,9 %
Cathépsine C (nM/ $10^6$ cell/h)	45 $\pm$ 5	44 $\pm$ 3,5	- 2,2 %
$\beta$ -glucuronidase ( " )	36 $\pm$ 4	34 $\pm$ 4	- 5,5 %
$\beta$ -galactosidase ( " )	35 $\pm$ 2,5	35 $\pm$ 3	0
Phosphatases acides ( " )	139 $\pm$ 22	151 $\pm$ 31	+ 8,6 %

Tableau 34 : Action in vitro d'un broyat frais de Schistosomes adultes sur divers paramètres de macrophages "armés" par des sérums de rats sains ou infectés par le parasite depuis 70 jours.

Sauf pour les phosphatases acides, les taux enzymatiques diminuent dans les macrophages spécifiquement armés par du sérum de rat infesté : la fixation des immunoglobulines cytophiles, suivie de celle des antigènes particuliers du broyat de parasite ont provoqué une exocytose des enzymes hydrolytiques des macrophages.

Il faut en effet considérer que les taux intracellulaires de ces molécules sont fortement augmentés par la préculture des cellules dans du sérum de rat parasité (Tableau 33) et que la différence entre les deux types de culture après action des antigènes parasitaires (Tableau 34) n'est pas le reflet du relargage réel effectivement produit par ces antigènes.

En conclusion de ces expérimentations d'activation in vitro, on peut dire que, sans préjuger de l'activité biologique des macrophages stimulés par ces divers agents, en particulier quant à leur toxicité vis-à-vis de larves de schistosomes, il est possible d'affirmer que l'IPM est un activateur puissant du métabolisme macrophagique et qu'à un degré moindre, l'AgR et le WSA le sont aussi.

Enfin, le sérum de rat parasité est également stimulant et provoque une activation des enzymes du macrophage, supérieure à celle obtenue avec le sérum de rats sains.

Ces observations, réalisées sur des macrophages en culture in vitro, débarrassés des cellules immuno-compétentes normalement présentes dans les réactions au sein de l'animal, il convenait de les effectuer in vivo. C'est que nous allons examiner maintenant.

## B) Activation in vivo

### 1) Stimulation des macrophages

Les mêmes agents, testés in vitro, ont été utilisés in vivo à 2 µg, 20 µg, 200 µg et 2 000 µg en solution dans 1 ml d'eau physiologique injecté dans la cavité péritonéale de rats HOODED LISTER consanguins (2 rats par concentration). Deux rats témoins reçoivent 1 ml d'eau physiologique.

Sept jours plus tard, les macrophages péritonéaux sont récupérés par lavage péritonéal avec 20 ml. de MEM hépariné. Les cellules lavées de chaque rat sont réparties dans 3 boîtes de Petri FALCON pour culture cellulaire de 5 cm de diamètre, à raison de 3 millions de cellules par boîte.

Après 3 heures de culture pour permettre l'adhérence des macrophages, le surnageant contenant les cellules non fixées est éliminé, la couche cellulaire est énergiquement lavée trois fois par agitation circulaire des boîtes avec du PBS froid.

Les macrophages sont alors lysés avec 1 ml de tampon Tris-Magnésium pH 7,2, contenant 0,1 % de Triton X 100. Les dosages décrits dans l'activation in vitro (protéines, bêta-glucuronidase et leucine-naphtylamidase) sont réalisés sur les lysats cellulaires.

## 2) Résultats

Les taux obtenus, rapportés sur le tableau 35 et la figure 36, sont moins spectaculaires que ceux observés in vitro.

A l'exception de la lipoprotéine de kyste hydatique et de l'AgR de M. smegmatis, l'ensemble des substances injectées se révèlent peu stimulantes.

Le muramyl-dipeptide est aussi faiblement activateur in vivo qu'in vitro. Le WSA stimule la bêta-glucuronidase, surtout à 200 µg (+ 45,5 %) mais très peu les protéines et la leucine-naphtylamidase. Le LPS et l'IPM stimulent la glucuronidase aux faibles concentrations (2 µg et 20 µg), l'IPM étant encore actif à 200 µg avec sans doute un relargage in vivo de la β-glucuronidase, puisque son taux intracellulaire diminue, alors que la leucine-naphtylamidase double par rapport aux macrophages témoins.

La lipoprotéine de kyste hydatique déclenche un accroissement général des paramètres macrophagiques choisis dans cette expérience, comme cela se produit in vitro ; cet accroissement est cependant supérieur ici : les protéines augmentent de 31 %, la glucuronidase de 52 % et la leucine-naphtylamidase de 160 % (2,6 fois plus que dans les témoins).

Jusqu'à 200 µg, l'AgR de M. smegmatis est stimulant, mais toxique à 2 mg puisque l'accroissement du nombre de molécules dosées est moindre à cette dernière concentration qu'à 200 µg (particulièrement pour la leucine-naphtylamidase).

Il ressort de cet ensemble d'activités que la stimulation in vivo des macrophages entraîne une certaine modification des taux intra-cellulaires enzymatiques, mais que ces altérations ne signifient pas grand chose par elles-mêmes si l'on ne fait pas agir ces cellules stimulées sur des cibles biologiques où les mécanismes cytotoxiques éventuellement activés pourront se manifester.

C'est à un tel effet que nous avons exposé des larves parasitaires, dans les expériences qui seront décrites dans la seconde partie du dernier chapitre, consacré à l'application de l'immunostimulation humorale et macrophagique dans la schistosomiase expérimentale du rat.

	( Eau Phys. )	( 2 µg )	( 20 µg )	( 200 µg )	( 2 000 µg )
<u>IPM</u>					
Protéines	32,70	33,98	39,87	41,14	40,68
Béta-glucur.	22,1	24,7	24,7	20,4	21,4
Leucine-NA	5,3	4,6	7,6	11,7	10,0
<u>LP</u>					
Protéines	35,70	44,5	35,4	43,5	46,8
Béta-glucur.	22,4	26,9	30,6	34,1	34,1
Leucine-NA	5,9	8,5	13,9	11,1	15,3
<u>AgR</u>					
Protéines	34,5	49,4	47,1	55,3	52,0
Béta-glucur.	23,2	35,9	30,2	35,4	34,2
Leucine-NA	5,8	9,7	7,0	16,0	10,1
<u>LPS</u>					
Protéines	35,8	48,2	41,0	40,9	35,9
Béta-glucur.	22,6	19,3	25,7	21,9	22,1
Leucine-NA	5,7	8,1	7,4	5,8	7,6
<u>Muramyl-dip.</u>					
Protéines	35,9	38,6	35,7	36,7	34,6
Béta-glucur.	23,6	29,9	24,0	24,8	24,4
Leucine-NA	5,9	7,3	6,1	6,2	6,9
<u>WSA</u>					
Protéines	35,7	37,0	35,4	36,0	34,8
Béta-glucur.	22,3	30,9	28,6	32,6	29,9
Leucine-NA	5,7	5,1	5,9	5,3	5,3

Tableau 35 : Effet de l'injection intrapéritonéale d'eau physiologique et de divers immunostimulants sur les macrophages de rats HOODED LISTER consanguins. Les protéines sont exprimées en µg par 10<sup>6</sup> cellules, et les activités enzymatiques en nanomoles de substrat hydrolysé par heure et par million de cellules.

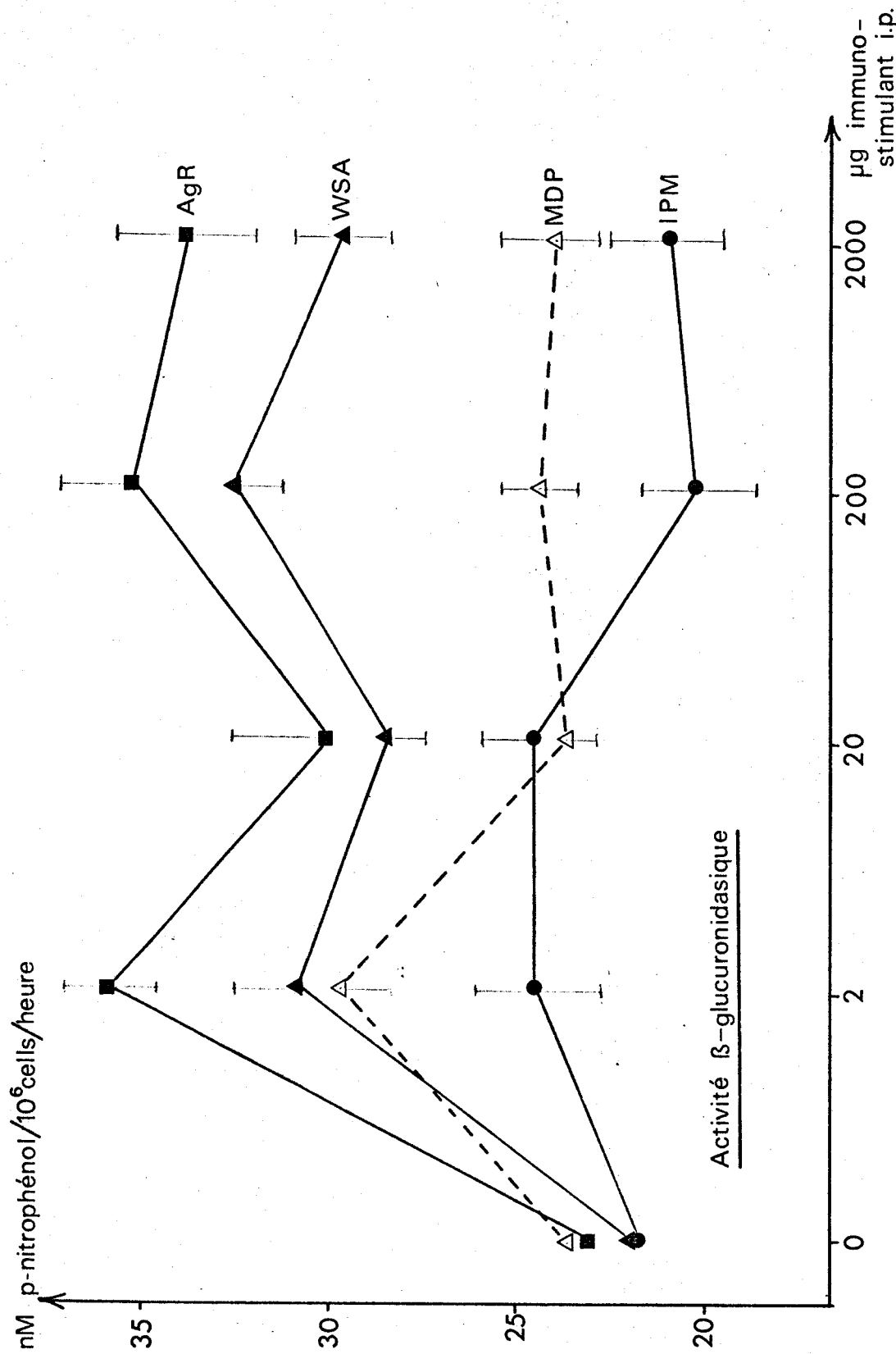


Figure 36 : Effet de divers immunostimulants, injectés intrapéritonéalement dans 1 ml d'eau physiologique à des rats HOODED LISTER, sur l'activité béta-glucuronidase de macrophages péritonéaux prélevés après 6 jours de stimulation. L'activité enzymatique est testée après 3 heures de culture cellulaire et élimination des cellules non adhérentes.



Dans la première partie du chapitre qui suit, nous rapportons les essais de stimulation de la production des immunoglobulines E au cours de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni. Parmi les adjuvants utilisés, figure l'AgR mycobactérien dont les qualités immunostimulantes dans la production d'anticorps se sont révélées positives vis-à-vis de l'albumine.

CHAPITRE V

---

APPLICATION A LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE DU RAT



## I - POTENTIALISATION DES IgE

Les infections parasitaires sont responsables d'un important accroissement de la synthèse des immunoglobulines de type E (réagines) spécifiques et non spécifiques du parasite. Cette particularité entraîne une forte élévation du taux sérique des IgE globales du sujet parasité avec ses conséquences sur le développement d'une hypersensibilité immédiate, mais aussi sur l'apparition d'une résistance à la réinfection, dans la mesure où ces immunoglobulines coopèrent in vivo avec les macrophages pour détruire les larves nouvellement introduites dans l'organisme.

Dans l'intention d'accroître la réponse humorale et particulièrement celle des IgE, nous avons étudié l'effet de l'injection de divers adjuvants simultanément à une infestation expérimentale par Schistosoma mansoni chez le rat FISHER.

### A) Protocole d'infestation et d'immunostimulation

#### 1) Infestation des rats

Des rats FISHER consanguins mâles de 180 g sont maintenus en décubitus dorsal. La surface abdominale, rasée puis mouillée à l'eau, reçoit un anneau en inox de 2 cm de diamètre sur 1 cm de haut maintenu par une bande adhésive.

On réalise une suspension aqueuse de cercaires de Schistosoma mansoni fraîchement émises par des mollusques infestés depuis 3 semaines et placés à 30°C. Après numération d'un demi ml, en Lugol à 5 %, la suspension de cercaires est ajustée à 800 larves par ml et 1 ml de celle-ci est déposé dans l'anneau métallique fixé sur la peau abdominale des rats. Le contact entre larves et rats est poursuivi de 20 à 30 min. délai au bout duquel 99 à 100 % des cercaires ont pénétré dans la peau des rongeurs.

## 2) Injection des adjuvants

Au moment de détacher l'animal, en fin d'infestation, il reçoit, en injection sous-cutanée dans le flanc, 0,2 ml d'hydroxyde d'alumine contenant l'adjuvant à tester. Le gel d'aluminium est réalisé par précipitation d'hydroxyde d'alumine à partir d'une solution de sulfate d'alumine en présence de soude (cf. pages techniques 195). Il est injecté à la concentration de 1 mg d'aluminium par ml, soit 200 µg d'aluminium par dose adjuvante dans nos conditions de stimulation.

Tous les 7 à 10 jours, les animaux sont saignés par prélèvement dans le sinus rétro-orbital.

Parmi les substances immunostimulantes utilisées, nous avons introduit des germes tués de Bordetella pertussis. En effet, B. pertussis, le bacille de Bordet et Gengou agent de la coqueluche, est une bactérie qui stimule les IgE vis-à-vis d'antigènes injectés en même temps ou peu de temps avant ou après elle. L'antigène "histamino-sensibilisant" a été récemment isolé (LEHRER et coll., 1975)<sup>231</sup>.

Comme source de bacille, nous avons employé le vaccin anticoquelucheux de l'Institut Pasteur (PERTHYDRAL) qui contient 5 milliards de germes tués par ml d'hydroxyde d'alumine.

Nous avons mené quatre séries différentes d'infestations stimulées :

a) dans une première étape, nous avons infesté 25 rats, répartis en cinq groupe de cinq :

- 5 rats ont reçu chacun 1 milliard de B. pertussis
- 5 rats ont reçu chacun 1 million de B. pertussis par dilution du vaccin anticoquelucheux au 1/1000, avec de l'eau physiologique
- 5 rats ont reçu 10 µg d'AgR de M. smegmatis
- 5 rats ont reçu 10 µg de lipoprotéine de kyste hydatique
- 5 rats témoins ont reçu l'hydroxyde d'alumine seul.

b) Dans une seconde expérience, 20 rats ont été infestés et immunostimulés selon la répartition suivante :

- 10 rats ont reçu 10 µg de LPS de S. typhi en solution dans la suspension d'hydroxyde d'alumine ;
- 10 rats n'ont reçu que l'hydroxyde d'alumine.

c) Dans une troisième série, a été étudié l'effet d'une stimulation répétée par plusieurs injections de l'adjuvant :

- 10 rats ont été stimulés le jour de l'infestation par 10 µg de lipoprotéine (LP) de kyste hydatique (Echinococcus granulosus) en Al (OH)<sub>3</sub>, puis ils ont reçu 10 µg de LP en Al (OH)<sub>3</sub> les 9ème, 20ème et 30ème jours de l'infestation ;
- 10 rats témoins ont été stimulés les mêmes jours par l'hydroxyde seul.

d) Enfin un dernier groupe de 10 rats a été infesté et stimulé par injection de l'adjuvant dans les coussinets plantaires postérieurs. Ce groupe se partage en deux :

- 5 rats ont été vaccinés par 10 µg de WSA dans les 0,2 ml d'Al (OH)<sub>3</sub>
- 5 rats témoins ont été vaccinés avec l'Al (OH)<sub>3</sub> seul.

### 3) Réponse secondaire

Cent quarante neuf jours après la première infestation, à une époque où le taux sérique des IgE globales est revenu au niveau initial, et où l'immunité à la réinfestation est en principe abolie, nous avons réinfesté, avec 800 cercaires, les rats stimulés, lors de la première infestation, par B. pertussis et par l'AgR de M. smegmatis, ainsi que les témoins, en omettant cette fois-ci l'adjuvant.

#### 4) Dosage des IgE

Les IgE sériques globales sont dosées par une technique radio-immunologique selon le protocole décrit par CARSON et coll. (1974)<sup>7</sup> (cf. pages techniques 192). Les IgE contenues dans le sérum à doser entrent en compétition avec une quantité donnée d'IgE marquées à l'iode 125 pour la fixation sur des anticorps IgG spécifiques des IgE.

Les IgG étant insolubles dans le sulfate d'ammonium à 33 % et les IgE étant solubles, on précipite avec ce sel les IgG et les IgE complexées aux IgG, laissant en solution les IgE libres. Parmi ces IgE libres, les molécules radioactives sont d'autant plus abondantes qu'il y avait davantage d'IgE en compétition dans le sérum à doser. Les IgE radioactives sont évaluées par mesure du rayonnement gamma d'une fraction du surnageant de la précipitation.

Les résultats sont exprimés en µg/ml d'IgE, par comparaison avec la radioactivité obtenue avec une gamme étalonnée d'IgE pures (§).

Pour chaque adjuvant testé, les sérums, dosés individuellement et en trois exemplaires, sont regroupés par jours de prélèvement après l'infestation. La moyenne donnée est la moyenne géométrique ou médiane, avec les limites du domaine de confiance de 95 %.

### B) Résultats

#### 1) Première infestation

Quatre groupes d'infestations ont été réalisés, comme indiqué plus haut.

- a) le tableau 37 donne, pour la première série, les taux moyens, en µg/ml, d'IgE obtenus entre le jour de l'infestation et le 140ème jour. Ce tableau est traduit en courbes sur les figures 38 à 43. (suite du texte p. 145).

---

(§) Nous devons à Madame Roselyne ROUSSEaux d'avoir pu mener à bien le dosage des quelques 1400 sérums recueillis au cours de ce travail, grâce aux IgE marquées qu'elle a préparées pour nous. Nous remercions également Monsieur H. BAZIN pour les IgE purifiées utilisées dans ces dosages.

	Témoins	Bordetella pertussis		AgR smegmatis	Lipoprotéine kyste hydatique
		10 <sup>9</sup> cellules	10 <sup>6</sup> cellules		
J 0	0,14 (0,11 - 0,17)	0,26 (0,095 - 0,35)	0,19 (0,12 - 0,30)	0,21 (0,14 - 0,31)	0,13 (0,095 - 0,18)
J 10	0,08 (0,05 - 0,13)	0,18 (0,14 - 0,24)	0,15 (0,10 - 0,21)	0,14 (0,08 - 0,26)	0,09 (0,06 - 0,14)
J 22	0,13 (0,07 - 0,26)	0,40 (0,30 - 0,54)	0,13 (0,07 - 0,22)	0,53 (0,27 - 1,07)	0,24 (0,18 - 0,31)
J 30	1,31 (1,02 - 1,68)	0,59 (0,35 - 0,99)	0,32 (0,21 - 0,49)	1,20 (0,67 - 2,13)	1,25 (1,01 - 1,55)
J 41	0,74 (0,57 - 0,96)	1,22 (0,68 - 2,20)	0,56 (0,28 - 1,10)	1,84 (1,06 - 3,21)	0,77 (0,41 - 1,45)
J 50	0,62 (0,52 - 0,75)	1,04 (0,63 - 1,72)	0,55 (0,34 - 0,89)	0,77 (0,46 - 1,29)	0,60 (0,39 - 0,93)
J 58	-	1,20 (0,67 - 2,14)	0,37 (0,21 - 0,64)	0,96 (0,51 - 1,80)	-
J 64	0,44 (0,28 - 0,71)	0,23 (0,13 - 0,40)	0,18 (0,09 - 0,35)	0,93 (0,68 - 1,29)	0,18 (0,09 - 0,34)
J 70	0,25 (0,16 - 0,37)	0,15 (0,11 - 0,22)	0,21 (0,11 - 0,43)	0,48 (0,22 - 1,06)	0,23 (0,14 - 0,39)
J 82	0,27 (0,19 - 0,38)	0,38 (0,22 - 0,64)	0,35 (0,17 - 0,73)	0,37 (0,15 - 0,91)	0,30 (0,15 - 0,61)
J 90	0,18 (0,11 - 0,29)	0,30 (0,21 - 0,42)	0,39 (0,21 - 0,74)	0,32 (0,15 - 0,66)	0,20 (0,13 - 0,31)
J 100	0,58 (0,36 - 0,94)	0,32 (0,18 - 0,57)	0,31 (0,18 - 0,55)	0,37 (0,23 - 0,61)	0,86 (0,46 - 1,59)
J 110	0,65 (0,41 - 1,01)	0,32 (0,20 - 0,52)	0,27 (0,14 - 0,55)	0,43 (0,32 - 0,60)	1,11 (0,38 - 3,29)
J 120	0,51 (0,36 - 0,72)	0,26 (0,20 - 0,35)	0,24 (0,12 - 0,48)	0,66 (0,47 - 0,93)	0,27 (0,14 - 0,50)
J 140	0,27 (0,19 - 0,37)	0,28 (0,19 - 0,42)	0,19 (0,11 - 0,31)	0,39 (0,26 - 0,58)	-

Tableau 37 : Taux sériques (en µg/ml) des IgE globales chez des rats FISHER mâles infestés avec 800 cercaires de S. mansoni par voie transcutanée abdominale, en fonction du temps d'infestation et des adjuvants utilisés, injectés dans Al(OH)<sub>3</sub> en sous cutanée dans le flanc au moment de l'infestation (entre parenthèse : domaine de confiance de 95 %).



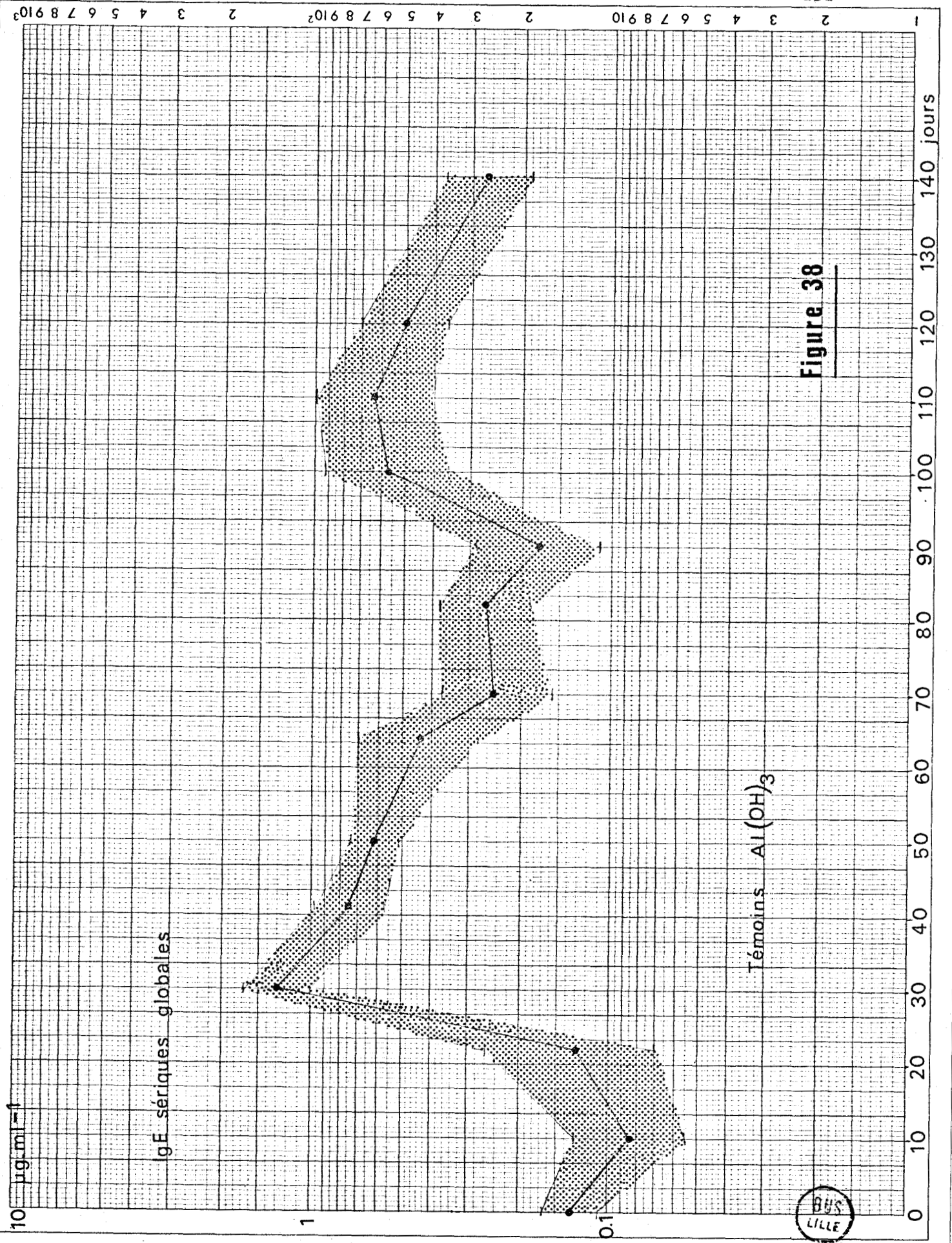


Figure 38

Témoins  $\text{Al}(\text{OH})_3$



gE sériques globales

10  $\mu\text{g/ml}$

1

0.1

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 jours

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
2 3 4 5 6 7 8 9 10  
3 4 5 6 7 8 9 10

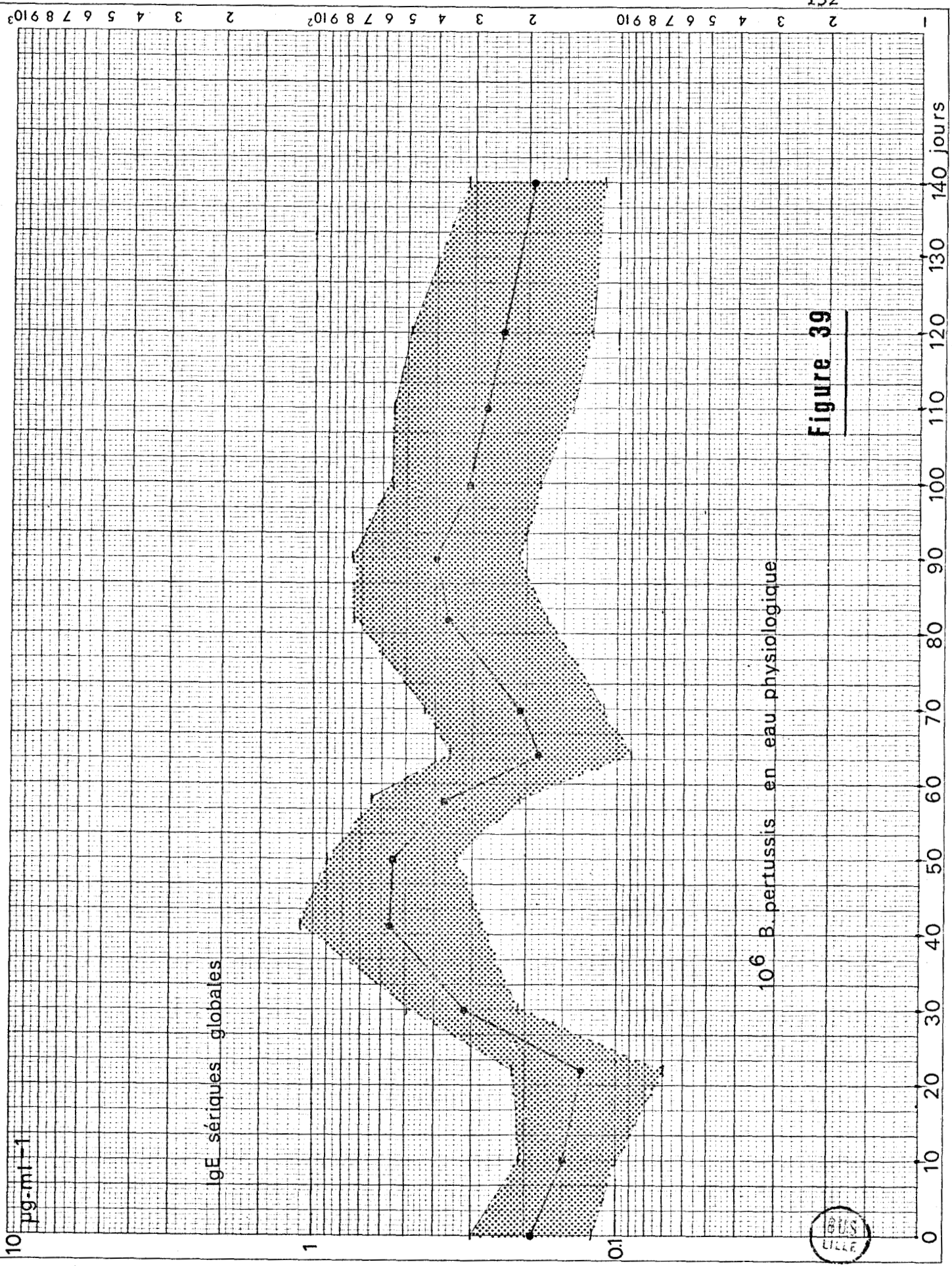


Figure 39

$10^6$  B. pertussis en eau physiologique



10 µg.ml<sup>-1</sup>

IgE sériques globales

1

0.1

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 jours

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 2 3 4 5 6 7 8 9 10 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1

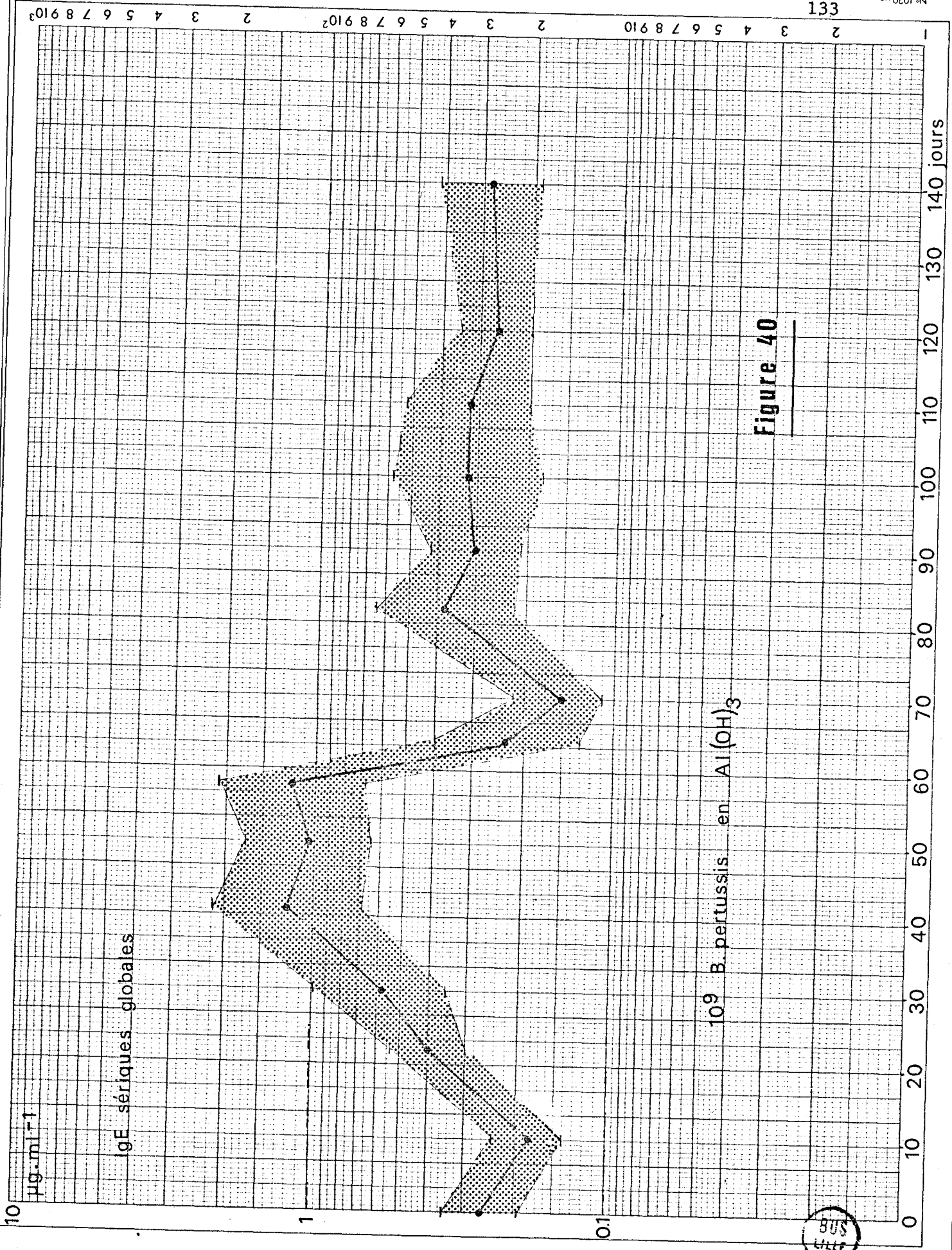


Figure 40





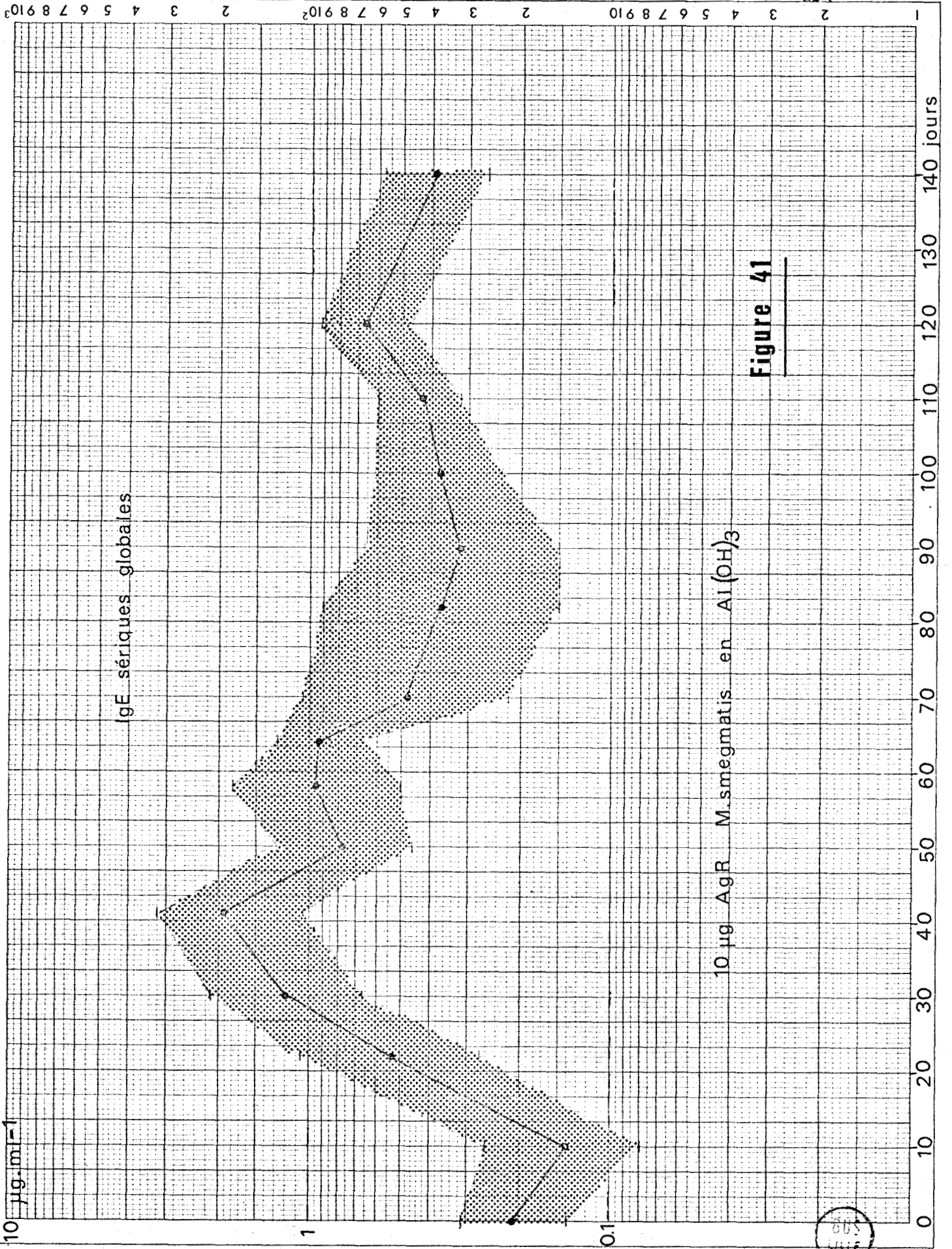


Figure 41

805  
VILLE

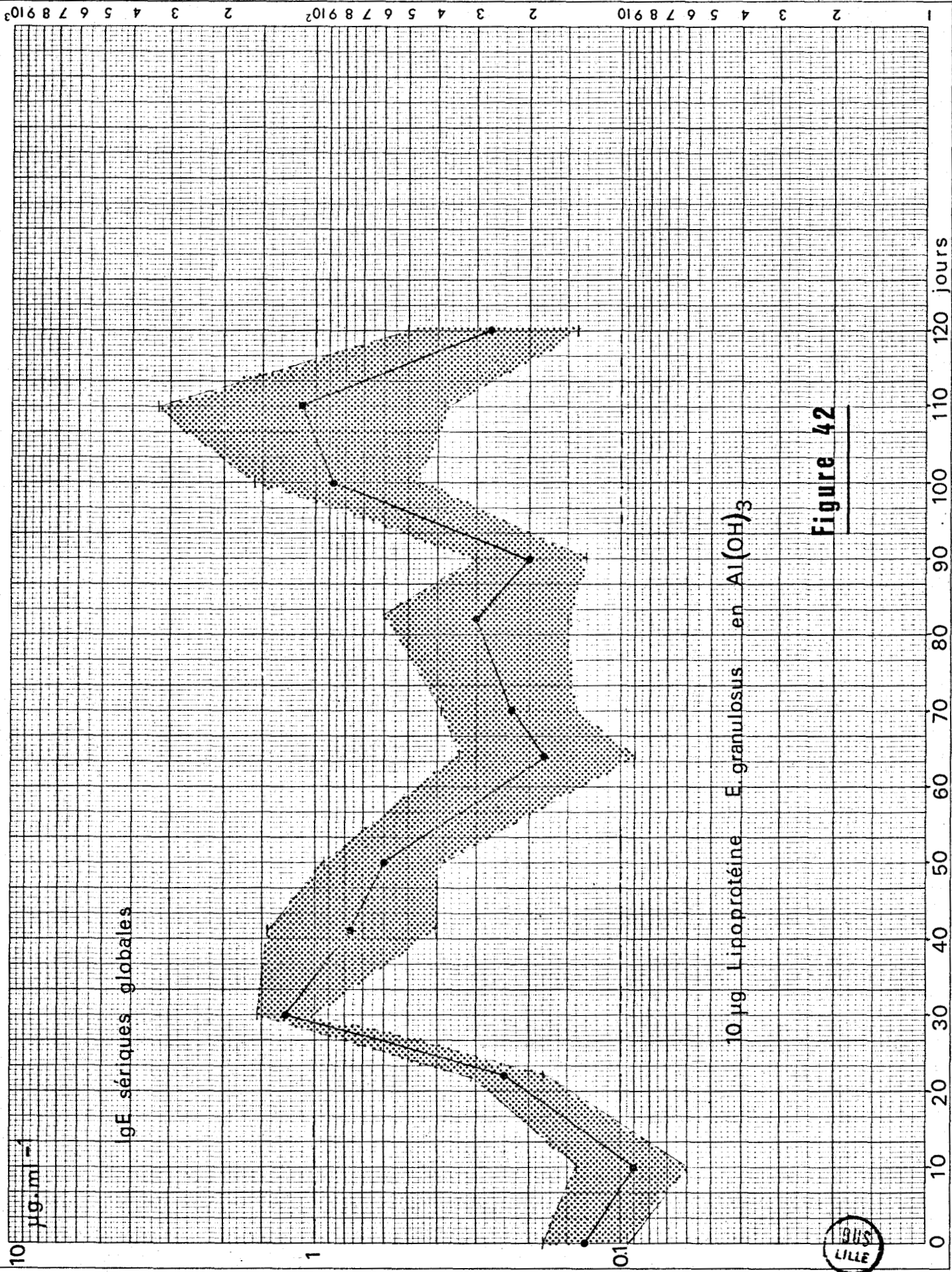


Figure 42



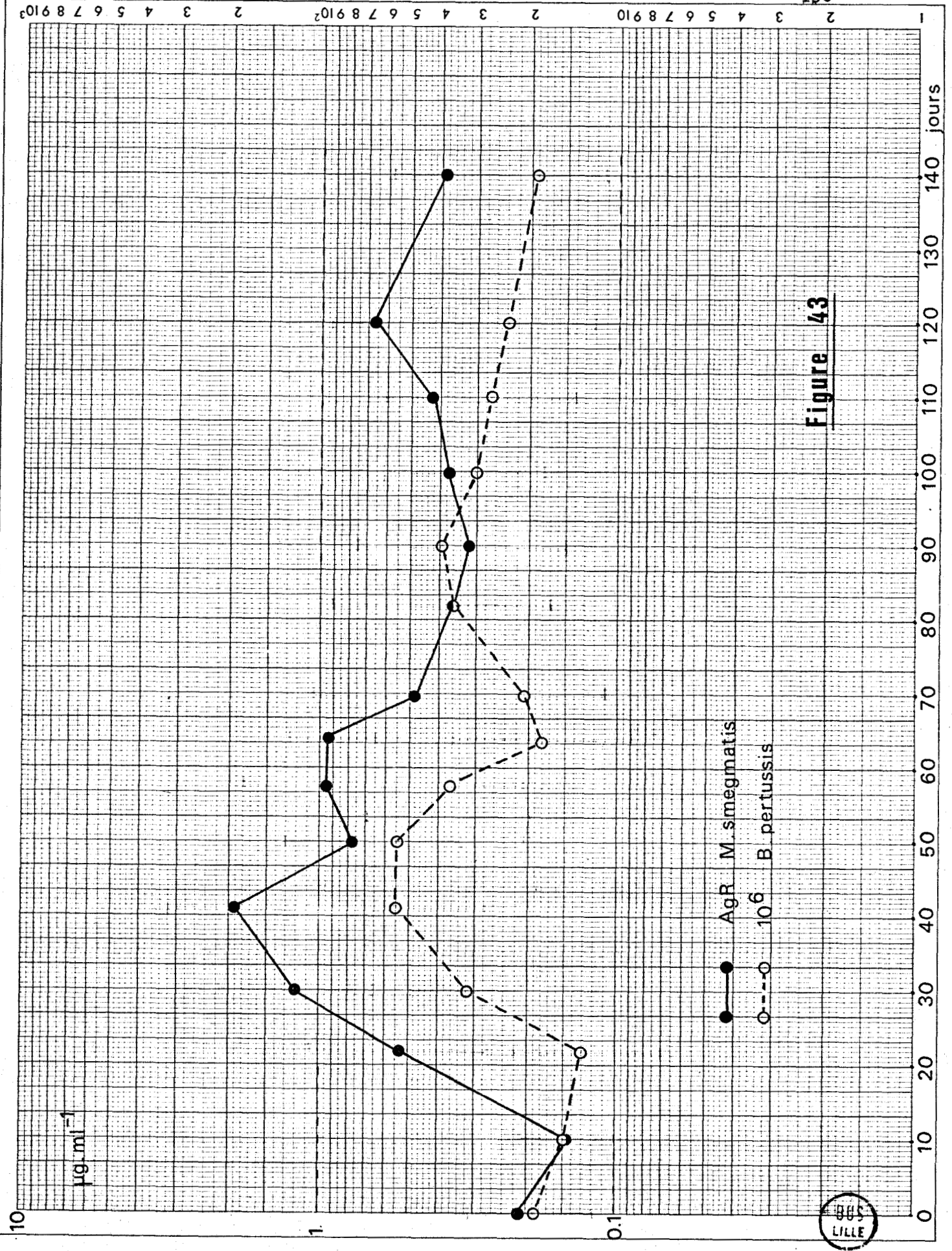


Figure 43



	Témoins	L P S
J 0	0,11 (0,08 - 0,14)	0,25 (0,20 - 0,32)
J 12	0,08 (0,06 - 0,09)	0,13 (0,10 - 0,16)
J 20	0,48 (0,28 - 0,82)	0,07 (0,04 - 0,11)
J 30	1,31 (0,62 - 2,73)	0,31 (0,20 - 0,49)
J 40	1,37 (1,06 - 1,76)	1,34 (0,96 - 1,88)
J 50	1,03 (0,70 - 1,52)	0,63 (0,47 - 0,85)
J 61	0,88 (0,55 - 1,41)	1,00 (0,71 - 1,43)
J 71	0,86 (0,69 - 1,08)	0,63 (0,50 - 0,79)
J 79	0,70 (0,51 - 0,97)	0,59 (0,49 - 0,71)
J 90	0,61 (0,36 - 1,03)	0,28 (0,21 - 0,39)
J 100	1,13 (0,67 - 1,91)	1,55 (0,88 - 2,76)
J 110	0,72 (0,42 - 1,24)	0,43 (0,27 - 0,68)
J 120	0,53 (0,35 - 0,80)	0,42 (0,27 - 0,67)
J 131	0,13 (0,10 - 0,17)	0,10 (0,09 - 0,12)
J 141	0,14 (0,10 - 0,20)	0,09 (0,07 - 0,12)
J 152	1,02 (0,73 - 1,42)	0,38 (0,26 - 0,57)
J 160	1,15 (0,68 - 1,93)	0,46 (0,33 - 0,66)
J 170	0,42 (0,25 - 0,72)	0,49 (0,35 - 0,68)
J 180	0,51 (0,25 - 1,06)	0,42 (0,31 - 0,56)
J 190	0,39 (0,21 - 0,72)	0,60 (0,42 - 0,85)
J 200	0,39 (0,24 - 0,65)	0,16 (0,10 - 0,25)

Tableau 44 : Taux sériques des IgE chez des rats infestés par S. mansoni et recevant le même jour 10 µg de LPS de S. typhi en sous-cutanée dans le flanc.



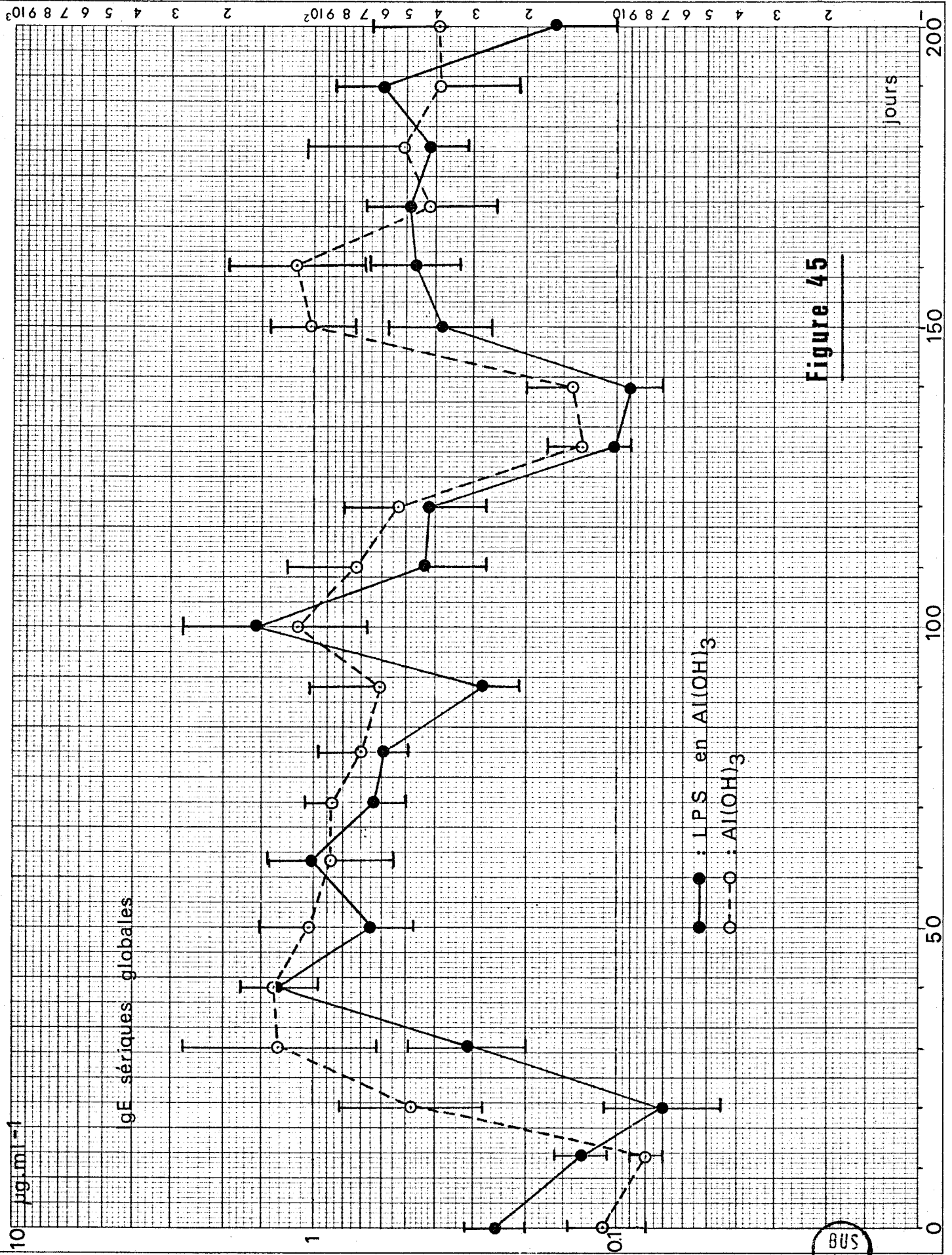


Figure 45



	Témoins	L.P. kyste hydatique
J 0 S:	0,19 (0,14 - 0,26)	0,21 (0,13 - 0,33)
J 10 S:	0,11 (0,09 - 0,13)	0,15 (0,11 - 0,20)
J 20 S:	0,20 (0,11 - 0,35)	0,13 (0,09 - 0,17)
J 30 S:	1,46 (0,98 - 2,18)	0,25 (0,18 - 0,35)
J 40 :	3,63 (2,68 - 4,93)	2,71 (1,95 - 3,75)
J 50 :	2,08 (1,36 - 3,19)	2,34 (1,87 - 2,93)
J 61 :	0,92 (0,76 - 1,12)	0,78 (0,70 - 0,87)
J 71 :	0,62 (0,43 - 0,90)	0,44 (0,35 - 0,57)
J 83 :	0,73 (0,46 - 1,77)	0,18 (0,14 - 0,24)
J 90 :	0,57 (0,41 - 0,81)	0,53 (0,41 - 0,69)
J 100 :	0,19 (0,15 - 0,25)	0,15 (0,13 - 0,17)
J 110 :	1,49 (1,09 - 2,03)	1,15 (0,86 - 1,56)
J 119 :	1,51 (1,00 - 2,27)	1,01 (0,71 - 1,43)
J 132 :	0,56 (0,36 - 0,85)	0,32 (0,27 - 0,37)
J 142 :	0,42 (0,27 - 0,64)	0,32 (0,26 - 0,41)

Tableau 46 : Taux sériques des IgE chez des rats FISHER infestés par S. mansoni et recevant plusieurs injections de 10 µg de la lipoprotéine de kyste hydatique (injections les jours marqués S). Les témoins reçoivent aux mêmes moments de l'hydroxyde d'alumine (entre parenthèse : domaine de confiance de 95 %).



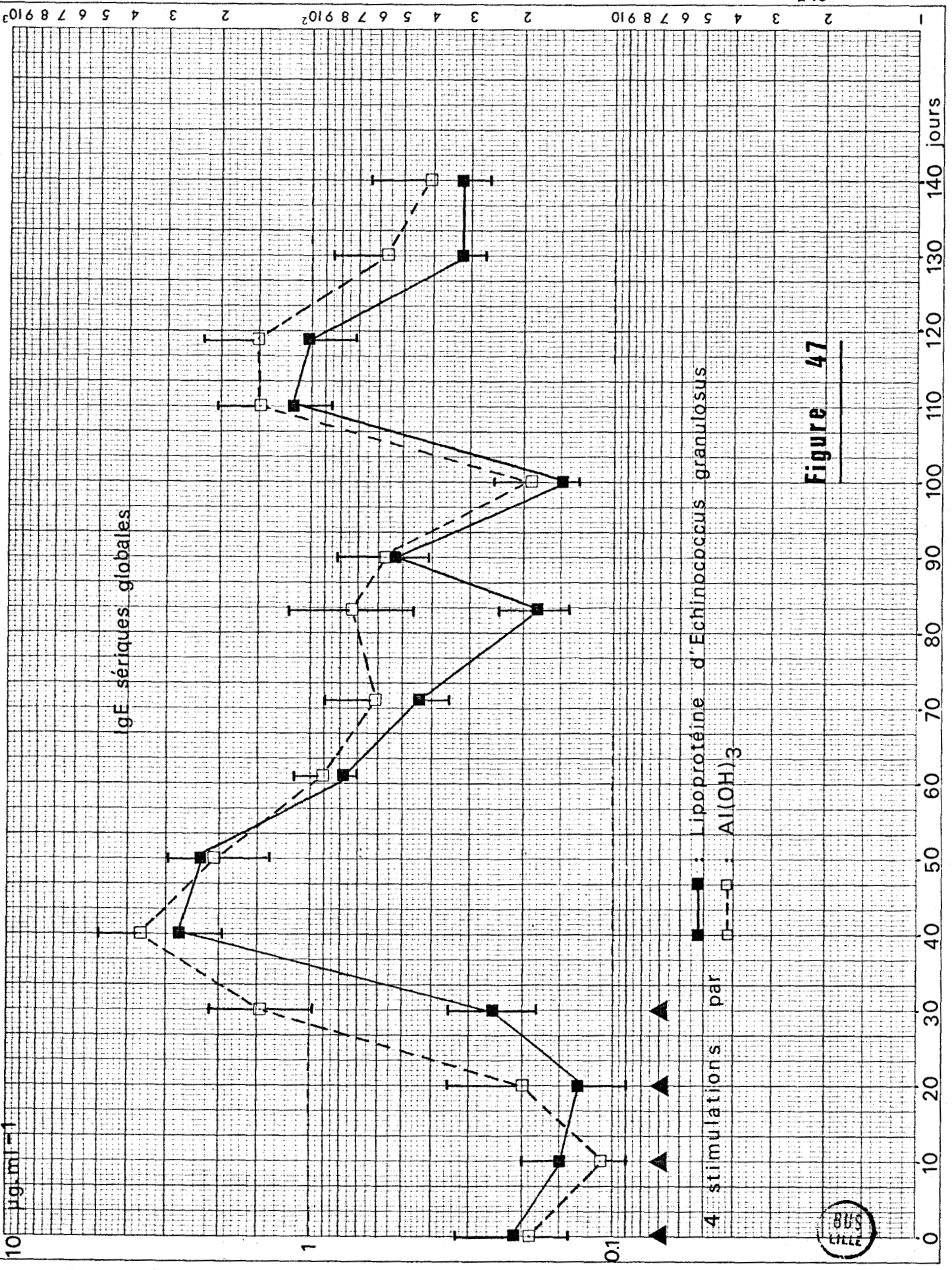


Figure 47



	Témoins	W S A
( J 0	0,05 (0,041 - 0,055)	0,05 (0,042 - 0,054)
( J 10	0,06 (0,047 - 0,074)	0,06 (0,048 - 0,066)
( J 21	0,26 (0,159 - 0,440)	0,43 (0,305 - 0,596)
( J 31	1,32 (0,63 - 2,80 )	1,53 (1,08 - 2,18 )
( J 40	1,23 (0,79 - 1,94 )	0,98 (0,80 - 1,21 )
( J 49	1,05 (0,68 - 1,61 )	0,80 (0,38 - 1,70 )
( J 61	0,28 (0,24 - 0,34 )	0,31 (0,18 - 0,54 )
( J 70	0,22 (0,08 - 0,64 )	0,18 (0,12 - 0,27 )
( J 81	0,29 (0,18 - 0,47 )	0,11 (0,09 - 0,13 )
( J 90	0,27 (0,16 - 0,44 )	0,22 (0,18 - 0,28 )
( J 101	1,29 (1,02 - 1,63 )	0,33 (0,21 - 0,53 )
( J 110	0,45 (0,20 - 0,98 )	1,18 (0,74 - 1,88 )
( J 123	0,24 (0,13 - 0,44 )	0,28 (0,23 - 0,35 )

Tableau 48 : Taux sériques des IgE chez des rats infestés par S. mansoni et stimulés le même jour avec 10 µg de WSA.





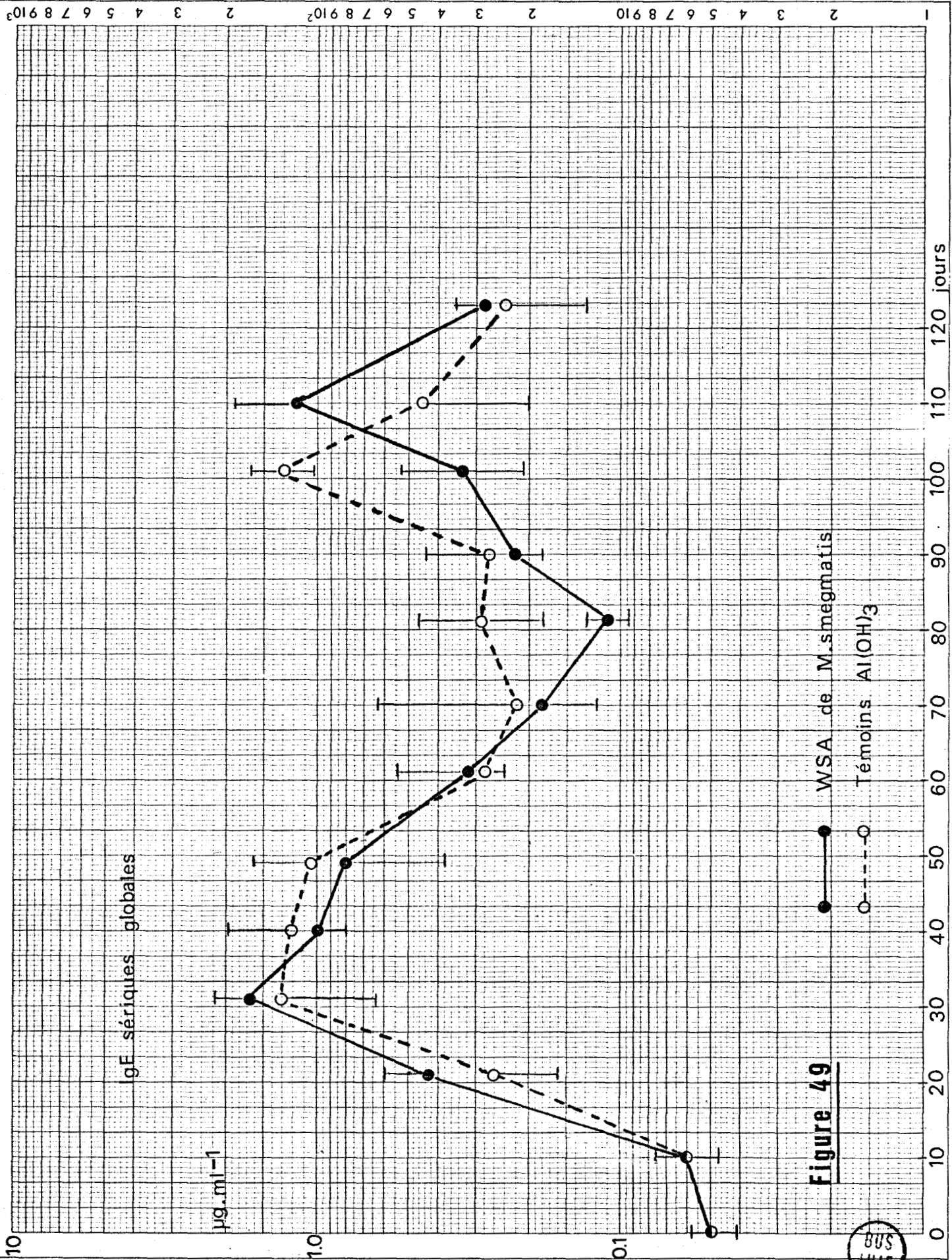


Figure 49



( Animaux réinfestés, sans injection d'adjuvant )

	Témoins non réinfestés	$10^9$ <u>Bordetella pertussis</u>	$10^6$	AgR
J 140	0,27 (0,19-0,37)	0,28 (0,19 - 0,42)	0,19 (0,11 - 0,31)	0,39 (0,26 - 0,58)
i2 + 8 (157)	0,30 (0,16-0,56)	0,74 (0,34 - 1,59)	0,24 (0,11 - 0,50)	0,49 (0,30 - 0,80)
i2 + 19 (168)	0,32 (0,26-0,40)	7,52 (4,42 - 12,78)	1,59 (0,96 - 2,63)	6,29 (4,16 - 9,51)
i2 + 27 (176)	0,76 (0,26-2,28)	11,07 (8,60 - 14,25)	6,64 (3,97 - 11,12)	17,78 (11,44 - 27,62)
i2 + 40 (189)	0,71 (0,25-1,96)	5,77 (4,40 - 7,56)	3,08 (1,51 - 6,26)	22,83 (14,90 - 34,99)
i2 + 53 (202)	0,16 (0,11-0,22)	6,22 (4,22 - 9,14)	1,14 (0,94 - 1,38)	16,39 (9,95 - 25,98)
i2 + 60 (209)	-	5,99 (3,14 - 11,42)	1,80 (0,55 - 5,91)	21,75 (14,27 - 33,17)
i2 + 70 (219)	-	5,89 (3,22 - 10,78)	1,74 (0,55 - 5,52)	20,82 (14,59 - 29,69)
i2 + 81 (230)	-	4,56 (2,59 - 8,03)	0,82 (0,44 - 1,50)	19,52 (11,86 - 32,11)
i2 + 96 (245)	-	1,32 (1,84 - 4,80)	0,83 (0,38 - 1,80)	20,30 (15,44 - 26,69)
i2 + 106 (255)	-	2,97 (1,84 - 4,80)	0,60 (0,27 - 1,28)	17,11 (9,99 - 22,53)

Tableau 50 : Taux sériques en IgE globales chez des rats FISHER mâles réinfestés le 149ème jour après une première infestation à S. mansoni, selon l'adjuvant reçu lors de cette première infestation.

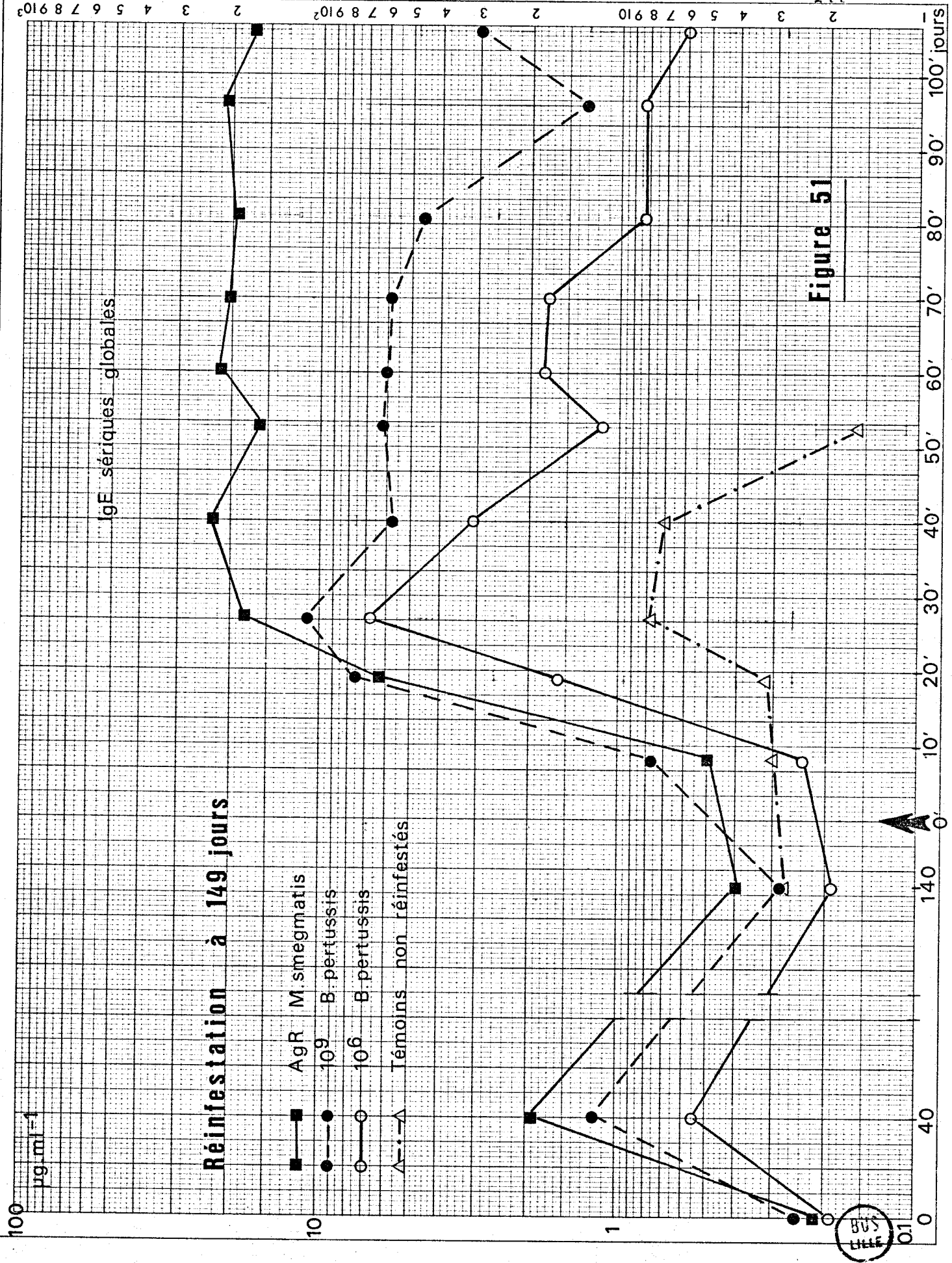


Figure 51

BUS LILLE

- b) Le tableau 44 présente les taux d'IgE obtenus avec les rats stimulés par le lipopolysaccharide de S. typhi (courbe fig. 45).
- c) Le tableau 46 donne le résultat de l'injection répétée d'hydroxyde d'alumine chez les témoins et d'hydroxyde d'alumine avec de la lipoprotéine de kyste hydatique chez les animaux expérimentaux (courbe de la figure 47).
- d) La quatrième série d'infestation correspond à des animaux recevant simultanément dans les coussinets plantaires postérieurs 10 µg de WSA (toujours en Al (OH)<sub>3</sub>) ; les témoins reçoivent l'hydroxyde d'alumine seul (tableau 48 et figure 49).

## 2) Réinfestation

Nous avons réinfesté au jours 149 les rats des deux séries B. pertussis et les rats de l'AgR M. smegmatis. Le tableau 50 et la figure 51 donnent les taux d'IgE obtenus avec ces divers animaux qui n'ont pas reçu l'adjuvant lors de la seconde infestation.

## C) Discussion

Les infections parasitaires stimulent fortement la synthèse de l'ensemble des IgE de l'organisme. Il est difficile et hors de notre propos, de préciser actuellement si cette stimulation intéresse toutes les cellules destinées à une synthèse d'IgE ou seulement celles qui avaient déjà commencé leur différenciation vers la cellule sécrétrice d'IgE au moment de l'infestation.

1) Le premier point notable, en observant les diverses courbes que nous avons tracées, est leur similitude tant en ce qui concerne la forme générale qu'en ce qui concerne l'amplitude. Il semble, à première vue, que les adjuvants utilisés, à la dose utilisée, n'ajoutent pas grand chose à la potentialisation majeure de l'infection parasitaire.

En réalité, la courbe "témoin" qui est, dans les diverses expériences, la courbe obtenue avec les animaux recevant le seul support minéral des adjuvants bactériens, est déjà une courbe stimulée. Le dosage des IgE chez les animaux immunisés avec un million de B. pertussis (courbe 39) constitue la véritable courbe témoin car nous avons dilué mille fois le vaccin anticoquelucheux avec de l'eau physiologique pour réaliser cet adjuvant. Il apparaît ainsi que l'hydroxyde d'alumine lui-même est un bon stimulant de la synthèse d'IgE ce que d'autres auteurs, tels REVOLTELLA et OVARY (1969)<sup>318</sup>, avaient constaté chez le lapin par les tests d'anaphylaxie cutanée passive.

Quant à la dose de 10 µg sur laquelle nous nous sommes arrêtés pour ces expériences, nous l'avons choisie sur les observations de PERINI et MOTA (1973)<sup>306</sup> qui avaient démontré un effet optimum sur la synthèse des IgE de 20 µg de LPS par kilo chez le cobaye. Nous avons donc fixé à 10 µg pour tous les adjuvants bactériens ou parasitaires, la quantité introduite dans chaque animal (exception faite de l'expérience de stimulation répétée). Il nous a paru qu'une faible dose avait plus de chance de stimuler préférentiellement les IgE et, d'autre part, pouvait rendre plus évident un pouvoir adjuvant efficace.

En ce qui concerne B. pertussis, certains auteurs (BINAGHI et BENACERRAF, 1964)<sup>31</sup>; JARRETT et coll., 1974)<sup>187</sup> utilisent les doses de 10 milliards de germes par rat en injection intrapéritonéale, l'équivalent de 2 ml de PERTHYDRAL (Pasteur). Etant donné le mode d'injection en sous-cutanée choisi, nous avons diminué le volume et donc la dose administrée.

2) Sur le plan du taux d'IgE globales obtenu, l'AgR se révèle comme le plus efficace (courbe 41) ; la réponse secondaire de ces animaux à la deuxième infestation (réalisée sans adjuvant) est d'ailleurs beaucoup plus forte qu'avec les autres adjuvants (courbe 51), ce que nous interprétons comme la démonstration du développement d'un plus grand nombre de cellules-mémoires lors de la première infection. Pour chacun des stimulants, le niveau de la réponse secondaire est sensiblement décuplé par rapport à celui obtenu lors de la première atteinte parasitaire.

Enfin, la stimulation répétée, que ce soit avec la lipoprotéine ou avec l'hydroxyde d'alumine, augmente le taux maximum obtenu à 40 jours, par rapport à une seule injection des divers immunostimulants.

3) Si l'on s'intéresse à la forme de ces courbes, deux éléments frappent l'observateur.

Tout d'abord, la montée brutale entre le 10ème - 20ème jour et le 30ème - 40ème jour, accroissement important déjà noté par d'autres auteurs (ROUSSEAU, 1974)<sup>327</sup>. A ce sujet, il peut être utile de remarquer le retard obtenu dans cette montée du taux des IgE globales chez les animaux stimulés avec le LPS (courbe 45) et avec la lipoprotéine administrée quatre fois (courbe 47), par rapport à leurs témoins respectifs. Le problème reste entier de connaître le signal de la synthèse IgE, la nature de l'antigène déclenchant. Provient-il des larves détruites lors de la pénétration dans la peau ? des larves détruites dans les poumons ? du métabolisme des vers installés dans le système porte ? ou, tardivement, du relargage antigénique massif provoqué par le rejet de la population parasitaire ?

On sait que les petites quantités d'antigènes favorisent la synthèse d'IgE. Est-ce le cas dans l'infection par S. mansoni chez le rat, en particulier dans les premiers jours de l'infestation. Nous pencherions, quant à nous, pour cette solution étant donné le délai très court dans certains cas (10 à 15 jours) pour obtenir un taux élevé d'IgE.

Le second point frappant, et peut-être le plus important sous l'angle de l'immunostimulation, est le "creux" formé dans toutes les courbes entre le 50ème et le 90ème jour environ, avec la remontée temporaire des IgE aux alentours du 100ème jour. Il nous semble que l'effet adjuvant se marque davantage sur la durée de cette déflation que sur le taux d'IgE obtenu au point maximum autour du 30ème - 40ème jour (cf. courbes 41 et 42 par rapport à la courbe témoin 39). Le problème est de savoir à quoi correspond ce creux. Il est tentant de penser qu'il est produit par la "consommation" des IgE par les antigènes parasitaires mis en circulation principalement lors du rejet des vers, et donc la formation d'immunocomplexes. Ceux-ci, s'ils circulent dans le sérum, ne sont pas dosés par la technique utilisée, ou bien, sont bloqués ou éliminés dans quelque organe du rat. La remontée des IgE serait alors produite par la diminution puis la cessation de la libération des antigènes parasitaires, suivies peu après de la fin de la synthèse des IgE elles-mêmes.

Dans ce cas, la production réelle d'IgE en présence des divers immunostimulants utilisés, correspondrait à des courbes sans ce creux, telles qu'on peut les imaginer en poursuivant fictivement la courbe de montée pour rejoindre le second pic de fin de synthèse. L'importance du creux serait donc directement proportionnel à l'abondance des immunocomplexes formés, lesquels semblent jouer un rôle majeur dans l'armement des macrophages dans la période d'immunité à la réinfection.

Une objection importante s'oppose cependant à cette explication de la chute temporaire du taux d'IgE : c'est que ces courbes sont celles des IgE globales et non celles des IgE spécifiquement antiparasitaires.

4) Notons également la baisse systématique des IgE circulantes entre le jour de l'infestation et le 10<sup>ème</sup> jour, parfois même le 20<sup>ème</sup> jour.

En faisant abstraction de l'objection sur la nature des IgE dosées dans ce système, l'hypothèse la plus simple serait la complexation des IgE existantes avec les premiers antigènes libérés par les larves détruites dans la peau ou les poumons dans les premiers jours de l'infection. Mais là encore nous n'avons aucun argument expérimental pour étayer cette supposition.

5) Enfin, nous avons été très étonnés par la cinétique sur 200 jours des animaux stimulés par le LPS (fig. 45), avec le retour du taux des IgE au niveau initial entre le 130 et le 140<sup>ème</sup> jour, suivi d'une remontée, apparemment persistante, de quelques semaines. Les rats témoins et stimulés de cette expérience vivaient dans des cages séparées, par groupes de cinq animaux. Nous n'avons malheureusement pas disposé dans cette expérience de témoins supplémentaires non infestés qui nous auraient permis de déterminer si cette soudaine élévation du taux des IgE globales était due à une infection parasitaire contractée dans l'animalerie par l'ensemble des rats de cette série, ou s'il s'agit d'une évolution normale du taux de ces anticorps dans l'infection bilharzienne.

En conclusion, il nous semble nécessaire d'élucider la nature de la stimulation antigénique responsable de l'initiation de la synthèse des IgE spécifiques et globales, pour pouvoir déterminer la forme d'immunostimulation par adjuvant, la plus adaptée au but à atteindre, qui est la vaccination antibilharzienne sans parasitose, réalisée au moyen du ou des antigènes à IgE correctement potentialisés.

Toutefois, l'apport principal de cette série d'expériences de stimulation nous paraît être la prolongation de la durée de synthèse des IgE, qu'il serait intéressant de faire corrélérer, chez ces animaux, avec la durée précise de l'immunité à la réinfestation.

Si la stimulation des IgE dans le cours de l'infection parasitaire est un élément important, le mécanisme d'application de ces immunoglobulines est un facteur tout aussi intéressant. C'est pourquoi, nous avons utilisé les sérums obtenus dans ces diverses expériences d'immunostimulation pour provoquer l'enrobage des larves du parasite par des macrophages normaux et mesurer par un test de radiomarquage au chrome le niveau de cytotoxicité des cellules sensibilisées par les IgE.

## II - ARMEMENT DES MACROPHAGES CONTRE LES SCHISTOSOMULES

En 1974<sup>69</sup> et 1975<sup>70-1</sup>, CAPRON et coll. ont décrit le phénomène de l'enrobage in vitro des schistosomules de S. mansoni par des macrophages normaux de rats, préalablement incubés dans du sérum provenant de rats syngéniques infestés. L'adhérence des cellules péritonéales aux schistosomules est suivie d'une forte mortalité de ces derniers en moins de 24 heures (planche IV).

Ces auteurs ont démontré le rôle des IgE dans ce mécanisme où interviennent également les antigènes parasitaires, lesquels circulent dans le sang des rats parasités à partir du 20<sup>ème</sup> jour environ après l'infestation.



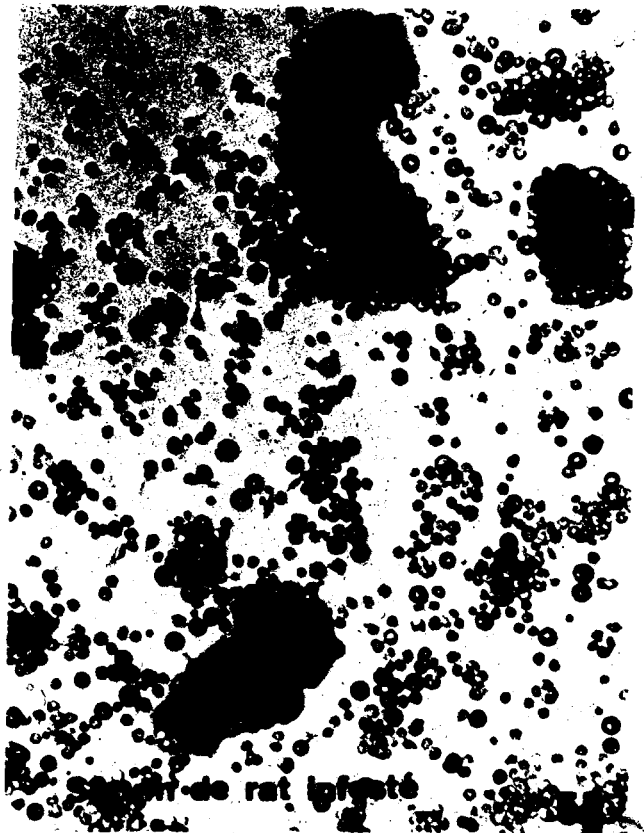
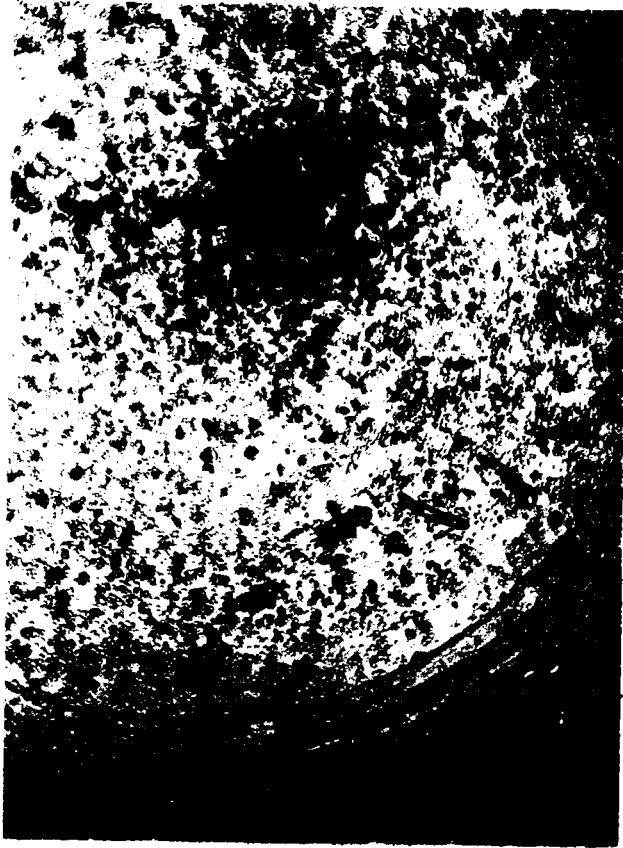


PLANCHE IV



Nous avons cherché à quantifier l'effet cytotoxique des macrophages sur les schistosomules en marquant les larves par du chrome 51 radioactif. Dans ce système, les protéines cellulaires fixent le chrome, qui n'est relargué à l'extérieur des cellules, dans les conditions physiologiques normales, qu'à un taux très faible, correspondant au catabolisme des protéines et à la régénération tissulaire du parasite. Lorsque, pour une raison quelconque, les cellules sont lésées et qu'une fracture se produit dans leur membrane, les protéines, marquées, sont libérées dans le milieu dont la radioactivité augmente en proportion des dommages cellulaires subis. Le relargage spécifiquement dû à la cytotoxicité est situé entre une limite inférieure, qui est celle du relargage physiologique spontané et une limite supérieure, déterminée par le relargage maximum qu'il est possible d'obtenir, étant donné qu'une partie du chrome reste définitivement fixé sur des structures insolubles, non diffusibles, des cellules parasitaires.

Par ce moyen, nous avons testé :

- a) des macrophages de rat, activés in vivo par les divers agents immunostimulants décrits précédemment : IPM, AgR, WSA, Muramyl-dipeptide, LPS et lipoprotéine de kyste hydatique ;
- b) des macrophages de rats normaux, préalablement armés in vitro par les IgE contenues dans le sérum de rats infestés ;
- c) des macrophages de rat, activés in vivo par l'IPM ou l'AgR, puis armés in vitro par incubation dans du sérum de rats infestés.

#### A) Techniques et Méthodes

##### 1) Marquage des schistosomules

Les schistosomules sont obtenus par la technique de STIREWALT et coll. (1966)<sup>369</sup> modifiée par CLEGG et SMITHERS (1972)<sup>82</sup>, qui utilisent le passage de cercaires, fraîchement émises par les mollusques, à travers une peau dégraissée de souris, découpée sur la face ventrale et tendue sur un tube rempli de milieu de culture maintenu à 37°C (M. CAPRON, 1974)<sup>74</sup>.

Le marquage de 2000 schistosomules environ par expérience est réalisé par leur incubation dans 100  $\mu$ Ci de  $^{51}$ Chromate de sodium pendant 14 heures à 37°, en milieu HLEG contenant 1 % de sérum de veau foetal décomplémenté (cf. pages techniques 198).

## 2) Contact schistosomules-macrophages activés in vivo

Les macrophages de rat, activés in vivo, sont prélevés, après 7 jours de stimulation, par lavage péritonéal avec du MEM hépariné, selon le protocole décrit pour les dosages enzymatiques des macrophages stimulés (p 111).

Les cellules sont mises en culture dans les alvéoles à fond plat de plaques de Terasaki (volume utile 0,2 ml), à raison de 500 000 macrophages par alvéole. Les macrophages diversement stimulés sont disposés dans les plaques de façon à regrouper 4 à 8 alvéoles de contenu identique.

Après 2 heures de préculture, les alvéoles sont lavés avec du milieu MEM+ (voir composition p. 111) afin d'éliminer les cellules non adhérentes.

Les schistosomules marqués au  $^{51}$ Cr sont alors ajoutés, en suspension dans le même milieu de culture, à la concentration de 50 larves par 0,1 ml déposé à la pipette automatique. Quatre à huit alvéoles sans macrophages sont remplis par la suspension de schistosomules pour obtenir un relargage spontané des larves pendant la durée de l'expérience.

Les cultures sont poursuivies 16 heures. A la fin du contact macrophages-schistosomules, 0,1 ml du surnageant de chaque alvéole (soit la moitié de leur volume) est délicatement prélevé à la pipette automatique et déposé dans un tube "surnageant", en groupant les alvéoles de même contenu, par deux. Le reste est prélevé et déposé dans un tube "culot" qui reçoit en outre le rinçage de chaque alvéole par 0,2 ml de Triton X100 à 1 %. Tous les tubes sont complétés à 1 ml par de l'eau distillée pour uniformiser les volumes et homogénéiser ainsi les conditions de comptage du rayonnement gamma dans le spectrophotomètre.

Calculs : le résultat du tube "surnageant" est multiplié par deux pour obtenir le chrome relargué par la culture, et exprimé en pour cent de la radioactivité totale, obtenue par addition des radioactivités du tube "surnageant" et du tube "culot".

$$\% \text{ Cr relargué} = \frac{\text{Tube "surnageant"} \times 2 \times 100}{\text{Tube "surnageant"} + \text{tube "culot"}}$$

Si l'on désire connaître le chrome relargable et le chrome définitivement fixé, il est possible de réaliser, après la lyse des schistosomules par le Triton dans les tubes "culots", une centrifugation qui permet la séparation d'un surnageant contenant le chrome relargable (auquel on ajoute le chrome du tube "surnageant") et d'un culot contenant le chrome non relargable. On peut alors exprimer le chrome relargué en pour cent du chrome relargable. Cette forme de résultat, cependant, n'ajoute rien aux expérimentations, car le chrome fixé définitivement représente toujours le même pourcentage (15 à 20 %) de la radioactivité totale ; si bien que la manipulation supplémentaire que nécessite l'obtention de ce paramètre n'est pas compensée par une amélioration sensible des résultats.

### 3) Armement des macrophages in vitro

Les macrophages péritonéaux normaux, comme les macrophages activés in vivo pendant 7 jours, peuvent être armés in vitro par le sérum de rats infestés.

Les cellules sont prélevées et mises en culture, comme ci-dessus, en plaques de Terasaki.

Après 2 heures de fixation des cellules adhérentes, les alvéoles sont lavés et le milieu MEM+ est renouvelé pour une culture de 16 heures.

Les milieux sont alors remplacés par les milieux enrichis avec les sérums de rat à tester, à la concentration de 10 %. Les mêmes milieux sont déposés dans des alvéoles sans macrophages pour servir de témoins du relargage spontané du chrome par les schistosomules.

Les incubations sont poursuivies pendant 7 heures, délai pendant lequel les macrophages, placés dans le milieu adéquat, subissent leur "armement".

Au moment de l'addition des larves de schistosomes, les alvéoles sont vidés de 0,1 ml (soit la moitié de leur contenu) à la pipette automatique, et ce volume est exactement remplacé, avec la même pipette, par les schistosomules marqués en suspension dans du MEM+, à raison d'une centaine de larves par 0,1 ml de milieu.

Le contact schistosomules-macrophages armés est maintenu pendant 16 heures.

Récupération des milieux : les milieux de culture sont récupérés, soit selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent, soit selon le protocole qui assure une plus grande sécurité dans la séparation du surnageant acellulaire et des larves marquées, mais qui introduit une manipulation supplémentaire des larves, avec le risque d'en lyser un certain nombre et de fausser ainsi les résultats du relargage spécifique.

Dans cette seconde technique, où les alvéoles sont regroupés par paires de même contenu, comme précédemment, la totalité du volume des alvéoles est récupérée en tubes à hémolyse (soit 2 x 0,2 ml). On ajoute 1,6 ml de milieu de culture tamponné à l'HEPES (cf. pages techniques 198). Les deux ml ainsi constitués sont agités doucement pour homogénéiser le chrome relargué sans léser les schistosomules. Les tubes sont laissés en décantation pendant 5 mn, puis centrifugés 1 mn à 500 t/mn.

On prélève alors dans la partie supérieure du surnageant 1 ml qui est déposé dans le tube "surnageant". Les alvéoles sont rincés avec 0,2 ml de Triton à 1 %, les liquides de rinçage sont ajoutés dans les tubes contenant les culots correspondants. Ceux-ci sont alors agités et peuvent, comme précédemment, être comptés tels quels ou divisés en chrome non relargable et en chrome relargable par une centrifugation supplémentaire.

Les calculs sont effectués de la même façon par multiplication par 2 des tubes "surnageants", exprimés en pour cent de la radioactivité totale et/ou de la radioactivité relargable.

B) Résultats

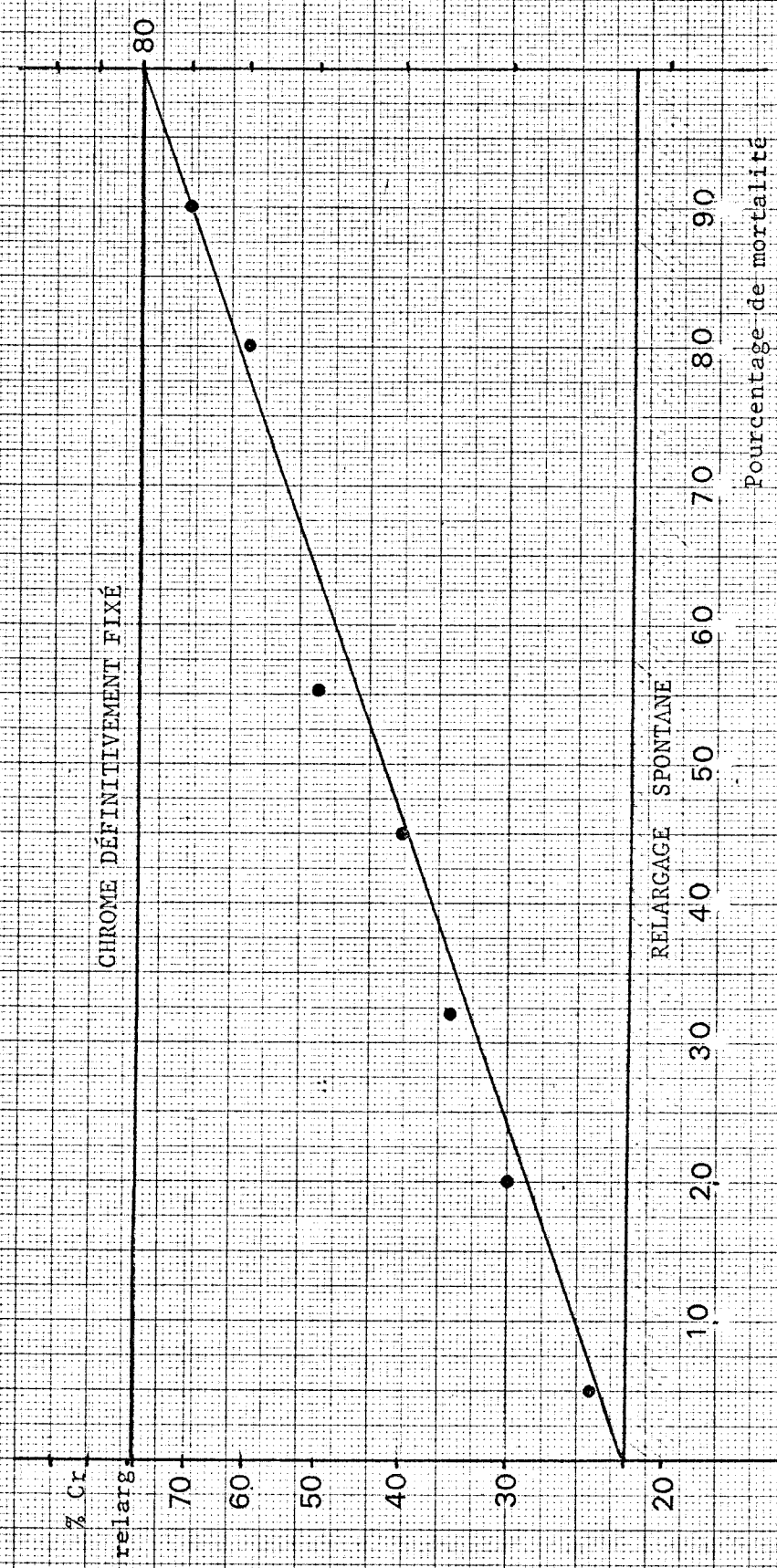
Lors des premières expériences, nous avons établi la corrélation entre le relargage de chrome et la mortalité des schistosomules dont les résultats se sont montrés bien reproductibles. Nous avons obtenu les rapports reproduits sur le tableau 57, linéaires sur un papier semi-logarithmique (courbe 56).

Chrome relargué	Mortalité	:	Chrome relargué	Mortalité
20 %	0 %	:	50 %	55 %
30 %	15 à 25 %	:	60 %	80 %
35 %	25 à 35 %	:	70 %	90 %
40 %	45 %	:	70 à 80 %	100 %

Tableau 57 : Corrélation entre chrome relargué et mortalité des schistosomules, établie sur les résultats de 16 heures de culture dans diverses conditions.

Le relargage spontané dans le milieu de culture seul (MEM+) pendant les 16 heures de l'expérience varie de 22 à 26 % (environ 4 % de mortalité). La présence de macrophages normaux dans ce même milieu de culture fait monter le relargage "spontané" entre 26 et 30 % et correspond à une mortalité de 15 à 25 %.

Le chrome définitivement fixé sur les structures insolubles, non diffusibles des schistosomules représente une vingtaine de pour cent de la radioactivité totale.



**FIGURE 57 :** Rapport entre relargage de chrome (en % de la radioactivité totale) et mortalité des schistosomules, dans le système macrophages armés ou activés et schistosomules marqués au chrome 51.



RELARGAGE DE CHROME PAR DES SCHISTOSOMULES CULTIVES  
IN VITRO EN PRESENCE DE MACROPHAGES STIMULES IN VIVO

	Relargage spontané	Eau physiol.	2 µg	20 µg	200 µg	2000 µg
LPS	26,3% <sup>±</sup> 0,7	29,3% <sup>±</sup> 0,7	36,1% <sup>±</sup> 1,5	35,2% <sup>±</sup> 2,5	43,7% <sup>±</sup> 8	36,7% <sup>±</sup> 3
IPM	26,2% <sup>±</sup> 0,5	30,0% <sup>±</sup> 1	31,9% <sup>±</sup> 4	34,6% <sup>±</sup> 4	43,9% <sup>±</sup> 8	43,0% <sup>±</sup> 9
WSA	24,8% <sup>±</sup> 0,8	26,1% <sup>±</sup> 0,9	32,6% <sup>±</sup> 3,6	29,9% <sup>±</sup> 5	33,9% <sup>±</sup> 5	32,8% <sup>±</sup> 4
Muramyl dipept.	22,1% <sup>±</sup> 0,5	25,5% <sup>±</sup> 1	27,0% <sup>±</sup> 3,2	28,9% <sup>±</sup> 1,5	27,9% <sup>±</sup> 2	32,1% <sup>±</sup> 3,4
LP	25,3% <sup>±</sup> 1	29,9% <sup>±</sup> 0,9	30,8% <sup>±</sup> 1,4	31,9% <sup>±</sup> 1	29,2% <sup>±</sup> 2,8	29,5% <sup>±</sup> 3,1
AgR	25,6% <sup>±</sup> 0,6	26,8% <sup>±</sup> 0,8	25,0% <sup>±</sup> 1,1	30,8% <sup>±</sup> 2	27,7% <sup>±</sup> 2,5	26,5% <sup>±</sup> 4

Tableau 58 : Chrome relargué par des schistosomules cultivés in vitro pendant 16 heures avec des macrophages péritonéaux de rats HOODED LISTER stimulés 7 jours in vivo avec de l'eau physiologique et diverses quantités d'immunostimulants. Le relargage spontané représente le chrome libéré par les larves dans le milieu de culture seul, sans macrophages. Les résultats sont en pour cent de la radioactivité totale dans chaque culture et représentent la moyenne arithmétique <sup>±</sup> un écart type, de deux expériences par substance testée, à raison de 8 alvéoles par concentration et par expérience.



### 1) Macrophages immunostimulés in vivo

La stimulation des macrophages in vivo détermine une activité cytotoxique in vitro d'inégale intensité selon les agents employés (Tableau 58), comme cela était apparu dans l'activation enzymatique.

Dans l'ensemble, la cytotoxicité, révélée par le relargage de chrome, est limitée, chez les macrophages uniquement stimulés in vivo.

Le muramyl-dipeptide ne développe qu'une très faible cytotoxicité à la concentration la plus élevée utilisée dans cette expérience (32 % de relargage de chrome contre 25,5 % en présence de macrophages traités à l'eau physiologique).

De même, le WSA, la lipoprotéine et l'AgR ne dépassent pas 31 à 34 % de relargage de chrome aux concentrations optimum d'immunostimulant (200 µg pour le WSA, 20 µg pour la LP et 20 µg pour l'AgR).

Le LPS et l'IPM entraînent toutefois une cytotoxicité plus importante, qui atteint près de 44 % de relargage de chrome à 200 µg. Le LPS à 2 mg est moins stimulant qu'à 200 µg sans doute par un effet de toxicité cellulaire au niveau des macrophages.

### 2) Armement in vitro par les IgE

Les macrophages normaux préincubés dans du sérum sain donnent un relargage de chrome compris entre 31 % et 35 %. Une préincubation dans le sérum d'un rat infesté déclenche une forte cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules qui libèrent dans le milieu de 58 % à 63 % de leur chrome au bout de 16 heures de contact selon la richesse du milieu en IgE. (Tableau 59).

Nous avons réalisé une cinétique de l'armement des macrophages avec les sérums prélevés à des temps variables après l'infestation : le sérum de 10 jours et celui de 20 jours ont une activité encore faible à l'égard des macrophages (38 % et 45 % de relargage respectivement). En revanche à partir de 30 jours et jusqu'à 200 jours, la capacité d'armement des sérums permet aux macrophages d'entraîner des relargages de chrome avoisinant 60 %, alors même que le taux des IgE globales dosées dans les sérums de 200 jours utilisés était revenu à 0,2 µg/ml (Tableau 60).

	Nombre de schistosomes	Mortalité à 16 h	Pourcentage de morts	Chrome relargué (cpm)	Chrome total (cpm)	Chrome relargué en % du chrome total
MACROPHAGES de rat sain + SERUM de rat SAIN	120	28	23 %	178	580	30,69 %
	115	34	30 %	157	482	32,57 %
	91	25	27 %	198	624	31,73 %
	97	31	32 %	204	580	35,17 %
	Pourcentage moyen :		28 %	Pourcentage moyen :		32,54 %
MACROPHAGES de rat sain + SERUM DE RAT INFESTE	93	72	77 %	390	668	58,38 %
	105	85	81 %	440	708	62,15 %
	80	60	75 %	346	595	58,15 %
	110	88	80 %	432	689	62,70 %
	Pourcentage moyen :		78 %	Pourcentage moyen :		60,34 %
	t = 36,36		p < 0,001	t = 31,26		p < 0,001

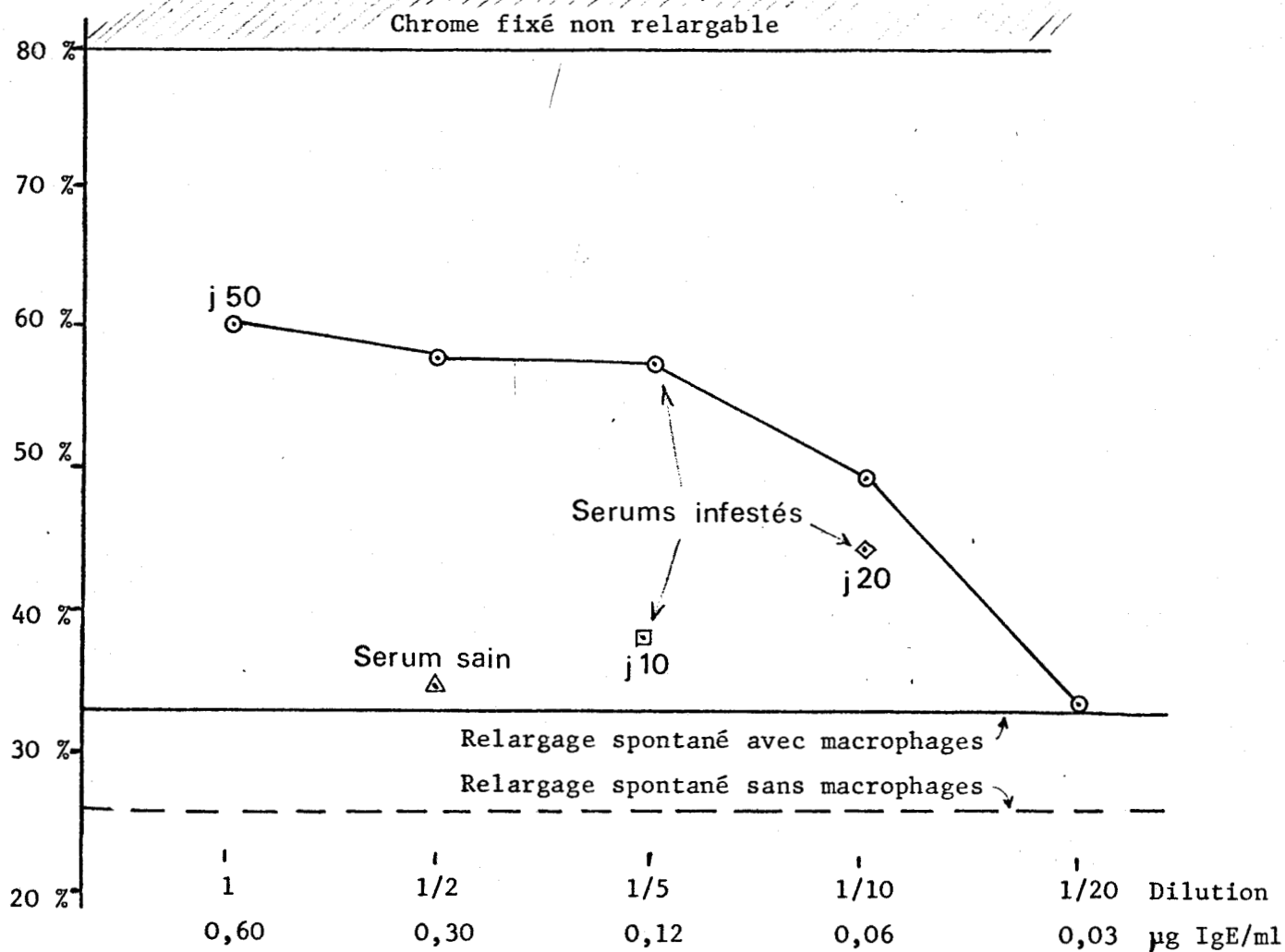
Tableau 59 : Effets comparés du sérum de rats Fisher sains et du sérum de rats Fisher infectés depuis 50 jours par Schistosoma mansoni, sur les macrophages péritonéaux d'un rat Fisher normal, cultivés en présence de schistosomes marqués au chrome 51.

Relargage spontané : 26,80 % sans macrophages ; 30,94 % avec macrophages.



SERUM de rats INFECTES							
( de rats : sains :	J0	J20	J30	J40	J50	J200	
( Chrome 51 : relargué : % Cr total :	34,7 % ± 1,25	38,1 % ± 3,10	44,9 % ± 3,28	61,0 % ± 2,65	58,4 % ± 2,84	60,2 % ± 3,28	59,0 % ± 4,12
		t=4,0974	t=6,6391	t=29,4717	t=21,6471	t=25,2678	t=13,3180
		p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
(Concentrat.: IgE totales: µg/ml :	0,25	0,13	0,07	0,31	1,34	0,63	0,16

Tableau 60 : Armement de macrophages péritonéaux de rat Fisher normal par les sérums de rats infestés par *S. mansoni*, prélevés à des temps variables après l'infestation.



**Figure 61** : Effet de la dilution d'un sérum de rat Fisher infesté depuis 50 jours (O), dosé à 63 µg/ml d'IgE totales, sur l'armement de macrophages normaux. En comparaison, sérum sain (Δ), et sérum des mêmes animaux 10 jours (□) et 20 jours (◇) après l'infestation, disposés sur la gamme des concentrations selon le dosage IgE TOT.

L'utilisation de dilutions d'un même sérum permet de suivre la diminution de l'armement des macrophages (Courbe 61) et démontre l'existence d'une saturation des cellules par les immunoglobulines puisqu'une dilution au 1/5 donne encore le même pourcentage de cytotoxicité que le sérum pur. D'autre part, l'utilisation de sérums de rats réinfestés, dont les taux en IgE globales atteignent 20 à 30 µg/ml, n'augmente pas considérablement le relargage de chrome, qui reste situé à 60 ou 62 % en 16 heures.

#### Effet du chauffage à 56°C

Le chauffage à 56°C des sérums infestés pendant 3 heures fait disparaître la capacité d'armement des macrophages qui présentent une cytotoxicité équivalente à celle du sérum sain (Tableau 52). Le chauffage du sérum pendant 30 mn, qui détruit le complément, diminue fortement l'activité cytotoxique des macrophages, mais celle-ci n'est pas rétablie par l'addition de complément frais (sérum de cobaye) (Tableau 63).

Une décomplémentation du sérum sans chauffage, par traitement à l'EDTA, a donné une légère diminution du relargage de chrome. Cependant l'effet cytotoxique est de même intensité que celui obtenu avec le sérum non traité à l'EDTA mais dilué dans les mêmes proportions (Tableau 64).

### 3) Activation in vivo et armement in vitro

En utilisant le système de culture des macrophages avec des schistosomules marqués au chrome 51, nous avons associé les deux phases de la stimulation : la stimulation in vivo par l'IPM et par l'AgR pendant 7 jours suivie de la stimulation in vitro par les IgE pendant 7 heures.

Les résultats de ces expériences figurent sur le Tableau 65.

Avec le sérum de rat sain, les immunostimulants utilisés augmentent de 20 % le relargage de chrome par rapport à celui obtenu avec les macrophages témoins "stimulés" à l'eau physiologique.

En revanche, l'intervention du sérum de rats infestés introduit une différence notable entre les immunostimulants : l'AgR à 200 µg et l'IPM à 2 mg diminuent l'effet d'armement des macrophages par le sérum riche en IgE, alors que l'IPM à 200 µg augmente de 5,5 % le relargage obtenu avec les macrophages témoins.

	Sérum de rat sain	Sérum de rat infecté	
	J0	J 50	J 200
Sérum non traité	34,7 %	60,2 %	59,0 %
Sérum chauffé 3h à 56°C	33,7 %	32,0 %	33,5 %

Tableau 62 : Thermolabilité du facteur d'armement des macrophages dans les sérums de rats infectés. Pourcentage de chrome relargué par rapport au chrome total.

	Sérum sain	Sérum de rat infecté		
		non traité	Chauffé 56° 30mn	Chauffé id. + complément
Milieu avec macrophages	29,73 %	56,73 %	20,75 %	43,54 %
Milieu sans macrophages	27,81 %	36,06 %	23,67 %	26,27 %

Tableau 63 : Rôle du complément dans la cytotoxicité. La décomplémentation par chauffage fournit des sérums peu actifs dans l'armement des macrophages. L'addition de complément frais de cobaye ne restitue pas la totalité de la cytotoxicité. Le relargage spontané en MEM+ est de 25,70 %.

	Sérum sain	Sérum infecté	Sérum EDTA	Sérum infecté dilué
Milieu avec macrophages	29,62 %	58,46 %	42,81 %	41,50 %
Milieu sans macrophages	27,07 %	36,90 %	36,09 %	32,23 %

Tableau 64 : Rôle du complément dans la cytotoxicité. La décomplémentation par l'EDTA donne un relargage de chrome du même ordre que le sérum non décomplémenté, mais dilué dans les mêmes conditions que le sérum traité.

( <u>in vitro</u> :	:	:
( (in vivo :	Sérum de rat sain	Sérum de rat infesté
( Macrophages	:	:
( +	34,9 % $\pm$ 1,3	55,4 + $\pm$ 4,8
( eau physiologique	:	:
( Macrophages	:	:
( +	41,8 % $\pm$ 2,2	48,4 % $\pm$ 2,9
( 200 $\mu$ g d'AgR	:	:
( Macrophages	:	:
( +	41,9 % $\pm$ 5,3	58,3 % $\pm$ 1,2
( 200 $\mu$ g d'IPM	:	:
( Macrophages	:	:
( +	42,2 % $\pm$ 4,7	44,2 % $\pm$ 1,5
( 2 000 $\mu$ g d'IPM	:	:

Tableau 65 : Chrome relargué par des schistosomules cultivés pendant 16 heures avec des macrophages stimulés 7 jours in vivo par divers immunostimulants, puis incubés 7 heures dans du sérum de rat sain ou infesté par S. mansoni.

Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale de chaque culture.



### C) Discussion

La technique de marquage des schistosomules par le chrome radioactif semble bien adaptée à l'exploration quantitative in vitro des mécanismes cytotoxiques dans la schistosomiase. Des dommages réduits de la structure superficielle des larves, insuffisants pour entraîner leur mort, peuvent être mis en évidence par cette méthode, ce qui explique la corrélation un peu lâche entre le relargage de chrome et la mortalité des schistosomules entre 20 et 35 % de libération de l'isotope. Dans cette zone de relargage, il est donc possible d'observer une légère activation des macrophages, insuffisante toutefois pour provoquer la mort de cibles aussi volumineuses que sont ces organismes pluricellulaires.

Le muramyl-dipeptide, le WSA et la lipoprotéine de kyste hydatique entrent dans cette catégorie des agents qui ne sont que légèrement stimulants pour la cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules.

Le LPS se révèle toxique à trop forte dose, mais déclenche une bonne stimulation à 200 µg, équivalente à celle obtenue avec la même quantité d'IPM.

L'AgR montre, à nouveau, dans ce type d'expérience, un effet de toxicité cellulaire : il présente une stimulation moindre à 200 µg qu'à 20 µg. Dans le cas de la double stimulation des macrophages par l'AgR à 200 µg et par les IgE, les immunoglobulines parviennent à un armement moins efficace des phagocytes que celui obtenu avec des macrophages non stimulés, soit par une perturbation de la physiologie cellulaire, soit par une modification de la fixation des IgE ou des immunocomplexes à IgE à la surface des cellules.

A ce sujet, l'expérience de dilution du sérum de rat infesté montre l'effet de saturation des récepteurs de surface des macrophages obtenu avec une dose massive d'IgE. Cette particularité limite l'efficacité d'une potentialisation des IgE, qui ne serait pas accompagnée d'une multiplication du nombre des macrophages mobilisables en cas de réinfection. Nous n'avons pas examiné cet aspect du problème dans ce travail. Le seul élément positif en ce sens est le nombre accru de macrophages récupérés dans les exudats péritonéaux des animaux stimulés, mais c'est un



effet habituel de l'injection d'une substance étrangère dans la cavité péritonéale. Il serait intéressant d'obtenir un accroissement du chemotactisme macrophagique au point de pénétration des cercaires ou au niveau des capillaires pulmonaires où est détruite la plus grande partie des larves, lorsque l'immunité à la réinfection s'installe.

Les tests de relargage de chrome rapportés ici confirment les observations de CAPRON et coll. (1975)<sup>71</sup> sur l'indépendance du mécanisme d'immunoadhérence vis-à-vis du complément. L'inactivation du complément, réalisée par chauffage, entraîne une importante destruction des IgE et par conséquent une diminution de l'armement des macrophages et du relargage de chrome. L'addition de complément frais de cobaye accroît d'un faible pourcentage le relargage de chrome, probablement par l'intervention des anticorps cytotoxiques dépendant du complément, présents dans les sérums de rats infestés.

Il n'en reste pas moins vrai que l'essentiel de l'activité cytotoxique révélée dans ces tests de relargage isotopique est dû aux immunoglobulines de type E.

En conclusion, la positivité des tests de cytotoxicité, obtenue avec des rats infestés depuis 200 jours, date à laquelle l'immunité à la réinfection a disparu, apporte une indication sur les limites des expériences in vitro dans l'exploration des processus physiologiques et prouve, une fois de plus, que les mécanismes in vivo sont soumis à d'autres influences que les quelques paramètres introduits dans l'expérimentation in vitro.

Nous avons accordé beaucoup de place à ce mécanisme de sensibilisation des macrophages par les IgE, alors que d'autres processus interviennent dans l'immunité acquise (autres cellules que les macrophages, autres classes d'immunoglobulines que les IgE). Néanmoins, le phénomène d'activation des macrophages par les anticorps réaginique demeure un modèle extrêmement séduisant de mécanisme cellulaire anti-parasitaire et mérite d'être recherché in vivo, ce à quoi nous pourrions nous attacher ultérieurement.

COMMENTAIRES GENERAUX

Au delà de l'intérêt immédiat ou à court terme des travaux consacrés à l'immunologie parasitaire, le but des recherches sur la schistosomiase est la mise au point et le développement d'une "vaccination" humaine. Le problème qui se pose est donc de déterminer les moyens de parvenir à une immunité protectrice efficace vis-à-vis du parasite.

L'immunité antibactérienne et l'immunité dirigée contre les parasites pluricellulaires se distinguent particulièrement par la taille des cibles auxquelles est confronté l'appareil immunitaire du sujet infecté. Dans le cas des bactéries, la cible est à l'échelle des cellules phagocytaires et des cellules immunocompétentes, et si les composants humoraux jouent un rôle certain dans ce cas, il n'est sans doute pas absolument nécessaire que le taux d'immunoglobulines spécifiques du germe infectieux soit très élevé pour que l'organisme puisse vaincre l'agent pathogène.

En revanche, dans le cas des parasites pluricellulaires, la taille des larves infestantes à elle seule, indépendamment d'éventuels mécanismes plus spécifiques, nécessite une collaboration plus importante entre les anticorps et les cellules immunitaires pour parvenir à tuer le parasite avant qu'il ne devienne insensible aux défenses de son hôte.

Les espèces animales présentent une grande variété dans la résistance naturelle aux infections par un parasite donné. Il y a sans doute d'intéressants renseignements à obtenir des animaux naturellement résistants à S. mansoni. Ces sujets devraient permettre la mise en lumière des mécanismes par lesquels ils s'opposent victorieusement à l'infection. On sait que, dans certains cas, c'est déjà au niveau de la pénétration transcutanée que le parasite est tenu en échec (LEWERT et MANDLOWITZ, 1963)<sup>235</sup>. Dans d'autres cas, c'est plus tardivement, par une destruction des schistosomules, que ces animaux résistent à l'infection (VON LICHTENBERG et coll., 1962)<sup>395</sup>. Tout en restant conscients de l'origine génétique de ces différences de comportement, il y a certainement dans ces modèles d'utiles enseignements à tirer. Ce serait là le mécanisme protecteur le plus efficace pour une vaccination humaine. Il n'est pas impossible que l'on puisse y parvenir.

Il existe cependant une deuxième voie d'approche.

Si le rat, avec son mécanisme d'expulsion spontanée constitue un modèle apparemment très éloigné du comportement de l'organisme humain vis-à-vis de l'infection bilharzienne, il n'en reste pas moins vrai que l'on peut envisager une "vaccination" qui, tout en n'évitant pas la première infection, permette au sujet humain parasité d'expulser ses vers et de développer, comme le rat, une immunité à la réinfection. Sous cet angle, le rat retrouve tout son intérêt.

Une troisième possibilité se fait jour, qui constituerait une véritable vaccination, c'est celle de parvenir à développer cette résistance à l'infection par l'immunisation à l'aide d'antigènes extraits ou produits par le parasite. Cette voie qui obtient ses premiers succès expérimentaux pourrait déboucher, dans un avenir incertain, sur une prévention immunologique de la bilharziose.

La caractéristique principale de l'immunité à la réinfection, chez les hôtes qui en développent une, est d'être temporaire (à l'exception peut-être du singe Rhésus chez qui elle semble définitive). Chez le rat, elle ne dure qu'autant que subsistent quelques vers vivants. Lorsque ce reliquat de parasites disparaît ou tombe en dessous d'un certain taux, ce qui se produit vers la 12<sup>ème</sup> ou 14<sup>ème</sup> semaine après le début de l'infection, le système immunitaire de l'hôte n'est plus stimulé suffisamment pour entretenir les défenses à un niveau efficace. Il est probable que la stimulation est maintenue par les antigènes métaboliques ou les antigènes de lyse, et, qu'en dessous d'une certaine concentration, elle devient trop faible et aboutit à l'arrêt de la synthèse des anticorps.

Le problème qui se pose est donc de prolonger cet état de protection temporaire, par exemple en permettant la survie d'un nombre de vers suffisants pour entretenir l'immunité, et en déclenchant simultanément un mécanisme d'inhibition de ponte destiné à éviter les effets néfastes du blocage des oeufs dans les tissus de l'hôte.

Dans ce contexte, notre travail de stimulation des défenses immunitaires s'inscrit à deux niveaux :

- 1) Tout d'abord, au niveau du renforcement des activités spécifiques des cellules impliquées dans les mécanismes immunitaires contre la schistosomiase, dans la mesure où existe dans l'organisme agressé un taux suffisant d'anticorps actifs, la stimulation des cellules accroît leurs effets cytotoxiques. Nous en avons apporté des exemples avec l'IPM, en particulier, qui s'est révélé à ce titre un bon stimulant, soit seul (son injection intrapéritonéale fournit des macrophages plus actifs que des macrophages normaux sur le relargage de chrome radioactif par des schistosomules exposés à leur action), soit en association avec une sensibilisation par des immunoglobulines E (les macrophages activés par l'IPM, puis sensibilisés par du sérum de rat parasité, sont plus efficaces sur les larves que les macrophages normaux, uniquement sensibilisés par les IgE).
  
- 2) Le second point d'application de notre étude s'est attaché à la stimulation de la synthèse des immunoglobulines indispensables, semble-t-il, à une pleine expression des mécanismes cellulaires. Expérimentalement, cette immunostimulation peut intervenir soit au début d'une première infection, lorsque les antigènes parasitaires inducteurs d'une réponse immune sont libérés dans la circulation, afin d'accélérer la réponse humorale, augmenter son amplitude et, peut-être, orienter sa nature, soit après l'expulsion des vers adultes pour tirer un parti maximum du très faible taux d'antigènes résiduels lorsque la population infestante est presque totalement éliminée.

La gamme des substances choisies dans cette étude a volontairement été restreinte pour permettre de juger l'utilité de l'évaluation de quelques-uns des paramètres cellulaires et humoraux qui interviennent dans les mécanismes immunitaires antibilharziens.

\*  
\* \*

Dans la partie de notre travail qui concerne la stimulation des cellules effectrices de l'immunité contre S. mansoni, et plus précisément des macrophages, il apparaît que l'exocytose spécifique des hydrolases lysosomiales semble, sinon un support de la cytotoxicité, du moins le signe d'une activation métabolique intense, débouchant sur une toxicité accrue lorsque les macrophages entrent en contact avec une cible. C'est ce

que révèlent l'IPM et, à moindre degré, l'AgR et le LPS.

In vitro, l'AgR mycobactérien à 12 µg/ml et le LPS à 1,2 µg/ml donnent un relargage spécifique de la bêta-glucuronidase, voisin de 10 % de l'activité totale de cette enzyme. Mais ces substances sont toxiques aux concentrations supérieures, alors que l'IMP parvient à susciter le relargage spécifique de 64 % de cette hydrolase à 120 µg/ml.

L'activité cytotoxique des cellules stimulées in vivo par ces mêmes substances est diminuée avec les fortes concentrations d'AgR et de LPS, alors qu'avec l'IPM, si la dose la plus élevée (2 mg) ne se révèle pas plus stimulante que la dose moyenne de 200 µg, elle n'entraîne pas de chute de la cytotoxicité des cellules phagocytaires vis-à-vis des schistosomules, telle qu'elle est mesurée par le chrome relargué. Il y a donc un parallélisme entre l'effet stimulant in vitro et la cytotoxicité induite in vivo par ces substances.

Il semble toutefois que cette activation métabolique des cellules du système réticulo-endothélial soit transitoire et ne persiste pas longtemps après l'élimination catabolique de l'agent inducteur. Ce caractère plutôt négatif de l'immunostimulation des macrophages est probablement compensé par les mécanismes d'activation spécifiques et non spécifiques de ces cellules au moyen des facteurs sécrétés par les lymphocytes immunocompétents au moment d'un contact avec les antigènes auxquels ils sont sensibles. A ce titre, comme l'ont suggéré CAPRON et DESSAINT (1975)<sup>73</sup>, l'IgE pourrait être considérée comme un produit indirect de la réaction immune des lymphocytes immunocompétents, dans la mesure où la synthèse des IgE est sous la dépendance des lymphocytes thymodépendants entrant en contact avec les antigènes du parasite.

Dans cette optique, les IgE amèneraient les macrophages d'une manière assez analogue aux facteurs spécifiques d'armement (SMAF), l'activation proprement dite ne se déclenchant qu'au moment de la rencontre des macrophages avec leur cible.

Dans cette conception du rôle des immunoglobulines, il nous a paru intéressant de stimuler l'immunité humorale au cours de la schistosomiase. C'est l'objet de la seconde partie de nos résultats, plus spécialement centrés sur l'immunostimulation des IgE.

De fait, la stimulation des animaux au début de l'infection expérimentale par S. mansoni provoque un net accroissement du taux d'anticorps par rapport aux témoins. De plus, nous avons noté un allongement de la durée de la synthèse de ces immunoglobulines chez les rats convenablement stimulés (AgR mycobactérien, lipoprotéine de kyste hydatique, et même hydroxyde d'alumine). Ce caractère constitue-t-il un effet de la stimulation initiale (par la simple prolifération des lymphocytes sécréteurs d'IgE dans les trois premières semaines d'infection), ou bien un effet retardé de l'adjuvant lorsque sont libérées les dernières molécules antigéniques par les vers résiduels ? Nos conditions expérimentales ne peuvent le préciser.

De même, nous n'avons pas étudié la durée exacte de l'immunité à la réinfection chez les animaux immunostimulés. Cet élément nous aurait permis de savoir si l'augmentation du taux sérique en IgE s'accompagne ou non d'une prolongation de la phase immunitaire.

Le taux en IgE obtenu chez des animaux infectés une seconde fois, lorsque théoriquement ils ne sont plus immuns, semble proportionnel au taux maximum atteint lors de la première infestation. La concentration est approximativement décuplée. Ce résultat peut correspondre à un effet de prolifération des cellules-mémoires de l'immunité humorale sous l'action de l'adjuvant initialement injecté.

Il nous paraît important de remarquer qu'un fort taux d'IgE, indépendamment des conséquences éventuellement néfastes de réactions anaphylactiques trop intenses, est inutile s'il n'y a pas une augmentation concomitante du nombre des macrophages : c'est ce que montre l'effet de saturation des macrophages observé in vitro avec des doses croissantes d'IgE. Il conviendrait donc, in vivo, d'augmenter le nombre de macrophages disponibles, soit globalement, soit au site de pénétration des larves de réinfection (par une potentialisation des phénomènes de chemotactisme par exemple).

Il ne faut pas oublier, en outre, tout d'abord que le mécanisme d'immunoadhérence des macrophages n'a jusqu'ici été décrit qu'in vitro et que pour l'instant rien ne prouve sa réalité in vivo ; et ensuite, que ce n'est pas le seul mécanisme, associant des anticorps et des cellules qui montre une toxicité vis-à-vis des schistosomules.

Il n'en reste pas moins vrai que les sérums qui permettent l'immunoadhérence proviennent de rats qui sont en train de développer une immunité à la réinfection, et que le maximum d'activité de ces sérums est atteint, chez le rat Fisher, vers le 40ème jour, c'est-à-dire à une époque qui ne correspond pas au maximum d'immunité acquise, mais au maximum d'IgE globales dosées.

A partir du 20ème jour, les antigènes parasitaires provenant de la lyse des vers sont massivement libérés et forment probablement des immunocomplexes avec les IgE nouvellement synthétisées. Nous ne savons pas si les IgE dosées aux environs du 40ème jour d'infestation comportent un maximum d'immunocomplexes. Rien en tout cas dans la technique radioimmunologique ne s'oppose à leur dosage. La chute des courbes que nous observons dans les dosages d'IgE après cette date est <sup>un</sup> argument en faveur d'une élimination ou d'une fixation de ces complexes en un point ou l'autre de l'organisme ou de leur séquestration sur des cellules (monocytes, macrophages ?).

Dans l'immunoadhérence des macrophages aux larves, nous avons été frappés par le fait qu'après 16 heures, certains schistosomules ne sont pas du tout enrobés de cellules phagocytaires (il s'agit systématiquement d'individus vivants), alors qu'à côté d'eux des larves sont enveloppées d'énormes amas de macrophages (Photo 53, planche 4). L'observation microscopique montre que si la plupart des schistosomules ainsi enrobés ne bougent plus et sont probablement morts, certains sont encore animés de mouvements de contraction sous leur carapace de cellules phagocytaires. Ce point pose le problème de la spécificité du mécanisme d'immunoadhérence et de son support si cette spécificité existe. Car il est possible que les macrophages n'adhèrent aux larves que si celles-ci sont préalablement endommagées par des immunoglobulines cytotoxiques agissant avec du complément.

Rappelons à ce propos que le sérum de rat infesté, chauffé pour décomplémentation, puis recomplémenté par du sérum frais de cobaye, donne un relargage de chrome, par les schistosomules marqués, plus important que du sérum de rat sain soumis au même traitement (tableau 63, p. 162). Ce qui prouve l'intervention de facteurs humoraux dépendant du complément dans le sérum des animaux parasités (et parmi eux, bien sûr, l'anticorps léthal IgG).

Les organismes parasités sont soumis aux interférences multiples des divers mécanismes immuns, humoraux et cellulaires, ayant pour inducteurs les antigènes libérés par l'agent infectieux. La réponse humorale est marquée par la production de plusieurs classes d'immunoglobulines aux fonctions diverses, pouvant avoir des propriétés cytotoxiques ou suppressives. En s'associant avec les antigènes, ces anticorps forment des complexes capables d'éviter ou au contraire de susciter des dommages immuns. Chaque antigène est susceptible de déclencher une réponse différente et parfois opposée aux autres.

La réponse cellulaire quant à elle fournit des cellules sensibilisées, porteuses d'activités positives aussi bien que suppressives. Plusieurs de ces réactions peuvent se produire simultanément. Et chaque hôte enfin réagit selon sa propre sensibilité à ces divers stimuli.

On voit l'extrême complexité des mécanismes immuns de la schistosomiase, parmi lesquels nous avons tenté d'éclairer une modeste partie.



### CONCLUSION

Notre but était de stimuler l'immunité à la réinfection dans la bilharziose expérimentale du rat, en potentialisant l'un ou l'autre mécanisme intervenant dans cette immunité.

Or, ces toutes dernières années, il est apparu que l'une des caractéristiques majeures des mécanismes immuns contre la schistosomiase est la collaboration, au moins démontrée in vitro, de plusieurs classes d'immunoglobulines avec diverses cellules, pour la destruction des larves de réinfection. Ces anticorps, par conséquent peuvent être considérés comme de véritables immunostimulines endogènes puisqu'elles sont capables de rendre cytotoxiques des cellules normales provenant d'animaux non parasités, et probablement aussi, bien entendu, les cellules propres du sujet infecté.

Il est possible de stimuler la production de ces immunoglobulines par l'action exogène d'immunostimulines variées. C'est essentiellement à cet aspect du problème que s'est attaché notre travail, en centrant son application sur la potentialisation des immunoglobulines de type E, responsables de la sensibilisation des macrophages et de leur cytotoxicité à l'encontre des schistosomules.

Choisissant parmi les très nombreuses substances connues pour leur activité adjuvante de l'immunité humorale, nous avons employé deux adjuvants mycobactériens : l'un glyco-peptidique, connu pour son effet puissant sur la réponse humorale (le WSA) ; l'autre isolé par nous de Mycobacterium smegmatis sous forme d'un protide de haut poids moléculaire (Antigène R), qui s'est également révélé être un bon adjuvant de la synthèse des anticorps. Les autres adjuvants utilisés (Bordetella pertussis, connu pour son effet de potentialisation des réagines ; les LPS de Salmonella typhi ; et une lipoprotéine du parasite Echinococcus granulosus) ne sont pas apparu aussi stimulants que les deux premiers.

Deux points mériteraient un complément de recherches dans le domaine de la stimulation des IgE

- 1) tout d'abord, le dosage des IgE spécifiques de S. mansoni dans les semaines qui suivent l'infestation immunostimulée ; nous nous sommes bornés au dosage des IgE globales (plus de 1300 sérums), qui permettent cependant de juger de l'efficacité des stimulations choisies ;
- 2) ensuite, il serait intéressant de vérifier si une augmentation du taux des IgE antiparasitaires s'accompagne ou non d'une prolongation de la phase d'immunité à la réinfection.

En ce qui concerne les mécanismes associant anticorps et cellules, nous avons apporté un élément quantitatif aux observations réalisées dans le laboratoire par CAPRON et coll., quant à la cytotoxicité des macrophages sensibilisés par les immuncomplexes à IgE vis-à-vis des schistosomulès.

Par l'utilisation de schistosomules marqués au chrome 51, il est possible de mettre en évidence une forte cytotoxicité des cellules phagocytaires incubées dans des sérums d'animaux infectés depuis 30 jours seulement. Ensuite, pendant plusieurs semaines, ces animaux présentent des sérums capables de sensibiliser les macrophages. En effet, le relargage du marqueur radioactif par les larves demeure important 200 jours après l'infestation, et l'enrobage par les macrophages est encore très marqué.

Il reste cependant à préciser de nombreux points dans ce phénomène d'immunoadhérence, parmi lesquels notons surtout la réalité in vivo du mécanisme décrit in vitro, et le processus de la sensibilisation des macrophages par les IgE ou les immuncomplexes à IgE.

Ayant stimulé l'élément humoral (IgE) du mécanisme d'immunoadhérence, nous avons essayé de compléter la potentialisation du processus par une activation des fonctions macrophagiques.

L'intervention de substances stimulantes (extraites de divers microorganismes), in vitro et in vivo, améliore temporairement la cytotoxicité des macrophages à l'égard des larves du parasite. Cet effet semble acquis par une activation des fonctions physiologiques propres de ces cellules (phagocytose, synthèse d'enzymes hydrolytiques). A ce titre, nous avons surtout remarqué l'effet intense de l'IPM (extrait microparticulaire de M. smegmatis) sur l'exocytose spécifique des enzymes lysosomiales des macrophages et sur la cytotoxicité de ces cellules à l'encontre des schistosomules.

De fait, la stimulation in vivo des phagocytes, par une injection intrapéritonéale d'IPM, renforce les défenses du rat au cours d'une infestation d'épreuve.

Sur ce chapitre, il reste également bien des inconnues, ne serait-ce que le délai de persistance de l'activation des macrophages après injection d'un immunostimulant in vivo, et, bien entendu, le mécanisme moléculaire de cette activation.

Il nous semble que l'apport de ce travail a été la mise au point de méthodes de quantification des paramètres cellulaires et humoraux au cours des immunisations expérimentales vis-à-vis de la schistosomiase lorsqu'interviennent des substances exogènes immunostimulantes. Partant de ces observations, nous devrions pouvoir axer principalement nos futures recherches sur les antigènes et les immunocomplexes responsables du développement de l'immunité à la réinfection dans la schistosomiase, et des immunostimulants les meilleurs pour le but recherché, c'est-à-dire, la protection de l'animal tout d'abord, et, espérons-le, de l'homme.

RESUME

L'immunité acquise dans la schistosomiase expérimentale du rat comporte un mécanisme de cytotoxicité, démontré in vitro, qui fait intervenir une immunoadhérence de macrophages sensibilisés par des immunoglobulines de type E (IgE) présentes dans le sérum d'animaux infectés.

Ce travail décrit la stimulation de ce processus, d'une part au niveau de la synthèse des IgE au cours d'une infection, et d'autre part au niveau des cellules phagocytaires qui participent à ce mécanisme.

La stimulation est réalisée grâce à divers immunostimulants dont l'un a été isolé de Mycobacterium smegmatis pour ce travail : l'antigène R.

Après une étude de ses propriétés antigéniques et physiologiques, cet antigène, qui se révèle un bon adjuvant de l'immunité humorale, a été injecté à des animaux simultanément soumis à une infection expérimentale par Schistosoma mansoni. Son action est comparée à celle obtenue par le "Water Soluble Adjuvant" de M. smegmatis, par une lipoprotéine du kyste hydatique, par le LPS de Salmonella typhosa et par le vaccin anticoquelucheux Bordetella pertussis, l'hydroxyde d'alumine servant de support à toutes ces substances. Les IgE sériques globales sont dosées, et la cinétique de leur taux montre que ces diverses substances augmentent, à des degrés variables, l'amplitude et la durée de synthèse de ces anticorps. Dans ce système, l'AgR présente une bonne stimulation.

La capacité de ces IgE à sensibiliser des macrophages normaux et à les rendre cytotoxiques vis-à-vis des larves du parasite est mesurée par le relargage de chrome 51 par des schistosomules marqués. Dès le 30<sup>ème</sup> jour de l'infection, les sérums permettent un relargage de chrome hautement significatif après 16 heures de contact entre macrophages sensibilisés et larves parasitaires.

Quant à l'activation des macrophages par les immunostimulants eux-mêmes, elle est mesurée d'une part au moyen du dosage des enzymes lysosomiales intra et extracellulaires, ces dernières augmentant en cas d'activation, et d'autre part sur le relargage de chrome radioactif par les larves soumises à l'action de ces cellules.

Ces résultats apportent un élément quantitatif dans la stimulation de la synthèse des immunoglobulines E et dans l'activation des cellules effectrices de l'immunité anti-bilharzienne.

ANNEXE TECHNIQUE

---

I - CULTURE BACTERIENNE ET OBTENTION DES ANTIGENES

Milieu liquide de SAUTON (WILLIS et CUMINGS, 1952)<sup>421</sup> p. 126

Asparagine	4 g
Acide citrique	2 g
Phosphate bipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Citrate de fer	0,05 g
Glycérol	48 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

Stérilisation 30 mn à 120°C

---

Cryobroyage (masses bactériennes supérieures à 10 g) (ROOS, 1970)<sup>325</sup>

Le cryobroyage est réalisé dans deux chambres de broyage ovoïdes en acier inoxydable, composées de deux parties hémisphériques que l'on peut fermer hermétiquement. Ces chambres sont fixées sur la tête de deux bielles animées d'un mouvement de va-et-vient par rotation d'un moulin.

Les chambres en acier reçoivent le matériel bactérien qui est congelé à -180°C par immersion des chambres dans l'azote liquide. Dans chaque enceinte, la rupture des microorganismes est assurée par trois billes d'acier, ajoutées après congélation et qui sont animées d'un mouvement ellipsoïdal à l'intérieur des chambres.

La masse bactérienne est placée dans l'une des chambres stérilisées. Après fermeture, l'on plonge 15 mn dans l'azote liquide. Lorsque la masse est congelée, on ajoute les billes. Les deux chambres de broyage sont fixées sur les bielles et l'on procède à un broyage de 15 mn. On décongèle ensuite jusqu'à 0°C sous un courant d'air chaud. Puis, le même cycle est recommencé. Les bactéries sont soumises à six reprises à un tel cycle de congélation, broyage et décongélation successives qui favorisent la rupture des Mycobactéries. La masse obtenue, rendue élastique par la libération des acides nucléiques, est homogénéisée dans un broyeur à couteaux Virtis avec un tampon Tris  $10^{-2}$  M-Mg Cl<sub>2</sub>  $10^{-2}$  M stérile, pH 7,4, réglé avec HCl.

Broyage à la zéolithe (masses bactériennes comprises entre 1 et 10g) (JOSEPH et coll., 1970)<sup>197</sup>.

Le broyage est réalisé en chambre ou enceinte stérile, dans un mortier préalablement refroidi, avec son pilon, à -20°C et placé dans la glace pendant la manipulation. Cette précaution modère l'élévation de température consécutive à l'action de l'alumino-silicate sur les cellules.

La masse bactérienne est mélangée, à l'aide du pilon, au double de son poids en zéolithe 4A en poudre (Union Carbide Corporation), ajoutée par petites quantités successives soigneusement homogénéisées avec le matériel cellulaire.

Après la dernière addition de zéolithe, la masse est malaxée le temps nécessaire pour obtenir un mélange pulvérulent puis de consistance visqueuse. On ajoute alors lentement du tampon Tris-Mg Cl<sub>2</sub> stérile (environ 60 ml pour 10 g de bactéries). La suspension obtenue est centrifugée à 500 g pendant 10 mn. Le culot, constitué par la zéolithe, est éliminé. Le surnageant peut subir une homogénéisation au Virtis comme dans le cas du cryobroyage.

## II - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE

### A) Immunodiffusion à deux dimensions en gélose (OUCHTERLONY et NILSSON, 1973)<sup>300</sup>

#### 1) Solutions et tampons

a) <u>Tampon</u> :	Véronal sodé (0,05 M)	10,3 g
	Diéthylmalonylurée (0,01 M)	1,85 g
	Acétate de sodium anhydre (0,05 M)	4,1 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml
	Ajuster le pH à 8,6 avec de la soude ou de l'acide acétique	

b) <u>Gélose</u> :	Agar-Noble DIFCO	1 g
	Tampon	25 ml
	H <sub>2</sub> O	75 ml
	Merthiolate de sodium	10 mg

Chauffer au bain-marie à 95°C

Filtrer sur tarlatane

Autoclaver 20 mn à 105°C

c) Solution d'imprégnation

Agar Noble Difco	0,1 g
Glycérine	0,05 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml
Merthiolate de sodium	10 mg

Dissoudre à chaud

d) Citrate trisodique à 5 %e) Chlorure de sodium à 1 %f) Colorant : Amidoschwarz 10 B 6 g

Solution de rinçage 1000 ml

Préparer 24 heures avant l'emploi et filtrer sur papier Whatman 3.

g) Solution de rinçage :

Méthanol (filtré)	450 ml
Acide acétique	100 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

2) Mode opératoire

a) Préparation des lames : Des lames 25 x 75 mm, dégraissées 48 heures en mélange sulfochromique (bichromate de potassium en solution aqueuse à 6 %, volume à volume avec de l'acide sulfurique concentré), rincées à l'eau distillée et conservées dans un mélange volume à volume d'éther et d'alcool, sont séchées puis déposées par 6 sur les chassis LKB-GELMAN.

Les chassis garnis, parfaitement horizontaux, reçoivent un film de solution d'imprégnation chauffée à 70 - 80°C, étalé au pinceau et séché au séchoir électrique tiède.

Puis chaque rangée de 3 lames reçoit 10 ml de gélose fondue à 90°C et refroidie à 50 - 60°C. A l'abri de la poussière, sous couvercle, en 5 à 10 mn, la gélose se solidifie. L'empreinte des trous est faite à



l'emporte-pièce, selon la disposition et la taille souhaitées, puis les châssis sont placés sur le porte-chassis, à 4°C, pendant une quinzaine de minutes, pour une légère contraction de la gélose, ce qui facilite l'extraction ultérieure du gel dans les trous. Ce gel est aspiré à la pipette Pasteur branchée sur une trompe à vide.

b) Immunodiffusion : Les échantillons à analyser sont déposés dans les trous, à la pipette automatique (15 µl pour les trous de 3 mm de diamètre sur 2 mm de profondeur). Les châssis, sur leur porte-chassis, sont placés en atmosphère humide, dans des boîtes hermétiques, garnies de papier filtre mouillé et additionné de quelques gouttes de Merseptyl à 1 %. Les lames sont abandonnées 24 heures à la température ambiante, puis 24 à 48 heures à 4°C. Il est possible de recharger les puits après le premier délai de 24 heures, mais il faut prendre garde, dans ce cas, au dédoublement de certains arcs de précipitation.

Après séjour à 4°C, les lames peuvent être photographiées par projection, directement sur papier photo, à l'aide d'un agrandisseur.

Les lames sont immergées une heure dans la solution de citrate à 5 % puis 2 fois 24 heures dans du NaCl à 1 % et enfin une heure dans de l'eau déminéralisée.

On peut détacher les protéines collées au fond et sur le bord des trous par un jet de pissette d'eau distillée.

Le séchage a lieu sous papier Whatman N°1 par simple évaporation à l'air ambiant. Veiller à ce que tous les trous soient entièrement remplis d'eau au moment de placer le papier Whatman, lequel est déposé mouillé sur la gélose : ces précautions évitent l'éclatement de la circonférence des trous lors du séchage.

A la fin du séchage, le papier filtre se retire sans difficulté. On peut laver les quelques fibres de cellulose qui peuvent adhérer, en frottant légèrement les lames avec la pulpe du doigt ou un pinc eau sous eau distillée. Laisser sécher une demi-heure.

Les lames sont détachées des châssis et numérotées, puis colorées dans la solution d'Amidoschwartz 10B pendant 2 mn. Elles sont décolorées dans plusieurs bains de solution de rinçage jusqu'à l'obtention d'un fond incolore.

B) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle (microméthode)  
(d'après LAURELL, 1965)<sup>230</sup>

1) Matériel

Lames de verre de 50 x 50 x 1,5 mm

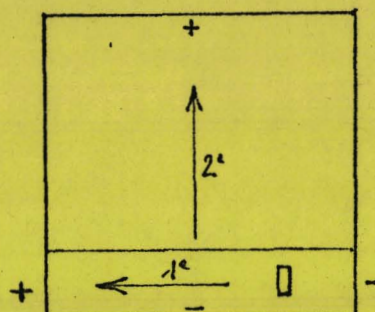
Emporte-pièce rectangulaire de 4 x 1 mm

Agarose (Indubiose) A37 de l'Industrie Biologique Française  
en solution à 1 % dans du tampon Véronal (cf. Im-  
munodiffusion) à pH 8,2

2) Mode opératoire

a) Préparation des lames : Les lames de verre reçoivent sur une surface horizontale 5 ml d'agarose à 1 % à 50°C. Lorsque le gel est refroidi et solidifié, pratiquer à l'emporte-pièce un puits rectangulaire selon schéma.

Avant la première migration,  
découper au scalpel le gel, le long d'une  
ligne située à 9 mm du bord, englobant  
le puits. Déposer la solution antigénique  
en solution aqueuse ou tamponnée ( $\approx 10 \mu\text{l}$ ).



b) Première migration : Les lames sont alignées sur une rangée parallèlement aux réservoirs de tampon. La première migration a lieu sous 10 à 12 volts pendant 1 heure 30 à 2 heures (voltage mesuré aux bords du gel). Le pontage est assuré par du papier Whatman 1.

A la fin de la première migration, on enlève le gel inutile (soit les 4/5 de la lame), ne conservant que l'étroite bande contenant les protéines.

Préparer le volume de gel nécessaire pour compléter les lames ( $\approx 3,5$  ml par lame). Ce gel contient l'immunsérum spécifique des protéines déposées dans le puits : gel à 1,33 % d'agarose (2 volumes) mélangé avec le sérum plus ou moins dilué (1 volume). Le sérum est introduit dans le gel à 48°C, au bain-marie avec une pipette tempérée par de l'eau distillée à la même température. Couler rapidement les 3,5 ml nécessaires par lame.

c) Deuxième migration : La deuxième migration, qui se déroule perpendiculairement à la première, a lieu sous 2,8 volts pendant 16 heures (voltage aux bords du gel).

Puis les lames sont laissées 24 heures à 4°C en atmosphère humide. Un premier lavage a lieu en tampon véronal physiologique pendant 24 heures, renouvelé une seconde période de 24 heures. Puis un lavage de 15 mn à l'eau déminéralisée précède le séchage sous Whatman 1 et la coloration au bleu de COOMASSIE-R ou à l'AMIDOSCHWARZ 10B.

### C) Electrophorèse sur gel d'acrylamide

#### 1) Electrophorèse analytique (DAVIS, 1964)<sup>102</sup>

Les électrophorèses sont effectuées dans des tubes de pyrex de 0,5 x 7,5 cm. La concentration en acrylamide est de 7,5 % dans le gel de séparation et de 5 % dans le gel de concentration (composition : cf tableau 44).

Le tampon d'électrophorèse est le tampon Tris-glycocolle pH 8,3, sauf mention particulière dans le texte :

Tris	6 g
Glycocolle	28,5 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
le Ph est de 8,3	

Les échantillons (0,1 à 0,2 ml) sont déposés sur les gels, alourdis soit par 10 % de saccharose, soit par 10 % de glycérol. Du bleu de bromophénol à 6 mg/100 ml est introduit dans les échantillons comme indicateur du front de migration.

Une intensité constante de 5 mA par tube est appliquée aux tubes, la migration se déroulant de la cathode vers l'anode (- vers +).

En fin d'électrophorèse, les gels, sortis de leurs tubes de pyrex sont simultanément fixés et colorés 16 heures dans une solution de COOMASSIE BRILLANT BLUE R à 12,5 mg pour 100 ml de solution aqueuse de méthanol à 40 %, d'acide acétique à 5 % et de glycérine à 2,5 %. Les gels colorés sont décolorés par immersion dans une solution de lavage

(Méthanol 20 % / Acide acétique 5 % / Glycérine 2,5 %) en présence d'un peu de DOWEX 1 x 8.

Les gels décolorés sont conservés dans l'acide acétique à 7 %.

### Réalisation du gel de polyacrylamide

Mélanger	Monomère d'acrylamide	: 4 volumes
extemporanément	Tampon	: 3 volumes
	Initiateur de polymérisation	: 1 volume

	Gel de concentration ou d'espacement (supérieur, à large porosité)		Gel de séparation (inférieur, à porosité étroite)	
<u>Monomères</u> (Poids/100ml d'eau)	<u>Acrylamide</u>	<u>Bisacrylamide</u> <sup>1</sup>	<u>Acrylamide</u>	<u>Bisacrylamide</u>
5 %	8 g	2 g	-	-
7,5 %	-	-	15 g	400 mg
10 %	-	-	20 g	532 mg
<u>Tampons</u>	<u>Tris</u> <sup>(3)</sup>	1,9 g	<u>Tris</u>	12,1
	Ac. phosphorique M	8,4 ml	HCl N	16 ml
	H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
	pH 6,7		pH 8,7	
	+ 0,1 ml de TEMED <sup>(2)</sup> au 1/10 (ou 10 µl de TEMED pur) par 10 ml de tampon, ajouté au moment de l'emploi.			
<u>Indicateur</u>	Mis en solution au moment de l'emploi Persulfate d'ammonium : 35 mg pour 10 ml d'eau			

(1) Bisacrylamide : NN' Méthylène bis acrylamide

(2) TEMED = NNN'N' Tétraméthyléthylène diamine

(3) TRIS = Trishydroxyméthylamino méthane

Tableau 66 : Composition des gels d'acrylamide.

## 2) Détermination du poids moléculaire sur gel d'acrylamide

### a) Dénaturation et réduction de la protéine (WEBER et OSBORN, 1969)<sup>404</sup>

L'échantillon est dissous dans du laurylsulfate de sodium (ou dodecylsulfate de sodium = SDS) à 1 % (p/v) avec 1 % de mercaptoéthanol (v/v). Il est chauffé 2 mn à 100°C.

L'étalonnage de la migration est réalisé avec différentes protéines dont les monomères ont des poids moléculaires connus :

- sérumalbumine bovine : 68.000
- ovalbumine : 43.000
- pepsine : 34.000
- trypsine : 23.000

Ces étalons subissent le même traitement de réduction que la protéine à étudier.

### b) Electrophorèse (LAEMMLI, 1970)<sup>228</sup>

Les gels d'espacement et de séparation sont réalisés dans les mêmes conditions que pour l'électrophorèse analytique mais contiennent en plus 0,1 % de SDS introduit avec le persulfate d'ammonium, à raison de 80 mg pour 10 ml de solution. On peut également dissoudre le persulfate d'ammonium dans une solution de SDS à 8 g/litre.

Le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris-Glycocolle plus dilué que celui utilisé pour l'électrophorèse analytique et contenant, en plus, 0,1 % de SDS :

Tris	1,5 g
Glycocolle	14,4 g
SDS	1 g (ou 125 ml de la solution à 8 g/litre)
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

Les échantillons réduits sont déposés sur les gels avec du glycérol (90 µl d'échantillon, contenant jusqu'à 100 µg de protéine + 15 µl de glycérol + 5 µl de bleu de bromophénol à 6 mg/100 ml d'eau), et soumis à un courant de 8 mA par tube jusqu'à l'arrivée du traceur coloré au bas du tube.

Les gels sont sortis des tubes et simultanément fixés et colorés par immersion dans une solution de Bleu de Coomassie à 12,5 mg pour 100 ml de méthanol à 50 % et d'acide acétique à 7 % pendant 16 heures à 37°C. Ils sont décolorés dans les mêmes conditions que pour l'électrophorèse analytique.

#### D) Immunoabsorbants

##### 1) Réactifs

###### a) Tampon bicarbonate-NaCl

Bicarbonate de sodium	8,4 g (0,1 M)
Chlorure de sodium	29,22 g (0,5 M)
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

###### b) Tampon carbonate-acide aminobutyrique

Carbonate de sodium	14,3 g (0,05 M)
Ac. 4-aminobutyrique	51,56 g (0,5 M)
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

###### c) Tampon acétate-NaCl pH 4,0

Acétate de sodium	7 g (0,1 M)
Chlorure de sodium	58,44 g (M)
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml
pH ajusté avec HCl	

###### d) Tampon borate-NaCl pH 8,5

Tétraborate de sodium	38,14 g (0,1 M)
Chlorure de sodium	58,44 g (M)
H <sub>2</sub> O	900 ml
Ajuster le pH 8,5 avec HCl N	
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

e) Solution de NaCl 0,5 M

Chlorure de sodium	29,22 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

f) Tampon glycoColle pH 2,8

HCl 2N	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

Ajuster le pH à 2,8 avec du glycoColle 2 M  
(75 g pour 500 ml)

H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml
------------------	-------------

g) Tampon glycoColle pH 2,2

HCl 2N	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

Ajuster le pH à 2,2 avec du glycoColle 2 M  
(75 g pour 500 ml)

H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml
------------------	-------------

h) Tampon phosphate physiologique (PBS) pH 7,0

Phosphate monopotassique	6,7 g
Phosphate disodique	30,1 g
Chlorure de sodium	17 g
H <sub>2</sub> O	qsp 2000 ml

2) Préparation de l'immunoadsorbant

On fait gonfler sur filtre de verre fritté N°3, 1 à 3 g de Sépharose 4B préactivée au bromure de cyanogène (CNBr-Sépharose 4B de PHARMACIA) dans 200 ml d'HCl 10<sup>-3</sup> N ajoutés en plusieurs fois et soutirés par aspiration. La durée de l'opération doit avoisiner 15 mn. On lave rapidement le gel avec le tampon bicarbonate (a). Le couplage est réalisé immédiatement après ce lavage.

On dissout dans 5 ml de tampon bicarbonate (a), 10 mg de substance à coupler par gramme de gel sec (15 mg/g s'il s'agit d'IgG purifiées, 26 à 27 mg/g s'il s'agit de sérum) et l'on introduit la solution dans le gel. Le mélange est agité doucement sur plateau rotatif, 2 heures à la température ambiante ou une nuit à 4°C. Le couplage peut être suivi par mesure de l'absorbance du surnageant à 280 nm.

Le matériel non fixé est lavé avec du tampon bicarbonate (100 ml en plusieurs fois). Les groupes actifs de la Sépharose restés libres sont bloqués par le tampon carbonate-aminobutyrate (b) (20 ml/g de gel) pendant 2 heures.

Le gel couplé et bloqué est lavé en 3 cycles des deux traitements suivants :

- 1) Tampon acétate-NaCl (c) : 100 ml
- 2) Tampon borate-NaCl (d) : 100 ml

Enfin, le gel est lavé avec du NaCl 0,5 M (e) et monté dans une colonne 0,9 x 15 cm.

### 3) Immunoabsorption

Passer 3 ml de solution à adsorber pour 5 ml de gel. La solution doit remplir les 3/4 de la colonne.

Attendre une heure.

Rincer abondamment la colonne avec la solution de NaCl 0,5 M (300 ml) et lire l'éluat à 280 nm (absorbance voisine de 0).

Décrocher la substance immunoabsorbée avec le tampon glycolle pH 2,8 (f) (40 ml). L'éluat est mis en dialyse contre du tampon phosphate physiologique renouvelé au bout de 24 heures, puis contre de l'eau distillée et enfin concentré sur membrane Diaflo AMICON ou par lyophilisation.

Le gel est nettoyé par 20 ml de tampon glycolle pH 2,2, puis abondamment rincé avec du NaCl 0,5 M. Le conserver à 4°C en NaCl contenant 0,1 ‰ d'azide de sodium.



E) Hémagglutination passive1) Sensibilisation des hématies de mouton à l'ovalbumine par tannagea) Réactifs :

- Acide tannique : Préparer extemporanément une solution d'acide tannique (MALLINCKRODT) à 10 mg/100 ml de tampon phosphate physiologique (pH 7,2)
- Tampon phosphate physiologique (PBS)

Chlorure de sodium	36 g
Phosphate disodique	7,4 g
Phosphate monopotassique	2,15 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1000 ml

Diluer au 1/5 avant emploi

- Solution d'ovalbumine : Ovalbumine MILES : 2 mg/ml PBS
- Hématies de mouton :
 

Suspension d'hématies fraîches à 10 % en Alsever	
Glucose	2,5 g
Citrate de sodium	0,8
Chlorure de sodium	0,42 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml

Ajuster le pH à 6,1 avec de l'acide citrique à 1 %  
Filtrer ou autoclaver 15 mn à 105°C.
- Sérum de lapin normal au 1/100 en PBS :
 

Inactiver par chauffage à 56°C pendant 30mn, puis épuiser par les hématies de mouton, avant de diluer le sérum.

b) Mode opératoire

- Tannage des hématies

Les hématies, partagées en deux lots égaux, sont lavées trois fois en PBS. Les centrifugations ont lieu pendant 5 à 10 mn à 750 g.

Le dernier culot est repris par du PBS de façon à obtenir une suspension à 10 % (en général 1 g d'hématies et 10 ml de PBS).

Mélanger les 10 ml de suspension d'hématies avec 10 ml de solution d'acide tannique.

Laisser en contact 15 mn à la température du laboratoire.

Centrifuger à 750 g, 5 mn, et laver une fois les cellules avec 20 ml de PBS (détacher le culot avec 1 ou 2 ml de PBS avant de compléter le volume).

L'un des deux lots est conservé pour la réalisation des témoins.

- Sensibilisation : Le second lot reçoit 10 ml de la solution d'antigène (20 mg d'ovalumbine) et reste en contact pendant 15 mn à la température du laboratoire.

Le lot témoin, non sensibilisé, est complété à 20 ml avec du PBS. Les deux lots sont centrifugés et repris par 20 ml de sérum de lapin à 1 % en PBS. Ils sont lavés trois fois dans ce milieu et repris dans 10 ml (= suspension à 1 %).

- Dosage des sérums : Il est réalisé dans les mêmes conditions que dans le cas des hématies sensibilisées à la sérumalbumine (cf ci-dessous § 3).

## 2) Sensibilisation des hématies de mouton à la sérumalbumine bovine par la glutaraldéhyde

### a) Réactifs :

- <u>Tampon glycocolle</u> :	Glycocolle	7,5 g
	Chlorure de sodium	10 g
	Soude normale	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O stérilisée sur Millipore	qsp 1000 ml

Ce tampon est à pH 8,2 et se conserve à 4°C.

- Solution de sérumalbumine bovine :

Sérumalbumine bovine (ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY, Chicago) :  
20 mg par ml de tampon glycocolle

- Solution de glutaraldéhyde :  
.....

Glutaraldéhyde à 2,5 p. 100 en tampon glycocolle (Dilution au 1/10 de la glutaraldéhyde à 25 %).

- Hématies de mouton formolées  
.....

Les hématies de mouton PASTEUR à 50 p. 100 sont diluées à 8 p. 100 avec du tampon phosphate physiologique. Un volume de cette suspension est mélangé à un volume de formol à 3 p. 100 en les versant simultanément dans un troisième récipient sous agitation constante. Le mélange est agité pendant 16 heures à 37°C (Eviter la production de mousse).

Centrifuger les hématies à 1.500g.

Les laver 5 fois en tampon glycocolle pH 8,2.

Diluer le dernier culot par un volume de tampon glycocolle égal au volume du culot pour avoir une suspension à 50 p. 100.

Enfin diluer la suspension à 50 p. 100 au 1/20 pour avoir une suspension à 2,5 % ; et la répartir en fractions de 2,5 ml additionnées de 25 µl de Merseptyl à 1/10 000.

Stocker les hématies formolées à 4°C.

b) Mode opératoire

Placer dans un tube un ml d'hématies de mouton à 10 % formolées.

Centrifuger 5 mn à 750 g.

Sur le culot, ajouter dans l'ordre

1 ml de la solution de sérumalbumine bovine

1 ml de glutaraldéhyde à 1 p. 100

Laisser en contact 15 mn à la température du laboratoire.

Laver deux fois les hématies avec du tampon glycocolle par centrifugation 5 mn à 750 g.

Remettre en suspension dans 5 ml de tampon glycocolle.

3) Dosage des sérums

a) Saturation des sérums

Décomplémenter 3 gouttes de chaque sérum à doser par chauffage 30 mn à 56°C.

Saturer ces sérums avec 3 gouttes de globules rouges de mouton (dans le cas des sérums anti-ovalbumine), avec 3 gouttes de globules rouges de boeuf (dans le cas des sérums anti-sérumalbumine bovine) à 50 p. 100.

Agiter et laisser en contact 30 mn à la température du laboratoire.

Centrifuger 5 mn à 750 g.

Prélever le surnageant = Sérum dilué au 1/2.

#### b) Dilutions des sérums

Les dilutions se font avec le sérum de lapin pour les hématies-ovalbumine, avec le tampon glyco-colle pour les hématies-sérumalbumine, de 1/2 en 1/2 sous un volume de 0,25 ml dans les alvéoles en U d'une plaque de titration.

#### c) Agglutination

On ajoute une goutte d'hématies sensibilisées à chaque alvéole. La lecture se fait après 3 heures et après 16 heures.

Un sérum de lapin de référence anti-ovalbumine ou anti-sérumalbumine bovine sert de standard interne et de contrôle. Chaque sérum (dilution au 1/2) reçoit une goutte d'hématies non sensibilisées pour vérifier l'absence d'agglutination spontanée.

### F) Dosage radioimmunologique des IgE (CARSON et coll., 1974)<sup>192</sup>

#### 1): Principe

Le dosage est basé sur une compétition des IgE du sérum à doser et d'IgE marquées à l'iode 125, pour des IgG-anti-IgE introduites en quantité insuffisantes dans le mélange réactionnel. Il se fixera d'autant plus d'IgE marquées qu'il y a moins d'IgE froides et inversement. La quantité d'IgE radioactives restées libres est directement proportionnelle à la quantité d'IgE présentes dans le sérum à doser. Les IgE restées libres sont prélevées après précipitation des IgG (complexées aux IgE) dans du sulfate d'ammonium à 33 % de saturation, concentration dans laquelle les IgG sont insolubles alors que les IgE sont solubles.

2) Réactifs

- a) Sérum de lapin normal (SORGA) (= SLN)
- b) Tampon borate physiologique (BBS) pH 8,0  
 Chlorure de sodium 9 g  
 H<sub>2</sub>O qsp 1000 ml  
 Tampon borate de sodium 0,2 M pH 8,0 qsp pH 8,0
- c) BBS-SLN : Tampon borate physiologique contenant 1 p. 100 de sérum de lapin normal
- d) IgE marquées à l'<sup>125</sup>I : diluées dans du BBS-SLN pour obtenir 40.000 cpm/ml
- e) IgG anti-IgE : diluées dans du BBS-SLN de manière à ce que dans les conditions du dosage 50 % de la radioactivité totale se lie à ces immunoglobulines en absence d'IgE froides.
- f) IgE standard : sérum de rat myélomateux (IR 162) titré par H. BAZIN à 5,7 mg d'IgE/ml.

La courbe étalon est obtenue par dilution de ce sérum avec du sérum de lapin normal.

3) Mode opératoire

Les dosages sont réalisés dans des tubes de polystyrène de 10 x 75 mm.

Chaque sérum est dosé en triple exemplaire :

- 0,5 ml du sérum à doser (dilué ou non selon la concentration en IgE)
- 0,2 ml de la dilution d'IgG-anti-IgE
- 0,1 ml de la solution d'IgE marquées

La gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions, chaque dilution du standard étant introduite sous 0,5 ml à la place du sérum à doser.

Trois tubes "zéro" et 3 tubes "radioactivité liée non spécifiquement" sont obtenus de la façon suivante :

<u>Tubes "zéro"</u>	<u>Tubes "non spécifiques"</u>
0,5 ml SLN	0,5 ml SLN
0,2 ml antisérum (IgG anti-IgE)	0,2 ml BBS-SLN
0,1 ml d'IgE marquées	0,1 ml IgE marquées

Tous les tubes sont agités et laissés une nuit à température ambiante. Puis il sont placés 1 h à 4°C avant d'être additionnés de 0,4 ml de sulfate d'ammonium saturé froid. Après une légère agitation, les tubes sont laissés EXACTEMENT 30 mn à 4°C puis centrifugés 30 mn EXACTEMENT à 2.000 g et 4°C.

A la pipette de précision, prélever 1 ml du surnageant. Trois tubes "radioactivité totale" réalisés par addition de 0,1 ml d'IgE marquées à 0,9 ml de BBS-SLN, sont comptés, en même temps que les surnageants de tous les autres tubes, dans un spectromètre à scintillation (GAMMATIC).

#### 4) Calculs

En abscisse est porté le logarithme de la dose d'IgE.

En ordonnée est porté l'arc sinus racine carrée du rapport radioactivité libre sur radioactivité totale.

La courbe linéarisée subit un traitement statistique permettant de calculer, par la méthode des moindres carrés, l'équation de régression et son domaine de confiance.

Les taux d'IgE des sérums à doser sont alors déduits de l'équation de régression.

L'ensemble de ces calculs est réalisé par ordinateur (INTER-TECHNIQUE, Multi 8).

#### G) Adjuvants huileux et minéraux

##### 1) Adjuvants huileux

###### a) Paraffine + Lanoline

Huile de paraffine	8,5 volumes
Lanoline	1,5 volumes

Dissoudre la lanoline dans l'huile de paraffine et autoclaver

30 mn à 110°C.

b) Paraffine + émulsionnant

Huile de paraffine purifié : 8,5 volumes

BAYOL F (ESSO) disponible chez SERVA

(Densité à 20°C = 0,778)

Agent tensioactif : 1,5 volumes

ARLACEL A disponible chez SERVA

Mannide mono-oléate

c) Adjuvant incomplet de Freund DIFCOd) Réalisation de l'émulsion d'eau dans l'huile

La phase aqueuse peut représenter la moitié du volume, mais l'émulsion est plus facile à réaliser et plus stable en utilisant 2 tiers de phase huileuse et 1 tiers de phase aqueuse contenant l'antigène.

Une vigoureuse agitation sur agitateur rotatif est suffisante pour obtenir une émulsion stable.

III - TECHNIQUES CELLULAIRESA) Lavage alvéolaire (MYRVIK et coll., 1961)<sup>277</sup>

L'animal, dont on désire prélever les macrophages alvéolaires, est anesthésié et saigné : éviter la saignée au cœur qui risque de léser les poumons. Fixer l'animal en décubitus dorsal et dégager la trachée qui est clampée le plus haut possible. Ouvrir la cage thoracique et dégager les poumons. Extraire l'ensemble cœur-poumons après section de l'articulation des clavicules avec le sternum et section de la trachée au dessus du clamp.

Rincer l'ensemble avec de l'eau physiologique. Retirer la pince fermant la trachée et adapter sur celle-ci un embout de seringue de même diamètre.

Introduire dans les poumons, à la seringue, un volume de liquide de Hanks additionné d'un peu d'héparine, qui provoque un léger gonflement de ceux-ci, puis aspirer lentement le volume injecté. Vider le liquide de lavage dans un tube à centrifuger maintenu à 0°C, et recommencer le même lavage avec du milieu neuf jusqu'à ce qu'ils sortent limpide. Il est possible de masser délicatement les lobes pulmonaires lorsqu'ils sont gorgés de liquide de lavage, en veillant toutefois à éviter une pression excessive qui entraînerait des hémorragies.

Les cellules sont lavées, dénombrées et mises en culture sur le support et dans le milieu nutritif approprié à l'expérience envisagée.

#### B) Exudats péritonéaux

Les exudats péritonéaux de cobayes sont prélevés deux à trois jours après induction d'une ascite provoquée par injection intrapéritonéale d'une émulsion de 2 ml de trioléate de glycérol dans 8 ml de liquide de Hanks. Au moment du prélèvement, la cavité péritonéale est lavée par 60 ml de Hanks froid contenant 300 Unités d'Héparine, introduits en trois fractions de 20 ml dans le péritoine ouvert longitudinalement. La phase huileuse est décantée et éliminée, tandis que les cellules sont lavées deux fois dans 20 ml de liquide Hanks froid sans héparine. Les cellules dénombrées sont reprises dans du MEM à la concentration voulue pour le remplissage des tubes capillaires destinés aux tests de migration : de  $2,5$  à  $5 \cdot 10^6$  macrophages par  $50 \mu\text{l}$ , soit de  $50$  à  $100 \cdot 10^6$  cellules/ml.

#### C) Inhibition de migration des macrophages

##### 1) Test direct : macrophages alvéolaires de cobaye.

Dans le cas des lavages alvéolaires chez le cobaye, qui fournissent de 40 à 60 millions de cellules en moyenne parmi lesquelles 75 à 80 % de macrophages et 20 à 25 % de lymphocytes, l'ensemble des cellules est placé dans les milieux de migration, en présence et en absence de l'antigène dont on recherche la sensibilité chez l'animal. Le facteur d'inhibition des macrophages (MIF) est produit in situ et agit directement sur les macrophages au sein du culot cellulaire. Dans ces conditions, il faut comparer la migration obtenue en présence d'antigène, à la fois à celle obtenue en absence d'antigène (index d'inhibition) et à celle obtenue en présence d'antigène avec les cellules d'un animal non sensibilisé (vérification d'un éventuel effet toxique de l'antigène sur les cellules normales).



Cette technique est utilisable avec d'autres macrophages (péritonéaux, en particulier) lorsqu'il est possible d'obtenir un minimum de  $10^7$  macrophages de l'animal dont on teste la sensibilité.

2) Test mixte : souris sensibilisées à la sérum-albumine bovine

Dans le cas où l'animal, dont on veut tester in vitro la sensibilité à un antigène donné, ne peut fournir un nombre suffisant de macrophages ( $10^7$  cellules minimum), on peut utiliser un test mixte où les lymphocytes sont mis en présence de l'antigène pendant 48 heures pour une éventuelle synthèse de MIF. Les surnageants acellulaires de ces cultures sont utilisés pour la migration de macrophages péritonéaux, de cobaye par exemple, car le MIF n'a pas de spécificité d'espèce dans son effet.

a) Synthèse de MIF

On prélève les lymphocytes ganglionnaires à partir des ganglions axillaires, sous-claviculaires, inguinaux et poplités des souris sacrifiées. Les lymphocytes de chaque souris sont partagés en deux parties égales et mis en culture : une moitié dans 2 ml de milieu MEM seul (témoin), l'autre moitié dans 2 ml de ce milieu MEM additionné de l'antigène à tester (dans ce cas, 40  $\mu\text{g/ml}$  de sérumalbumine bovine) pour une synthèse éventuelle de MIF. La culture se déroule pendant 48 heures à  $37^\circ\text{C}$  en atmosphère de  $\text{CO}_2$  à 5 % en flacon de Falcon de  $25\text{ cm}^3$  ( $5 \cdot 10^6$  lymphocytes/ml).

Après 48 heures, les milieux de culture sont prélevés et centrifugés. Les surnageants sont utilisés comme milieux pour la migration de macrophages péritonéaux de cobayes. Avant d'être introduits dans les chambres de migration, les milieux sont complétés par 10 p. 100 de sérum d'embryon de bovin décomplémenté (ici le sérum apporte la sérumalbumine absente des milieux sans antigène ; mais lorsque l'antigène n'est pas un constituant sérique, il faut l'ajouter à ce moment dans les milieux n'en contenant pas au cours de la culture lymphocytaire). L'ensemble des milieux est filtré sur Millipore  $0,20\ \mu\text{m}$  afin d'éliminer totalement les lymphocytes de souris.

b) Migration des macrophages

Que ce soit dans le test direct ou le test mixte, des tubes à microhématocrite héparinés (volume environ 50  $\mu$ l) sont remplis par une suspension de 2 à 4 millions de cellules (macrophages alvéolaires ou péritonéaux), scellés par 1 mm de gélose à 1 % et 1 mm de mastic CRITOSEAL pour cultures cellulaires, puis centrifugés à 800 g.

Les chambres de migration de SYKES-MOORE, contenant chacune deux tubes à microhématocrite sectionnés à l'interface cellules-milieu, sont remplies avec les milieux à tester et placées à 37°C.

Les surfaces de migration sont relevées après 16 heures pour être mesurées en planimétrie.

Les index de migration sont exprimés en calculant le rapport :

$$= \frac{\text{Surface de migration de 2 tubes dans le milieu supposé contenir du MIF (cultures avec antigène)}}{\text{Surface de migration de 2 tubes dans le milieu témoin ne contenant pas de MIF (cultures sans antigène)}}$$

D) Marquage des schistosomules au  $^{51}\text{Cr}$  (BUTTERWORTH et coll., 1974)<sup>55</sup>

Deux mille schistosomules, préparés par "filtration" de cercaires de Schistosoma mansoni à travers une peau abdominale de souris tendue sur un milieu de culture maintenu à 37°C, sont conservés une nuit à 4°C en milieu HLEG contenant 10 p. 100 de sérum de lapin ou de veau foetal décomplémenté, de la pénicilline (200 U.I./ml) et de la streptomycine (100  $\mu$ g/ml).

Après élimination du surnageant, les schistosomules sont mis en contact avec 100  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  chromate de sodium (2 m Ci/ml) en eau physiologique, complétées par deux volumes de HLEG sans sérum.

Les larves sont placées 4 heures à 37°C en atmosphère de  $\text{CO}_2$  à 5 % et régulièrement agitées pour éviter leur dépôt au fond du tube.

Puis les schistosomules sont lavés 4 fois dans 5 ml de HLEG à 10 p. 100 de sérum de veau foetal décomplémenté et contenant 0,47 p. 100 de tampon HEPES (4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine acide éthanesulfonique), par des centrifugations ne dépassant pas 400 g.



<u>Solution mère</u>		<u>H<sub>2</sub>O</u>	
2,5 ml	+	2,5 ml	= 500 µg/ml
2,0 ml	+	3,0 ml	= 400 µg/ml
1,5 ml	+	3,5 ml	= 300 µg/ml
1,0 ml	+	4,0 ml	= 200 µg/ml
0,75 ml	+	4,25 ml	= 150 µg/ml
0,5 ml	+	4,5 ml	= 100 µg/ml
0,25 ml	+	4,75 ml	= 50 µg/ml

## 2) Mode opératoire

0,20 ml de solution protéique à doser, diluée de façon à entrer dans la gamme du standard ; ou 0,20 ml de chaque concentration du standard.

Ajouter 2,0 ml de réactif du biuret sous agitation constante.

Laisser 30 mn à l'obscurité à la température du laboratoire.

Ajouter 0,20 ml de réactif de Folin dilué sous agitation constante.

Laisser 15 mn minimum à l'obscurité.

Lire la D.O. à 660 nm.

La coloration est stable environ 2 heures.

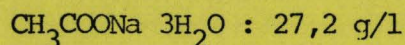
### B) Dosage de la bêta-glucuronidase (SZASZ, 1967)<sup>375</sup>

EC 3.2.1.31

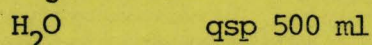
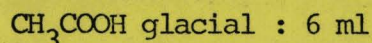
#### 1) Réactifs

##### a) Tampon acétate 0,1 M pH 4,5

Réaliser une solution 0,2 M d'acétate de sodium :



Réaliser une solution 0,2 M d'acide acétique :



Mélanger les deux solutions qsp pH 4,5 et doubler le volume.

b) Solution de soude décimale

c) Substrat : p-nitrophényl-glucuronidate 0,01 M (PM : 315) en tampon acétate

d) Standard de p-nitrophénol

Etalon BOEHRINGER (réf. 15911) 0,5 mM dilué pour obtenir 60nM de p-nitrophénol dans le volume final de la réaction (3 ml)

0,12 ml de l'étalon BOEHRINGER, prélevé à la pipette de

0,2 ml au 1/100

0,88 ml de tampon acétate

2,0 ml de soude 0,1 N

## 2) Mode opératoire

Echantillon : 0,2 ml

Tampon acétate : 0,7 ml

Substrat : 0,1 ml

Incuber à 37°C pendant 4 heures.

Arrêter la réaction avec 2 ml de NaOH 0,1 N.

Lire la D.O. à 405 nm.

Blancs : Incuber, pendant 4 heures, 0,7 ml de tampon et 0,1 ml de substrat, puis ajouter, après la soude, 0,2 ml du milieu correspondant à l'échantillon.

L'activité s'exprime en nM de substrat hydrolysé par heure et par unité d'échantillon (1 ml de broyat cellulaire : ou  $10^6$  cellules).

C) Dosage de la bêta-galactosidase (CONCHIE, 1959)<sup>88</sup>

EC 3.2.1.23

### 1) Réactifs

a) Tampon acétate 0,1 M pH 4,5

Même préparation que pour la bêta-glucuronidase

b) Tampon glycolle 0,4 M pH 10,8

Glycolle 0,8 M (60 g/l) : 500 ml

NaOH 0,8 M (32 g/l) : 500 ml

Mélanger V/V les deux solutions.

c) Substrat : O-nitrophényl-béta-D-galactoside (O.N.P.G.)

2mM (PM : 301) en tampon acétate

mis en solution au moment de l'emploi (agiter 1 heure à 4°C).

d) Gamme d'o-nitrophénol (PM : 139)

Peser 4 mg d'o-nitrophénol et les dissoudre dans 0,25 ml d'éthanol.

Ajouter 5,5 ml de tampon acétate (= solution contenant 5 m Moles/ml). Diluer

1 ml de la solution précédente avec 9 ml de tampon acétate (= solution-mère

à 500 nMoles/ml). Puis réaliser la gamme suivante :

	<u>Solution mère</u>	<u>Tampon acétate</u>
0	0 ml	1,6 ml
50 nM	0,1 ml	1,5 ml
100 nM	0,2 ml	1,4 ml
200 nM	0,4 ml	1,2 ml
300 nM	0,6 ml	1,0 ml
500 nM	1,0 ml	0,6 ml

A la fin du dosage chaque tube de la gamme reçoit, comme les échantillons, 1,6 ml de tampon glycolle.

## 2) Mode opératoire

Echantillon 0,2 ml

Tampon acétate 1,2 ml

Substrat 0,2 ml

Incuber 16 heures à 37°C

Arrêter la réaction avec 1,6 ml de tampon glycolle

Blancs : Incuber 1,2 ml de tampon acétate et 0,2 ml de substrat.

A la fin de l'incubation, ajouter 1,6 ml de tampon glycolle et 0,2 ml d'échantillon.

Lecture à 425 nm

Le volume de la gamme-étalon et des échantillons étant le même, les concentrations lues correspondent directement à la quantité de substrat hydrolysé par l'enzyme introduit avec les 0,2 ml d'échantillon.

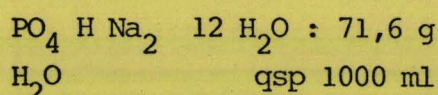
Comme pour la bêta-glucuronidase, l'activité enzymatique s'exprime en nM de substrat hydrolysé par heure et par unité d'échantillon (soit unité de volume, soit unité cellulaire).

D) Dosage de la cathépsine C (Mc DONALD et coll., 1971)<sup>238</sup>  
EC 3.4.4.9

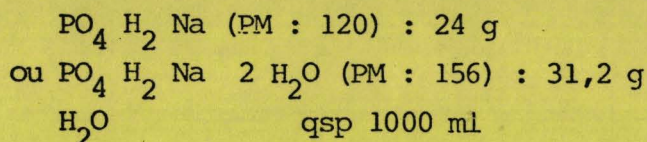
1) Réactifs

a) Tampon phosphate 0,1 M pH 6,0

Réaliser une solution 0,2 M de phosphate disodique :



Réaliser une solution 0,2 M de phosphate acide de sodium



Mélanger les deux solutions qsp pH 6,0, et doubler le volume.

Ajouter alors 2,34 g de NaCl/litre.

b) Substrat : Glycyl-Phénylalanyl-bêta-Naphtyl-amide 0,4 mM (PM : 347)

Peser 1,5 mg de substrat ; dissoudre extemporanément avec 20 µl de Diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) et diluer sous agitation avec 10 ml de tampon phosphate tiède.

c) Révélateur : la bêta-naphtylamine libérée est couplée à un colorant diazoïque : le Fast Garnett GBC.

Préparer la solution au maximum 30 mn avant emploi, en mélangeant volume à volume les solutions "A" et "B" suivantes :

A) Acide chloromercuribenzoïque (CMB)

.....  
357 mg de CMB en fiole jaugée de 100 ml

12 ml de NaOH 0,5 N (2 g pour 100 ml de sol. finale)

Agiter pour dissoudre

Ajouter 1,86 g d'EDTA-Na<sub>2</sub> (acide éthylène-diamine-tétra-acétique, sel disodique) ou Versène.

Compléter à 95 ml avec de l'eau.

Ajuster le pH à 6,0 avec HCl 1 N

Compléter à 100 ml.

B) Fast Garnett GBC

0,5 mg de colorant par ml de solution de Tween 20 à 4 p. cent (p/v) dans l'eau. Filtrer. La solution ne se conserve que quelques heures à 4°C.

d) Standard de bêta-naphtylamine (PM 179)

Peser 1,7 mg de 2-naphtylamine.

Dissoudre dans 1,0 ml d'alcool à 95 p. cent.

Ajouter 18 ml de tampon phosphate.

Prélever 1 ml de cette solution et ajouter 4 ml de tampon phosphate (= solution-mère à 100 nM/ml).

Réaliser la gamme suivante :

	<u>Solution-mère</u>	<u>Tampon phosphate</u>
0	0	0,80 ml
5 nM	0,05 ml	0,75 ml
10 nM	0,10 ml	0,70 ml
20 nM	0,20 ml	0,60 ml
30 nM	0,30 ml	0,50 ml
50 nM	0,50 ml	0,30 ml

2) Mode opératoire

Préincuber 10 mn à 37°C :

0,2 ml d'échantillon

0,2 ml de tampon phosphate

Puis ajouter 0,4 ml de substrat chauffé à 37°C.

Incuber 4 heures.

Arrêter la réaction avec 1,4 ml de révélateur, sans oublier les tubes de la gamme-étalon.

Lire la D.O. à 520 nm.



Blancs : même processus, sans échantillon qui est ajouté après le révélateur.

Attention ! Certains réactifs de ce dosage sont potentiellement cancérogènes et réclament une grande prudence d'utilisation : masque pour la pesée des poudres, et gants pour le maniements des solutions. A la fin du dosage, rincer soigneusement la vaisselle à l'eau froide avant son traitement habituel.

E) Dosage de la leucine-béta-naphtylamidase

(GOLDBARG et RUTENBURG, 1958)<sup>148</sup> EC 3.4.1.1

1) Réactifs

a) Tampon phosphate 0,1 M pH 7,0

Même préparation que pour la Cathépsine C, mais pH 7,0.

b) Substrat : Leucine-béta-naphtylamide-HCl (PM : 293)

25 mg/ml de Diméthyl-sulfoxyde

Diluer 50 fois avec le tampon phosphate au moment de l'emploi.

c) Révélateur : 125 mg de Fast-Garnett GBC, 75 ml d'ac. acétique glacial

25 ml de Tween 20 ; compléter à 250 ml avec de l'eau

d) Gamme étalon de 2-naphtylamine : comme pour la Cathépsine C

2) Mode opératoire

0,2 ml d'échantillon

0,2 ml de tampon phosphate pH 7,0

Préincuber 10 mn à 37°C

Ajouter 0,4 ml de substrat préchauffé à 37°C

Incuber 4 heures à 37°

Arrêter la réaction avec 1,4 ml de révélateur

Lire la D.O. à 560 nm.

F) Dosage de la phosphatase acide

EC 3.1.3.2

1) Réactifsa) Tampon citrate 0,05 M pH 4,8

Acide citrique 0,1 M (PM : 210) : 21 g/l

Citrate trisodique 0,1 M (PM : 294) : 29,4 g/l

Mélanger les deux solutions pour obtenir le pH 4,8 et doubler le volume avec de l'eau.

b) Substrat : p-nitrophenyl-phosphate de sodium-6H<sub>2</sub>O 5,5 mM (PM 371) en solution dans le tampon citrate.c) Soude décinormaled) Standard de p-nitrophénol

Réalisé comme pour la bêta-glucuronidase

2) Mode opératoire

- Préchauffer quelques minutes à 37°C
- 1 ml de substrat
- Ajouter alors 0,2 ml d'échantillon
- Incuber exactement 30 mn à 37°C
- Arrêter la réaction avec 1,8 ml de soude décinormale
- Lire la D.O. à 405 nm

Le blanc est constitué par 1 ml de substrat incubé sans échantillon, lequel est ajouté en fin d'incubation après addition de la soude.

L'activité phosphatique acide est exprimée en nM de substrat hydrolysé par heure et par unité de volume de l'échantillon.

G) Dosage de la lactate-deshydrogénase (WROBLEWSKI et LADUE,

EC 1.1.1.27

1955)<sup>422 bis</sup>

Méthode BOEHRINGER modifiée : réf. 15948

1) Réactifs

a) Tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 ; pyruvate 0,31 mM

b) NADH 9mM

2) Mode opératoire

- Introduire dans une cuve de spectrophotomètre

3 ml de tampon phosphate

0,05 ml de NADH

0,1 ml d'échantillon

- Lire la D.O. à 340 nm =  $E_1$

- Replacer le volume dans un tube et mesurer l'échantillon suivant. Laisser à la température ambiante.

- Après 15 mn exactement, lire à nouveau l'extinction de chaque échantillon :  $E_2$

- Comparer la différence d'extinction à celle obtenue avec un standard de LDH

"Précinorm E" de BOEHRINGER (réf. 15918).

TABLE DES MATIERES DE L'ANNEXE TECHNIQUE

I - CULTURE BACTERIENNE ET OBTENTION DES ANTIGENES

Milieu liquide de SAUTON	178
Cryobroyage	178
Broyage à la zéolithe	179

II- ANALYSES IMMUNOLOGIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE

A) Immunodiffusion à deux dimensions en gélose (OUCHTERLONY)	179
B) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle (LAURELL)	182
C) Electrophorèse en gel de polyacrylamide	183
1 - Analyse	183
2 - Détermination du poids moléculaire	185
D) Immunoabsorbants	186
E) Hémagglutination passive	189
1 - Sensibilisation des hématies à l'acide tannique	189
2 - Sensibilisation des hématies à la glutaraldéhyde	190
3 - Dosage des sérums	191
F) Dosage radioimmunologique des IgE	192
G) Adjuvants huileux et minéraux	194

III- TECHNIQUES CELLULAIRES

A) Lavage alvéolaire	195
B) Exudats péritonéaux	196
C) Inhibition de migration des macrophages	196
1-Test direct	196
2-Test mixte	197
D) Marquage des schistosomules au <sup>51</sup> chrome	198

IV- DOSAGES ENZYMATIQUES

A) Dosage de protéines (LOWRY)	199
B) $\beta$ -glucuronidase (3,2,1,31)	200
C) $\beta$ -galactosidase (3,2,1,23)	201
D) Cathépsine C (3,4,4,9)	203
E) Leucine-aminopeptidase (3,4,1,1)	205
F) Phosphatase acide (3,1,3,2)	206
G) Lactate-deshydrogénase (1,1,1,27)	206

## R E F E R E N C E S

## B I B L I O G R A P H I Q U E S

Les nombres entre parenthèses qui terminent  
chaque référence correspondent aux pages où  
figure la référence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - ADAM, A., CIORBARU, R., PETIT, J.F. & LEDERER, E. (1972)  
Isolation and properties of a macromolecular, water-soluble, immunoadjuvant fraction from the cell-wall of Mycobacterium smegmatis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 851 (53)
- 2 - ADAM, A., CIORBARU, R., PETIT, J.F., LEDERER, E., CHEDID, L., LAMENSANS, A., PARANT, F., PARANT, M., ROSSELET, J.P. & BERGER, F.M. (1973)  
Preparation and biological properties of water-soluble adjuvant fractions from delipidated cells of Mycobacterium smegmatis and Nocardia opaca.  
Infect. Immun., 7, 855 (53)
- 3 - ADAM, A., AMAR, C., CIORBARU, R., LEDERER, E., PETIT, J.F. & VILKAS, E. (1974)  
Activité adjuvante des peptidoglycanes des mycobactéries.  
C.R. Acad. Sci. D, 278, 799 (54)
- 4 - ADAM, A., CIORBARU, R., ELLOUZ, F., PETIT, J.F. & LEDERER, E. (1974)  
Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans.  
Biochem. Biophys. Res. Communic., 56, 561 (54 ; 56)
- 5 - ADAMS, P.B. (1975)  
The mechanism of interaction between T and B lymphocytes in the in vitro response to sheep erythrocytes. Non specific collaboration across a dialysis membrane.  
Immunology, 28, 253 (38)
- 6 - ALEXANDER & EVANS (1971)  
Endotoxin and double-stranded RNA render macrophages cytotoxic.  
Nature, New Biol., 232, 76 (64)
- 7 - ALLISON, A.C., DAVIES, P. & DE PETRIS, S. (1971)  
The role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis.  
Nature, New Biol., 232, 153 (67)
- 8 - ALLISON, A.C. & DAVIES, A.J.S. (1971)  
Requirement of thymus dependent lymphocytes for potentiation by adjuvants of antibody formation.  
Nature, 233, 330 (48)
- 9 - ALLISON, A.C. (1972)  
Interactions of antibodies and effector cells in immunity against tumours.  
Ann. Inst. Pasteur, 122, 619 (68 ; 75)

- 10 - ALLISON, A.C. (1973)  
Effects of adjuvants on different cell types and their interactions in immune responses.  
in "Immunopotential", P. 73, Ciba Found. Symposium, Londres, Elsevier (50)
- 11 - ALLISON, A.C., DAVIES, P. & PAGE, R.C. (1974)  
Effect of endotoxin on macrophages and other lymphoreticular cells.  
J. Infect. Dis., 128, S<sub>212</sub> (73 ; 81)
- 12 - ALLISON, A.C. & GREGORIADIS, G. (1974)  
Liposomes as immunological adjuvants.  
Nature, 252, 252 (52)
- 13 - ANDERSON, J., SJOBERG, O. & MOLLER, G. (1972)  
Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation.  
Transplant. Rev., 11, 131 (50)
- 14 - ANDRES, G.A., HSU, K.C. & SEEGAL, B.C. (1967)  
Immunoferritin technique for the identification of antigens by electron microscopy.  
in "Handbook of Experimental Parasitology", p. 527, D.M. Weir, ed., Blackwell Scientific Public, Oxford (93)
- 15 - ARMERDING, D. & KATZ, D.H. (1974)  
Activation of T and B lymphocytes in vitro. II - Biological and biochemical properties of an allogenic effect factor (AEF) active in triggering specific B lymphocytes.  
J. Exp. Med., 140, 19 (38)
- 16 - ASKONAS, B.A. & WHITE, R.G. (1956)  
Sites of antibody production in the guinea pig. The relation between in vitro synthesis of anti-ovalbumine and  $\gamma$ -globulin and distribution of antibody containing plasma cells.  
Brit. J. Exp. Path., 37, 61 (47)
- 17 - ASKONAS, B.A. & RHODES, J.M. (1965)  
Immunogenicity of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages.  
Nature, 205, 470 (41)
- 18 - ASKONAS, B.A. & JAROSKOVA, L. (1970)  
Macrophages as helper cells in antibody induction.  
in "Developmental aspects of antibody formation and structure", p. 531., Sterzl J. & Rihatt, eds., Acad. Press N.Y. (41)
- 19 - ASSELINEAU, J.  
Les lipides bactériens.  
Thèse de Doctorat de l'Université de Paris (1950)  
Editions Arnette (1951)  
Editions Hermann, Paris (1962) (52)

- 20 - AUDIBERT, F. & CHEDID, L. (1975)  
Augmentation de la réponse immunitaire par administration d'émulsions à base d'huile végétale métabolisable.  
C.R. Acad. Sci., 280, 1629 (52)
- 21 - AUZINS, I. & ROWLEY, D. (1962)  
On the question of the specificity of cellular immunity.  
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 40, 283 (73)
- 22 - AZUMA, I., YAMAMURA, Y. & MISAKI, A. (1969)  
Isolation and characterization of arabinose mycolate from firmly bound lipids of Mycobacteria.  
J. Bacteriol., 98, 331 (54)
- 23 - AZUMA, I., KISHIMOTO, S., YAMAMURA, Y. & PETIT, J.F. (1971)  
Adjuvanticity of mycobacterial cell walls.  
Jap. J. Microbiol., 15, 193 (53)
- 24 - BARTH, E.E.E., JARRETT, W.F.H. & URQUHART, G.M. (1966)  
Studies on the mechanism of self-cure reaction in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.  
Immunology, 10, 459 (18).
- 25 - BEKIERKUNST, A., LEVIJ, I.S., YARKONI, E., VILKAS, E., ADAM, A. & LEDERER, E. (1969)  
Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions.  
J. Bacteriol., 100, 95 (57)
- 26 - BEKIERKUNST, A., LEVIJ, I.S., YARKONI, E., VILKAS, E. & LEDERER, E. (1971)  
Cellular reaction in the footpad and draining lymph nodes of mice induced by mycobacterial fractions and BCG bacilli.  
Infect. Immunity, 4, 245 (57 ; 78)
- 27 - BEKIERKUNST, A., YARKONI, E., FLECHNER, I., MORECKI, S., VILKAS, E. & LEDERER, E. (1971)  
Immune response to sheep red blood cells in mice pretreated with mycobacterial fractions.  
Infect. Immunity, 4, 256 (79)
- 28 - BEKIERKUNST, A., WANG, L., TOUBIANA, R., & LEDERER, E. (1974)  
Immunotherapy of cancer with non living BCG and fractions derived from mycobacteria : role of cord factor (trehalose-6-6'-dimycolate) in tumor regression.  
Infect. Immunity, 10, 1044 (78)
- 29 - BENNETT, B. (1965)  
Specific suppression of tumour growth by isolated peritoneal macrophages from immunized mice.  
J. Immunol., 95, 656 (62 ; 64)



- 30 - BERNSTEIN, I.D., THOR, D.E., ZBAR, B. & RAPP, H.J. (1971)  
Tumor immunity : Tumor suppression in vivo initiated by soluble products of specifically stimulated lymphocytes.  
*Science*, 172, 729 (69)
- 31 - BINAGHI, R.A. & BENACERRAF, B. (1964)  
The production of anaphylactic antibody in the rat.  
*J. Immunol.*, 92, 920 (146)
- 32 - BIOZZI, G., BENACERRAF, B. & HELPERN, B.N. (1953)  
Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. II - A study of the kinetics of the granuloplectic activity of the RES in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organ and their activity.  
*Brit. J. Exp. Path.*, 34, 441 (48)
- 33 - BIOZZI, G., BENACERRAF, B., GRUMBACH, F., HALPERN, B., LEVADITI, J. & RIST, N. (1954)  
Etude de l'activité granulopexique du SRE au cours de l'infection tuberculeuse expérimentale de la souris.  
*Ann. Inst. Pasteur*, 87, 291 (67)
- 34 - BIOZZI, G., BENACERRAF, B. & HALPERN, B.N. (1955)  
The effect of S. typhi and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in mice.  
*Brit. J. exp. Path.*, 36, 227 (67)
- 35 - BIOZZI, G., STIFFEL, C., HALPERN, B.N. & MOUTON, D. (1959)  
Effet de l'inoculation du bacille Calmette-Guérin sur le développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris.  
*C.R. Soc. Biol.*, 153, 987 (63)
- 36 - BIOZZI, G., HOWARD, J.G., MOUTON, D. & STIFFEL, C. (1965)  
Modifications of graft-versus host reaction induced by pretreatment of the host with M. tuberculosis and C. parvum.  
*Transplant.*, 3, 170 (47)
- 37 - BLANDEN, R.V., MACKANESS, G.B. & COLLINS, F.M. (1966)  
Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid.  
*J. Exp. Med.*, 124, 585 (62)
- 38 - BLOCH, H. (1950)  
Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms.  
*J. Exp. Med.*, 91, 197 (57)
- 39 - BLOCH, K.J. (1967)  
The anaphylactic antibodies of mammals including man.  
*Prog. Allergy*, 10, 84 (18)

- 40 - BLOCH, K.J., OHMAN, J.L., WALTIN, J. & GYGAN, R.W. (1973)  
Potentiated reagin response : initiation with minute doses of antigen and alum followed by infection with Nippostrongylus brasiliensis.  
*J. Immunol.*, 110, 197 (50)
- 40 bis - BONA, C., DAMAIS, D., JUY, D. & CIORBARU, R. (1974)  
Immunological properties of water soluble extracts of Nocardia.  
in "Les immunostimulants bactériens", Résumé des communications au  
Symposium international, Institut Pasteur, Paris, P. 19 (80)
- 41 - BONA, C., DAMAIS, C. & CHEDID, L. (1974)  
Blastic transformation of mouse spleen lymphocytes by a water-soluble mitogen extracted from Nocardia.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 1602 (56 ; 80)
- 42 - BONA, C., CHEDID, L., DAMAIS, C., CIORBARU, R., SHEK, P.N., DUBISKI, S. & CINADER, B. (1975)  
Blast transformation of rabbit B-derived lymphocytes by a mitogen extracted from Nocardia.  
*J. Immunol.*, 114, 348 (56)
- 43 - BOUT, D., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1974)  
Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatique.  
*Ann. Immunol.*, 125C, 775 (115)
- 44 - BOUT, D., CAPRON, A., DUPAS, H. & CAPRON, M. (1974)  
Characterization of S. mansoni antigens.  
IIIrd International Congress of Parasitology, Munchen (14)
- 45 - BOYDEN, S.V. (1964)  
Cytophilic antibody in guinea pigs with delayed-type hypersensitivity.  
*Immunology*, 7, 474 (67)
- 46 - BRADLEY, D.J. & Mc CULLOUGH, F.S. (1973)  
Egg output stability and the epidemiology of Schistosoma haematobium.  
II - Analysis of the epidemiology of endemic S. haematobium.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67, 491 (7)
- 47 - BRAUN, W & NAKANO, M. (1967)  
Antibody formation : stimulation by polyadenylic and polycytidylic acids.  
*Science*, 157, 819 (48)
- 48 - BRETSCHER, P.A. (1975)  
The two signal model for B cell induction.  
*Transplant. Rev.*, 23, 37 (34)
- 49 - BROSTOFF, J., GREAVES, M.F. & ROITT, I.M. (1969)  
IgE in lymphoid cells from pollen-stimulated cultures.  
*Lancet*, 1, 803 (36)
- 50 - BRUCE, J.I., VON LICHTENBERG, F., SCHOENBECHLER, M.J. & HICKMAN, R.L. (1966)  
The role of splenectomy in the natural and acquired resistance of Rhesus monkeys to infection with S. mansoni.  
*J. Parasit.*, 52, 831 (13)

- 51 - BRYCESON, A.D.M., BRAY, R.S. & DUMONDE, D.C. (1974)  
Experimental cutaneous leishmaniasis. IV - Selective suppression of cell-mediated immunity during the response of guinea-pigs to infection with Leishmania enriettii.  
Clin. Exp. Immunol., 16, 189 (27)
- 52 - BULLOCK, W.E. (1974)  
Disturbance of T-lymphocyte circulation kinetics by infection with M. lepraemurium.  
Inst. J. Lepr., 41, 545 (28):
- 53 - BULLOCK, W.W. & ANDERSSON, J. (1973)  
Mitogens as probes for immunocyte regulation : specific and non-specific suppression of B-cell mitogenesis.  
in "Immunopotential" Ciba Found. Symp., 18, 173 (50)
- 54 - BURNET, F. (1959)  
The clonal selection theory of acquired immunity.  
Cambridge University Press, London (33)
- 55 - BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.H. (1974)  
Antibody-dependant cell-mediated damage to schistosomula in vitro.  
Nature, 252, 503 (21 ; 198)
- 56 - BUTTERWORTH, A.D., STURROCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A.F., SHER, A. & REES, P.H. (1975)  
Eosinophils as mediators of antibody-dependant damage to schistosomula.  
Nature, 256, 727 (21)
- 57 - CALDERON, J., WILLIAMS, R.T. & UNANUE, E.R. (1974)  
An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 4273 (72)
- 58 - CALDERON, J. & UNANUE, E.R. (1974)  
The release of antigen molecules from macrophages : characterization of the phenomena.  
J. Immunol., 112, 1804 (41)
- 59 - CALDERON, J. & UNANUE, E.R. (1975)  
Two biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exudate cells.  
Nature, 253, 359 (41)
- 60 - CALDERON, J., KIELY, J.M., LEFKO, J.L. & UNANUE, E.R. (1975)  
The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages  
I - Description and partial biochemical analysis.  
J. Exp. Med., 142, 151 (81).
- 61 - CAMUS, D. (1974)  
Les phénomènes d'hypersensibilité retardée dans la schistosomiase humaine à Schistosoma mansoni.  
Thèse pour le Doctorat en Médecine, Lille.

- 62 - CAPPUCCINELLI, P., FRENZEL-BEYME, R.R., SENA, L. & CAVALLO, G. (1971)  
Immunoglobulins and parasitic infections. II - Significance of raised IgE levels indifferent protozoal and helminthic infections.  
G. Batt. Virol. Immunol., 64, 162 (18)
- 63 - CAPRON, A., BIGUET, J., ROSE, F. & VERNES, A. (1965)  
Les antigènes de S. mansoni. II - Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de S. mansoni.  
Ann. Inst. Pasteur, 109, 798 (14)
- 64 - CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. & AFCHAIN, D. (1968)  
Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-culture.  
Path. Biol., 16, 121 (14)
- 65 - CAPRON, A., WATTRE, P., CAPRON, M. & LEFEBVRE, M.N. (1972)  
Influence du parasitisme à Dipetalonema vitae et à Schistosoma mansoni sur la croissance de tumeurs expérimentales.  
C.R. Acad. Sci., 275, 719 (64)
- 66 - CAPRON, A., CAPRON-DUPONT, M., CAMUS, D. & VERNES, A. (1972)  
Les phénomènes d'hypersensibilité dans les bilharzioses humaines. II - Etude in vitro de l'activité létale des sérums de malades pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapports avec les tests d'hypersensibilité.  
Soc. Franç. d'Immunol., Paris (13)
- 67 - CAPRON, A., CAPRON, M., CAMUS, D. & VERNES, A. (1973)  
Les phénomènes d'hypersensibilité au cours des schistosomioses humaines à Schistosoma mansoni et Schistosoma haematobium. II - Etude in vitro de l'activité létale des sérums de malades pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapports avec les tests d'hypersensibilité.  
Path. Biol., 21, 1079 (13 ; 14 ; 20)
- 68 - CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. & PETITPREZ, A. (1974)  
Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiose humaine et expérimentale. I - Etude comparative in vitro de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de Schistosoma mansoni.  
Intern. J. Parasitol., 4, 613 (13 ; 14 ; 16)
- 69 - CAPRON, A. (1974)  
Discussion de l'exposé de J.A. CLEGG "Host antigens and the immune response in schistosomiasis".  
in "Parasites in the immunized host : mechanism of survival", Ciba Found. Symp., Elsevier, Amsterdam, p. 181 (22)
- 70 - CAPRON, A., BAZIN, H., DESSAINT, J.P. & CAPRON, M. (1975)  
Macrophage adherence mediated by specific IgE antibodies.  
IRCS, 3, 52 (22 ; 149)

- 71 - CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. & BAZIN, H. (1975)  
Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules.  
*Nature*, 253, 474 (22 ; 66 ; 149 ; 165)
- 72 - CAPRON, A., CAPRON, M., BOUT, D., ROUSSEAU, R. & BAZIN, H. (1975)  
IgE in immunity to schistosomes in the rat.  
European Immunol. Meeting, Amsterdam, sept. 16 - 19 (23 ; 24 ; 11)
- 73 - CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. (1975)  
A role for IgE in protective immunity.  
*IRCS Med. Sci.*, 3, 477 (18 ; 169)
- 74 - CAPRON-DUPONT, M. (1974)  
Les mécanismes de cytotoxicité dans la bilharziose humaine et expérimentale. Rapports avec l'immunité.  
Thèse pour le Doctorat en Pharmacie, Lille (8 ; 15 ; 20 ; 25 ; 26 ; 74 ; 149 ; 150).
- 75 - CARDELLA, C.J., DAVIES, P. & ALLISON, A.C. (1974)  
Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages.  
*Nature*, 247, 46 (72)
- 76 - CARLIER, Y. (1975)  
Les antigènes circulants dans la schistosomiase. Mise en évidence d'un antigène parasitaire dans les urines de patients infectés par Schistosoma mansoni.  
Thèse pour le Doctorat en Médecine, Lille (9 ; 10)
- 77 - CARSON, D., METZGER, H. & BAZIN, H. (1974)  
A simple radio-immunoassay for the measurement of human and rat IgE levels by ammonium sulfate precipitation.  
*J. Immunol.*, 115, 561 (129 ; 192)
- 78 - CHEDID, L., PARANT, M., PARANT, F., GUSTAFSON, R.H. & BERGER, F.M. (1972)  
Biological study of a non toxic, water-soluble immunoadjuvant from mycobacterial cell-walls.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 855 (53)
- 79 - CHEDID, L. & LAMENSANS, A. (1974)  
Experimental screening of systemic adjuvants extracted from Mycobacteria. in "Investig" & "Stimul. Immun. Cancer Patients", P. 166, Mathé, G. & Weiner, R., eds., Springer Verlag (53)
- 80 - CHIHARA, G., MAEDA, Y.Y., HAMURO, J., SASAKI, T. & FUKUOKA, F. (1969)  
Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.) Sing.  
*Nature*, 222, 687 (50)

- 81 - CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1970)  
The use of in vitro cultivation in study of immunity against schistosomes.  
J. Parasit., 56, 56 (13)
- 82 - CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1972)  
The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of S. mansoni  
during cultivation in vitro.  
Int. J. Parasit., 2, 79 (13 ; 20 ; 150)
- 83 - COHN, M. & BLOMBERG, G. (1975)  
The self-non self discrimination : A one - or two - signal mechanism ?  
Scand. J. Immunol., 4, 1 (34)
- 84 - COHN, Z.A. & MORSE, S.I. (1960)  
Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes.  
J. Exp. Med., 111, 689 (73)
- 85 - COHN, Z.A. & BENSON, B. (1965)  
The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry,  
and biochemistry.  
J. Exp. Med., 121, 153 (73)
- 86 - COHN, Z.A., HIRSCH, J.G. & FEDORKO, M.E. (1966)  
The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. IV - The ultrastruc-  
ture of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture.  
J. Exp. Med., 123, 747 (73)
- 87 - COLLINS, F.M. & MACKANESS, G.B. (1970)  
The relationship of delayed hypersensitivity to acquired antituberculous  
immunity. I - Tuberculin sensitivity and resistance to reinfection in  
BCG-vaccinated mice.  
Cell. Immunol., 1, 253 (27)
- 88 - CONCHIE, J., FINDLAY, J. & LEVY, G.A. (1959)  
Mammalian glycosidases. Distribution in the body.  
Biochem., 71, 318 (201)
- 89 - COOPER, M.D., KINCADE, P.W. & LAWTON, H.R. (1971)  
in "Proceedings of the IIIrd Intern. Congress on lymphatic tissue and  
germinal centres in immune reactions", Upssala (36)
- 90 - COULAUD, D. (1935)  
Caractères de l'état allergique observé chez les animaux de laboratoire  
après injection de bacilles de Koch enrobés dans la paraffine.  
C.R. Soc. Biol., 119, 368 (51)
- 91 - COUTINHO, A. & MOLLER, G. (1974)  
Immune activation of B. cells : evidence for one non-specific triggering  
signal not delivered by the Ig receptors.  
Scand. J. Immunol., 3, 133 (34)

- 92 - CRABBE, P.A., CARBONARA, A.O. & HEREMANS, J.F. (1965)  
The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing IgA immunoglobulins.  
Lab. Invest., 14, 235 (36)
- 93 - CRUCHAUD, A. & UNANUE, E.R. (1971)  
Fate and immunogenicity of antigens endocytosed by macrophages : A study using foreign red cells and immunoglobulin G.  
J. Immunol., 107, 1329 (41)
- 94 - CURREY, H.L.F. & ZIFF, M. (1968)  
Suppression of adjuvant disease in the rat by heterologous antilymphocyte globulin.  
J. Exp. Med., 127, 185 (49)
- 95 - DAMAIS, C., BONA, C., CHEDID, L., FLECK, J., NAUCIEL, C. & MARTIN, J.P. (1975)  
Mitogenic effect of bacterial peptidoglycans possessing adjuvant activity.  
J. Immunol., 115, 268 (56)
- 96 - DAMIAN, R.T. (1964)  
Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences  
Am. Nat., 98, 129 (14)
- 97 - DAMIAN, R.T. (1967)  
Common antigens between adult S. mansoni and the laboratory mouse.  
J. Parasit., 53, 60 (14)
- 98 - DANNENBERG, A.M. (1968)  
Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis : specificity, systemic and local nature and associated macrophage enzymes.  
Bacteriol. Rev., 32, 85 (72)
- 99 - DAVIES, Ph., ALLISON, A.C., ACKERMAN, J., BUTTERFIELD, A. & WILLIAMS, S. (1974)  
Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes.  
Nature, 251, 423 (72)
- 100 - DAVIES, Ph., PAGE, R.C. & ALLISON, A.C. (1974)  
Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolases in macrophages exposed to group A streptococcal cell wall substance.  
J. Exp. Med., 139, 1262 (72)
- 101 - DAVIES, P., ALLISON, A.C. & HASWELL, A.D. (1973)  
Selective release of lysosomal hydrolases from phagocytic cells by cytochalasin B.  
Biochem. J., 134 (72)

- 102 - DAVIS, B.J. (1964)  
Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 (183)
- 103 - DEAN, D.A., WISTAR, R. & MURRELL, K.D. (1974)  
Combined in vitro effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of S. mansoni.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 23, 420 (21)
- 104 - DEAN, D.A., WISTAR, R. & CHEN, P. (1975)  
Immune response of guinea pigs to Schistosoma mansoni. I - In vitro effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 24, 74 (21)
- 105 - DESSAINT, J.P. (1974)  
Les anticorps IgE spécifiques dans les affections parasitaires.  
Thèse de Doctorat en Médecine, Lille (18)
- 106 - DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BOUT, D. & CAPRON, A. (1975)  
Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (S. mansoni or S. haematobium).  
Clin. Exp. Immunol., 20, 427 (18)
- 107 - DIAMANTSTEIN, T. & ULMER, A. (1975)  
The antagonistic action of cyclic GMP and cyclic AMP on proliferation of B and T lymphocytes.  
Immunology, 28, 113 (81)
- 108 - DIENES, L. (1929)  
The technique of producing the tuberculin type of sensitization with egg-white in tuberculous guinea-pigs.  
J. Immunol., 17, 531 (51)
- 109 - DIMITRIU, A., DY, M., THOMSON, N. & HAMBURGER, J. (1975)  
Macrophage cytotoxicity in the mouse immune response against a skin allograft  
J. Immunol., 114, 195 (62)
- 110 - DOMINGO, E.O., COWAN, R.B.T. & WARREN, K.S. (1967)  
The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. I - Immunosuppressive drugs.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 16, 284 (25)
- 111 - DOMINGO, E.O. & WARREN, K.S. (1967)  
The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. II - Thymectomy.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 51, 757 (25)



- 112 - DOMINGO, E.O. & WARREN, K.S. (1968)  
The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. III - Heterologous anti-lymphocyte serum.  
Amer. J. Path., 52, 613 (24)
- 113 - DRESSER, D.W. (1961)  
The effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants.  
Nature, 191, 1171 (33 ; 44)
- 114 - DRESSER, D.W. (1962)  
Specific inhibition of antibody production. II - Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen.  
Immunology, 5, 378 (44)
- 115 - DRESSER, D.W. (1968)  
Adjuvanticity of vitamin A.  
Nature, 217, 527 (46)
- 116 - DRESSER, D.W. & MITCHISON, N.A. (1968)  
The mechanism of immunological paralysis.  
Adv. Immunol., 8, 129 (44)
- 117 - DRESSER, D.W. (1970)  
The immune response : circumvention and suppression.  
Proceedings IVth Intern. Congress on Pharmacology, 4, 192 (34)
- 118 - DRESSER, D.W. & PHILLIPS, J.M. (1974)  
The orientation of the adjuvant activities of Salmonella typhosa lipopolysaccharide and lentinan.  
Immunology, 27, 895 (50)
- 119 - DVORAK, A.M., HAMMOND, E.M., DVORAK, M.F. & KARNOVSKY, M.J. (1972)  
Loss of cell surface material from peritoneal exudate cells associated with lymphocyte-mediated inhibition of macrophage migration from capillary tubes.  
Lab. Invest., 27, 561 (70)
- 120 - DVORAK, H.F., DVORAK, A.M. & CHURCHILL, W.M. (1973)  
Immunologic rejection of diethylnitrosamine induced hepatomas in strain 2 guinea pigs. Participation of basophilic leukocytes and macrophage aggregates.  
J. Exp. Med., 137, 751 (70)
- 121 - DY, M., DIMITRIU, A., THOMSON, N. & HAMBURGER, J. (1974)  
A macrophage adherence test.  
Ann. Immunol., 125, 451 (70)
- 122 - ELBERG, S.S., SCHNEIDER, P. & FONG, J. (1957)  
Cross immunity between Brucella melitensis and Mycobacterium tuberculosis : intracellular behavior of Brucella melitensis in monocytes from vaccinated animals.  
J. Exp. Med., 106, 545 (63)

- 122 bis - ELLOUZ, F., ADAM, A., CIORBARU, R. & LEDERER, E. (1974)  
Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 1317 (56)
- 123 - ELVES, M.W. (1967)  
Suppression of antibody production by phytohemagglutinin.  
Nature, 213, 495 (49)
- 124 - EVANS, R. & ALEXANDER, P. (1970)  
Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity.  
Nature, 228, 620 (64 ; 71)
- 125 - EVANS, R. & ALEXANDER, P. (1971)  
Rendering macrophages specifically cytotoxic by a factor released from immune lymphoid cells.  
Transplantation, 12, 227 (64)
- 125 - EVANS, R. & ALEXANDER, P. (1972)  
Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages.  
Nature, 236, 168 (66)
- 126 - EVANS, R. & ALEXANDER, P. (1972)  
Role of macrophages in tumour immunity. I - Cooperation between macrophages and lymphoid cells in syngenic tumour immunity.  
Immunology, 23, 615 (64)
- 127 - EVANS, R., COX, H. & ALEXANDER, P. (1973)  
Immunologically specific activation of macrophages armed with the specific macrophage arming factor (SMAF)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 143, 256 (64)
- 128 - FAUVE, R.M. & HEVIN, M.B. (1971)  
Pouvoir bactéricide des macrophages spléniques et hépatiques de souris envers *Listeria monocytogenes*. Influence du traitement préalable des animaux par des glucocorticoïdes, une endotoxine, *Corynebacterium parvum* et l'acide polyinosinique, polycytidylique.  
Ann. Inst. Pasteur, 120, 399 (75 ; 80)
- 129 - FELDMANN, M. (1972)  
Cell interactions in the immune response in vitro. II - The requirement for macrophages in lymphoid cell collaboration.  
J. Exp. Med., 135, 1049 (38)
- 130 - FELDMANN, M. & BASTEN, A. (1972)  
Cell interactions across a cell impermeable membrane in vitro.  
Nature, 237, 13 (38)
- 131 - FELDMANN, M. & NOSSAL, G.J.V. (1972)  
Tolerance, enhancement, and the regulation of interactions between T-cells, B-cells and macrophages.  
Transplant. Rev., 13, 3 (65)
- 132 - FELDMANN, M. (1973)  
Induction of B. cell tolerance by antigen specific T cell factor.  
Nature, N. Biol., 242, 82 (39)

- 133 - FELDMANN, M., GREAVES, M.F., PARKER, D.C. & RITTENBERG, M.B. (1974)  
Direct triggering of B lymphocytes by insolubilized antigen.  
*Europ. J. Immunol.*, 4, 591 (39)
- 134 - FELDMANN, M., HOWARD, J.G. & DESAYMARD, C. (1975)  
Role of antigen structure in the discrimination between tolerance and immunity by B cells.  
*Transpl. Rev.*, 23, 78 (42)
- 135 - FILKINS, J.P. (1971)  
Hepatic lysosomes and inactivation of endotoxin.  
*J. Reticuloendothel. Soc.*, 9, 480 (74)
- 136 - FILKINS, J.P. (1971)  
Comparison of endotoxin detoxification by leucocytes and macrophages.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1396 (74)
- 137 - FISHER, D.B. & MULLER, G.C. (1968)  
An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60, 1396 (49)
- 138 - FISHMAN, M. & ADLER, F.M. (1963)  
Antibody formation initiated in vitro. II - Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen.  
*J. Exp. Med.*, 117, 595 (41)
- 139 - FOWLES, R.E., FAJARDO, I.M., LEIBOWITZ, J.L. & DAVID, J.R. (1973)  
The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes.  
*J. Exp. Med.*, 138, 952 (65)
- 140 - FREUND, J., CASALS, J. & HOSMER, E.P. (1937)  
Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil.  
*Proc. Soc. Exp. Biol.*, 37, 509 (51)
- 141 - FREUND, J. & LIPTON, M.M. (1955)  
Experimental allergic encephalomyelitis after the excision of the injection site of antigen-adjuvant emulsion.  
*J. Immunol.*, 75, 454 (46)
- 142 - FROST, P. & LANCE, E.M. (1973)  
The relation of lymphocyte trapping to the mode of action of adjuvants. in "Immunopotential" Ciba Found. Symp., Elsevier, Amsterdam, p. 29 (42 ; 43)
- 143 - GALINDO, B. & MYRVIK, O.N. (1970)  
Migratory response of granulomatous alveolar cells from BCG-sensitized rabbits.  
*J. Immunol.*, 105, 227 (100)

- 144 - GALINDO, B. (1972)  
Antigen-mediated fusion of specifically sensitized rabbit alveolar macrophages.  
*Infect. Immunity*, 5, 583 (69)
- 145 - GERSHON, R.K., MOKYR, M.B. & MITCHELL, M.S. (1974)  
Activation of suppressor T cells by tumour cells and specific antibody.  
*Nature*, 250, 594 (27)
- 146 - GERY, I. & WAKSMAN, B.H. (1972)  
Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II - The cellular source of potentiating mediators.  
*J. Exp. Med.*, 136, 143 (42 ; 81)
- 147 - GODAL, T., REES, R.J.W. & LAMVIK, J.O. (1971)  
Lymphocyte-mediated modification of blood-derived macrophage function in vitro ; inhibition of growth of intracellular Mycobacteria with lymphokines.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 8, 625 (65)
- 148 - GOLDBERG, J.A. & RUTENBURG, A.M. (1958)  
The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases.  
*Cancer*, 11, 283 (205)
- 149 - GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. & SMITH, E.E. (1965)  
Protein-carbohydrate interaction. I - The interaction of polysaccharides with Concanavalin A.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 97, 68 (49)
- 150 - GOLUB, E.S. & WEIGLE, W.O. (1967)  
Studies on the induction of immunologic unresponsiveness. I - Effects of endotoxin and phytohaemagglutinin.  
*J. Immunol.*, 98, 1241 (46)
- 151 - GORER, P.A. (1956)  
Some recent work on tumour immunity.  
*Adv. Cancer Research*, 4, 149 (62)
- 152 - GOWANS, J.L. & MC GREGOR D.D. (1965)  
The immunological activities of lymphocytes.  
*Progr. Allergy*, 9, 1 (33)
- 153 - GOWANS, J.L. & UHR, J.W. (1966)  
The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat.  
*J. Exp. Med.*, 124, 1017 (35)
- 154 - GRANGER, G.A. & WEISER, R.S. (1966)  
Homograft target cells : contact destruction in vitro by immune macrophages.  
*Science*, 151, 97 (66)

- 155 - GREAVES, M., JANOSSY, G., FELDMANN, M. & DOENHOFF, M. (1974)  
Polyclonal mitogens and the nature of B lymphocyte activation mechanisms.  
in "The immune system", p. 271, E.E. Sercarz, A.R. Williamson & C.F. Fox ,  
eds., Acad. Press N.Y. (35)
- 156 - GREENWOOD, B.M. (1974)  
Immunosuppression in malaria and trypanosomiasis.  
in "Parasites in the immunized host : mechanisms of survival", Ciba Found.  
Symp. 25, Elsevier, Amsterdam, p. 137 (27)
- 157 - HALL, J.G. & MORRIS, B. (1965)  
The immediate effect of antigens on the cell out put of a lymph node.  
Brit. J. Exp. Path. 46, 450 (28)
- 158 - HALPERN, B.N., PREVOT, A.R., BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D.,  
MORARD, J.C., BOUTHILLIER, Y. & DECREUSEFOND, C. (1963)  
Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial  
provoquée par Corynebacterium parvum.  
J. Reticuloendoth. Soc., 1, 77 (67)
- 159 - HALPERN, B.N., BIOZZI, G., STIFFEL, C. & MOUTON, D. (1966)  
Inhibition of tumour growth by administration of killed Corynebacterium  
parvum.  
Nature, 212, 853 (63)
- 160 - HAMMOND, E.M. & DVCRACK, M.F. (1972)  
Antigen-induced stimulation of glucosamine incorporation by guinea pig  
peritoneal macrophages in delayed hypersensitivity.  
J. Exp. Med., 136, 1518 (70)
- 161 - HARD, G.C. (1970)  
Some biochemical aspects of the immune macrophage.  
Brit. J. Exp. Pathol., 51, 97 (72)
- 162 - HART, P. D'ARCY & ARMSTRONG, J.A. (1974)  
Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with  
Mycobacterium tuberculosis.  
Infect. Immunity, 10, 742 (75)
- 163 - HEISE, E.R., HAN, S. & WEISER, R.S. (1968)  
In vitro studies on the mechanism of macrophage migration inhibition in  
tuberculin sensitivity.  
J. Immunol., 101, 1004 (68)
- 164 - HEISE, E.R. & WEISER, R.S. (1969)  
Factors in delayed sensitivity : lymphocyte and macrophage cytotoxins in  
the tuberculin reaction.  
J. Immunol., 103, 570 (72)

- 165 - HERBERT, W.J. (1968)  
The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice.  
*Immunol.*, 14, 301 (45)
- 166 - HESS, M.W. & LUSCHER, E.F. (1970)  
Macrophage receptors for IgG aggregates.  
*Experimental cell Research*, 59, 193 (68)
- 167 - HEYMER, B., BULTMANN, B., SCHACHENMAYR, W., SPANEL, R., HAFERKAMP, O. & SCHMIDT, W. (1973)  
Migration inhibition of rat peritoneal cells induced by streptococcal mucopeptides. Characteristics of the reaction and properties of the mucopeptide preparations.  
*J. Immunol.*, 111, 1743 (56)
- 168 - HIBBS, J.B., LAMBERT, L.H. & REMINGTON, J.S. (1971)  
Tumour resistance conferred by intracellular protozoa.  
*J. Clin. Invest.*, 50, 45a (63)
- 169 - HIBBS, J.B.Jr, LAMBERT, L.H.Jr & REMINGTON, J.S. (1972)  
Possible role of macrophage mediated non specific cytotoxicity in tumour resistance.  
*Nature, New Biol.*, 235, 48 (63 ; 66)
- 170 - HIBBS, J.B. (1974)  
Heterocytolysis by macrophages activated by Bacillus Calmette-Guérin : Lysosome exocytosis into tumor cells.  
*Science*, 184, 468 (74)
- 171 - HILLEMANN, M.R., WOODHOUR, A., FRIEDMAN, A., WEIBEL, R.E. & STOKES J.Jr (1972)  
The clinical application of adjuvant 65.  
*Ann. Allergy*, 30, 152 (52)
- 172 - HIU, I.J. (1972)  
Water-soluble and lipid-free fraction from BCG with adjuvant and anti-tumour activity.  
*Nature, New Biol.*, 238, 241 (53 ; 79)
- 173 - HOGARTH-SCOTT, R.S., JOHANSSON, S.G.O. & BENNICH, H. (1969)  
Antibodies to Toxocara in the sera of visceral Larva migrans patients : the significance of raised levels of IgE.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 5, 619 (18)
- 174 - HOLT, L.B. (1950)  
Developments in diphtheria prophylaxis.  
Heinemann, London

- 175 - HSU, S.Y.Li & HSU, H.F. (1963)  
Further studies on Rhesus monkeys immunized against S. japonicum by administration of cercariae of the Formosan strain.  
*Z. Tropen Med. Parasit.*, 14, 506 (9)
- 176 - HUANG, K.Y., DONAHOE, R.M., GORDON, F.B. & DRESSLER, H.R. (1971)  
Enhancement of phagocytosis by interferon containing preparations.  
*Infect. Immunity*, 4, 581 (69)
- 177 - HUBER, H. & FUNDENBERG, H.H. (1968)  
Receptor sites of human monocytes for IgG.  
*Int. Arch. Allergy*, 34, 18 (67)
- 178 - HUBER, H., DOUGLAS, S.D., NUSBACHER, J., KOCHWA, S. & ROSENFELD, R.E. (1971)  
IgG subclass specificity of human monocyte receptor sites.  
*Nature*, 229, 419 (67)
- 179 - HUBSCHER, T. (1975)  
Role of the eosinophil in the allergic reactions. I - EDI - An eosinophil - derived inhibitor of histamine release.  
*J. Immunol.*, 114, 1379 (19)
- 180 - HUMPHREY, J.H. (1969)  
The fate of antigen and its relationship to the immune response. The complexity of antigens.  
in "The immune response and its suppression", p. 7, Sorkin, E., ed. (Antibiot. Chemother. 15), Karger, Bâle (47)
- 181 - HUNTER, G.W.III, GARCIA, B.S., CRANDALL, R.B., ZICKAFOOSE, D.E. & SENTERFITT, V. (1967)  
Studies on schistosomiasis. XXI - Attempts to enhance resistance challenge infection by transfer of cells and parabiosis.  
*J. Philipp. Med. Asso.*, 1967, 43, 417 (26)
- 182 - ISHITANI, K., NIITSU, Y. & LISTOWSKY, I. (1975)  
Characterization of the different polypeptide components and analysis of subunit assembly in ferritin.  
*J. Biol. Chem.*, 250, 3142 (92)
- 183 - ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & HORN BROOK, M.M. (1966)  
Physicochemical properties of reaginic antibody. V - Correlation of reaginic activity with  $\gamma$ E globulin antibody.  
*J. Immunol.*, 97, 840 (17)
- 184 - JACOBS, D., YASHPHE, D.T. & ABRAHAM, C. (1974)  
Stimulation of T cell activity by a methanol-extraction residue (MER) of BCG.  
in "Stimul. Immun. Cancer Patients," 183, G. Mathé, ed. (59)

- 185 - JANOFF, A., WEISSMANN, G., ZWEIFACH, B.W. & THOMAS, L. (1962)  
Pathogenesis of experimental shock. IV - Studies on lysosomes in normal and tolerant animals subjected to lethal trauma and endotoxemia.  
*J. Exp. Med.*, 116, 451 (73)
- 186 - JARRETT, E.E.E., HENDERSON, D., RILEY, P. & WHITE, R.G. (1972)  
The effect of various adjuvant regimens and of nematode infection on the reaginic antibody response to egg-albumin in the rat.  
*Int. Arch. Allergy*, 42, 775 (50)
- 187 - JARRETT, E.E.E. & STEWART, D.C. (1974)  
Rat IgE production. I - Effect of dose of antigen on primary and secondary reaginic antibody responses.  
*Immunology*, 27, 365 (146)
- 188 - JARRETT, W.F.H., MILLER, H.R.P. & MURRAY, M. (1973)  
Immunological mechanisms in mucous membranes.  
in "Symp. on resistance to infectious diseases", cité par STANWORTH, D.R. (Immediate hypersensitivity. The molecular basis of the allergic response. in "Frontiers of Biology", Elsevier, N°28) (44)
- 189 - JOHNSON, H.G. & JOHNSON, A.G. (1971)  
Regulation of the immune system by synthetic polynucleotides. II - Action on peritoneal exudate cells.  
*J. Exp. Med.*, 133, 649 (48 ; 64)
- 190 - JOHNSON, A.G., MA, B., MURPHY, W.H. & NOWOJNY, A. (1974)  
Activation of tumor immunity in vitro by toxic and non toxic bacterial adjuvants.  
in "Les Immunostimulants bactériens", Résumé des Communications au Symposium international, Institut Pasteur, Paris, P. 27 (79)
- 190 bis - JOHNSON, J.D., HAND, W.L., KING, N.L. & HUGHES, C.G. (1975)  
Activation of alveolar macrophages after lower respiratory tract infection.  
*J. Immunol.*, 115, 80 (100)
- 191 - JOLLES, P. & PARAF, A. (1973)  
Chemical and biological basis of adjuvants.  
*Molec. Biol. Biochem. Biophys.*, 13, 1 (32)
- 192 - JONES, J.J., MC BRIDE, W.H. & WEIR, D.M. (1975)  
The in vitro killing of syngenic cells by peritoneal cells from adjuvant-stimulated mice.  
*Cell. Immunol.*, 18, 375 (66)
- 193 - JONES, T. & YOUNG, P.G. (1973)  
The in vitro inhibition of growth of intracellular Listeria monocytogenes by lymphocyte products.  
*Cell. Immunol.*, 9, 353 (65)
- 194 - JONES, V.E., EDWARDS, A.J. & OGILVIE, B.M. (1970)  
The circulation immunoglobulins in protective immunity to the intestinal stage of Nippostrongylus brasiliensis in the rat.  
*Immunology*, 18, 621 (19)



- 195 - JONES, T.C. & HIRSCH, J.G. (1972)  
The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II - The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.  
J. Exp. Med., 136, 1173 (75)
- 196 - JONES, V.E. & OGILVIE, B.M. (1971)  
Protective immunity to Nippostrongylus brasiliensis : the sequence of events which expels worms from rat intestine.  
Immunology, 20, 259 (19)
- 197 - JOSEPH, M., ROSS, P. & PLANCOT, M.T. (1970)  
Obtention d'antigènes mycobactériens par une technique de broyage utilisant des zéolithes de synthèse.  
Ann. Inst. Pasteur, Lille, 21, 67 (88 ; 179)
- 198 - JOSEPH, M. (1974)  
Modifications de l'équipement enzymatique des macrophages alvéolaires en survie in vitro.  
Rev. Franç. Maladies Resp., 2 (Suppl. 1), 42 (72)
- 199 - JUY, D. & CHEDID, L. (1974)  
Activation de macrophages péritonéaux de souris par des immuno-adjuvants purifiés d'origine bactérienne.  
Soc. Franç. Immunol., 19 et 10 décembre, communication N° 50 (80)
- 200 - KAGAN, I.G. (1952)  
Acquired immunity in mice infected with S. douthittii.  
J. Infect. Dis., 93, 200 (11)
- 201 - KATO, L. & GOZSY, B. (1964)  
Studies on the pathophysiology of experimental murine leprosy : reticulo-endothelial, capillary and mast cell responses.  
Rev. Can. Biol., 23, 217 (81)
- 202 - KATO, M. (1971)  
Site of action of the cord-factor of Corynebacterium diphtheriae in mitochondria.  
J. Bacteriol., 107; 746 (57)
- 202 bis - KATO, M. (1973)  
Immunological properties of anti-cord factor antibody.  
Infect. Immunity, 7, 9 (57)
- 203 - KATZ, D.H. & UNANUE, C.R. (1973)  
Critical role of determinant presentation in the induction of specific responses in immunocompetent lymphocytes.  
J. Exp. Med., 137, 967 (39)
- 204 - KATZ, D.H., HAMAOKA, T., NEWBURGER, P.E. & BENACERRAF, B. (1974)  
Hapten-specific IgE antibody responses in mice. IV - Evidence for distinctive sensitivities of IgE and IgG lymphocytes to the regulatory influences of T cells.  
J. Immunol., 113, 974 (38).

- 205 - KAY, A.B., STECHSCHULTE, D.J. & AUSTEN, K.F. (1971)  
An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis.  
*J. Exp. Med.*, 133, 602 (17)
- 206 - KELLER, H.U. & SORKIN, E. (1967)  
Studies on chemotaxis. VII - Cytotaxins in rabbit serum.  
*Experientia*, 23, 549 (78)
- 207 - KELLER, R., OGILVIE, B.M. & SIMPSON, E. (1971)  
Tumour growth in nematode infected animals.  
*Lancet*, i, 678 (63)
- 208 - KELLER, R. & JONES, V.E. (1971)  
Role of activated macrophages and antibody in inhibition and enhancement  
of tumour growth in rats.  
*Lancet*, ii, 847 (64 ; 65 ; 68)
- 209 - KELLER, R. (1973)  
Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells in vitro by non speci-  
fically activated macrophages.  
*J. Exp. Med.*, 138, 625 (66)
- 210 - KIM, Y.B., BRADLEY, S.G. & WATSON, D.W. (1967)  
Ontogeny of the immune response. IV - The role of antigen elimination in  
the true primary immune response in germ-free, colostrum-deprived piglets.  
*J. Immunol.*, 99, 320 (47)
- 211 - KIND, L.S. & ROFFLER, S.K. (1961)  
Reduction of the anaphylaxis enhancing and adjuvant effects of Bordetella  
pertussis by a prior injection of B. pertussis.  
*J. Immunol.*, 86, 324 (33)
- 212 - KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. (1972)  
Regulation of antibody response in vitro. IV - Heavy chain antigenic deter-  
minants on hapten-specific memory cells.  
*J. Immunol.*, 109, 1163 (36)
- 213 - KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. (1973)  
Regulation of antibody response in vitro. VI - Carrier specific helper cells  
for IgG and IgE antibody response.  
*J. Immunol.*, 111, 720 (37)
- 214 - KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. (1973)  
Regulation of antibody response in vitro. VII - Enhancing soluble factors  
for IgG and IgE antibody response.  
*J. Immunol.*, 111, 1194 (38)
- 214  
bis - KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. (1974)  
Regulation of antibody response in vitro. VIII - Multiplicity of soluble  
factors released from carrier-specific cells.  
*J. Immunol.*, 112, 1685 (38)
- 215 - KISHIMOTO, T. & ISHIZAKA, K. (1975)  
Immunologic and physiochemical properties of enhancing soluble factors.  
*J. Immunol.*, 114, 1177 (38)

- 216 - KLOETZEL, K. (1967)  
Egg and pigment production in S. mansoni infections of the white mouse.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 293 (7)
- 217 - KOGA, T., ISHIZAKA, T., SUGIYAMA, K. & TANAKA, A. (1969)  
Immunological adjuvants. III - A preliminary report about the mode of action of mycobacterial adjuvants and further confirmation of adjuvant activity of acetylated Wax D.  
*Int. Arch. Allergy*, 36, 233 (49)
- 218 - KOJIMA, S., YOKOGAWA, M. & TADA, T. (1972)  
Raised levels of serum IgE in human helminthiasis.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 913 (18)
- 219 - KOTANI, S., HASHIMOTO, S., MATSUBARA, T., KATO, K., HARADA, K., KOGAMI, J., KITAURA, T. & TANAKA, A. (1963)  
Lysis of isolated BCG cell walls with enzymes. II - Demonstration of "bound-wax D" as a component of BCG cell wall.  
*Biken's J.*, 6, 181 (53)
- 220 - KRAHENBUHL, J.L. & REMINGTON, J.S. (1971)  
In vitro induction of non-specific resistance in macrophages by specifically sensitized lymphocytes.  
*Infect. Immunity*, 4, 337 (65)
- 221 - KRAHENBUHL, J.L., ROSENBERG, L.T. & REMINGTON, J.S. (1973)  
The role of thymus-derived lymphocytes in the in vitro activation of macrophages to kill Listeria monocytogenes.  
*J. Immunol.*, 111, 992 (65)
- 222 - KRAHENBUHL, J.L., LEVY, L. & REMINGTON, J.S. (1974)  
Resistance to Mycobacterium leprae in mice infected with Toxoplasma condii and Besnoitia jellisoni.  
*Infect. Immunity*, 10, 1068 (63)
- 223 - KRAMER, J.J. & GRANGER, G.A. (1972)  
The in vitro induction and release of a cell toxin by immune C56 Bl/6 mouse peritoneal macrophages.  
*Cell. Immunol.*, 3, 88 (72)
- 224 - KREISLER, J.M. & MÖLLER, G. (1974)  
Effect of PPD on the specific immune response to heterologous red cells in vitro.  
*J. Immunol.*, 112, 151 (60)
- 225 - KUSEL, J.R. & MACKENZIE, P.E. (1975)  
The measurement of the relative turnover rates of proteins of the surface membranes and other fractions of Schistosoma mansoni in culture.  
*Parasitology*, 71, 261 (11)

- 226 - KUSEL, J.R., MACKENZIE, P.E. & MC LAREN, D.J. (1975)  
The release of membrane antigens into culture by adult Schistosoma mansoni.  
*Parasitology*, 71, 247 (11)
- 227 - KUPERMAN, O., YASHPHE, D.J., SHARF, S., BEN-EFRAIM, S. & WEISS, D.W.  
(1972)  
Non specific stimulation of cellular immunological responsiveness by a  
mycobacterial fraction.  
*Cell. Immunol.*, 3, 277 (79)
- 228 - LAEMMLI, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
bacteriophage T4.  
*Nature*, 227, 680 (185)
- 229 - LANE, F.C. & UNANUE, E.R. (1973)  
Immunological events during Listeria monocytogenes infection in mice :  
adjuvanticity and immunogenicity of macrophage-bound antigens.  
*J. Immunol.*, 110, 829 (40)
- 230 - LAURELL, C.B. (1965)  
Antigen-antibody crossed electrophoresis.  
*Analyt. Biochem.*, 10, 358 (88 ; 182)
- 231 - LEHRER, S.B., VAUGHAN, J.H. & TAN E. M. (1975)  
Immunologic and biochemical properties of the histamine-sensitizing factor  
from Bordetella pertussis.  
*J. Immunol.*, 114, 34 (127)
- 232 - LEVINE, D.M. & KAGAN, I.G. (1960)  
Studies on the immunology of schistosomiasis by vaccination and passive  
transfer.  
*J. Parasit.*, 46, 787 (9)
- 233 - LEVINE, B.B. & VAZ, N.M. (1970)  
Effect of combination of inbred strains, antigen, and antigen dose on  
immune responsiveness and reagin production in the mouse.  
*Int. Arch. Allergy*, 39, 156 (38)
- 234 - LEVINE, B.B. & CHANG, H.Jr (1971)  
Effect of time interval between antigen injections on reagin and IgG<sub>1</sub>  
antibody titers in low dose immunization in mice.  
*Int. Arch. Allergy*, 40, 113 (38)
- 235 - LEWERT, R.M. & MANDLOWITZ, S. (1963)  
Innate immunity to S. mansoni relative to the state of connective tissue.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113, 54 (166)
- 236 - LOHMANN-MATTHES, M.L., ZIEGLER, F.G. & FISHER, H. (1973)  
Macrophage cytotoxicity factor. A product of in vitro sensitized thymus-  
dependent cells.  
*Eur. J. Immunol.*, 3, 56 (65)

- 237 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951)  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193, 265 (88 ; 199)
- 238 - MAC DONALD, J.K., CALLAHAN, P.X., ELLIS, S. & SMITH, R.E. (1971)  
Polypeptide degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C)  
and related peptidases.  
in "Tissue Proteinases", P. 69, Barrett, A.J. & Dingle, J.T., Elsevier,  
Amsterdam (203)
- 239 - Mc GREGOR, D.D. & LOGIE, P.S. (1975)  
The mediator of cellular immunity. X - Interaction of macrophages and  
specifically sensitized lymphocytes.  
Cell. Immunol., 18, 454 (70 ; 77)
- 240 - Mc IVOR, K.L. & WEISER, R.S. (1971)  
Mechanisms of target cell destruction by alloimmune peritoneal macrophages.  
II - Release of a specific cytotoxin from interacting cells.  
Immunology, 20, 315 (72 ; 75)
- 241 - MACKANESS, G.B. (1964)  
The immunological basis of acquired cellular resistance.  
J. Exp. Med., 120, 105 (63)
- 242 - MACKANESS, G.B. (1968)  
The immunology of antituberculous immunity.  
Amer. Rev. Resp. Dis., 97, 337 (63)
- 243 - MACKANESS, G.B. (1970)  
The mechanisms of macrophage activation.  
In "Infections agents and host reactions", p. 62, Stuart Mudd, ed., W.B.  
Saunders Company, Philadelphia, Pa (70)
- 244 - MACKANESS, G.B. (1971)  
Cellular immunity.  
Ann. Inst. Pasteur, 120; 428 (65)
- 245 - MAC MULLEN, D.B., RITCHIE, L.S., OLIVER-GONZALEZ, J. & KNIGHT, W.B. (1967)  
S. mansoni in Macaca mulatta. Long term studies on the course of primary  
and challenge infections.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 16, 620 (7)
- 246 - MADDISON, S.E., NORMAN, L., GEIGER, S.J. & KAGAN, I.G. (1970a)  
S. mansoni in the rat. I - Worm burden and serological response in infected,  
reexposed, and antigen-sensitized animals.  
J. Parasit., 56, 1058 (8 ; 12)
- 247 - MADDISON, S.E., GEIGER, S.J., BOTERO, B. & KAGAN, I.G. (1970b)  
S. mansoni infection in the rat. II - Effects of immuno-suppression and  
serum and cell transfer on innate and acquired immunity.  
J. Parasitol., 56, 1066 (26)

- 248 - MADDISON, S.E., GEIGER, S.J. & KAGAN, I.G. (1971)  
S. mansoni : immunity in Macaca mulatta.  
Exp. Parasit., 21, 463 (8 ; 12 ; 26)
- 249 - MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S. & PETERS, P.A. (1975)  
A role for the eosinophil in acquired resistance to Schistosoma mansoni  
infection as determined by antieosinophil serum.  
J. Exp. Med., 142, 805 (21)
- 250 - MARCHAL, G. (1975)  
Stimulation de la coopération entre lymphocytes T et B par l'E.B.P.  
in "International symposium on bacterial immunostimulants", Meeting report  
Institut Pasteur, Paris,  
Cell. Immunol., 17, 315 (80)
- 251 - MELSOM, H., KEARNY, G., GRUCA, S. & SELJELID, R. (1974)  
Evidence for a cytolytic factor released by macrophages.  
J. Exp. Med., 140, 1085 (72)
- 242 - MERRITT, K. & JOHNSON, A.G. (1963)  
Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. V - The influence of endotoxin and 5-fluoro-2-deoxyuridine on the primary antibody response of the BALB mouse to a purified protein antigen.  
J. Immunol., 91, 266 (46)
- 253 - MEYER, T.J., AZUMA, I. & RIBI, E.E. (1975)  
Biologically active components from mycobacterial cell walls. III - Production of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs.  
Immunol., 28, 219 (56)
- 254 - MICHAEL, J.G. & BERNSTEIN, I.L. (1973)  
Thymus dependence of reaginic antibody formation in mice.  
J. Immunol., 111, 1600 (37)
- 255 - MICHEL, J.F. (1952)  
Self-cure in infections of Trichostrongylus retortaeformis and its causation.  
Nature, 169, 881 (18)
- 256 - MIGLIORE, D. & JOLLES, P. (1968)  
Contribution to the study of the structure of adjuvant active waxes D from mycobacteria : isolation of a peptidoglycan.  
F.E.B.S. Letters, 2, 7 (53)
- 257 - MIGLIORE, S.D. & JOLLES, P. (1972)  
A hydrosoluble, adjuvant-active mycobacterial "polysaccharide-peptidoglycan". Preparation by a simple extraction technique of the bacterial cells (strain Peurois).  
FEBS Letters, 25, 301 (35 ; 79)

- 258 - MILLER, J.F.A.P., BASTEN, A., SPRENT, J. & CHEERS, C. (1971)  
Interaction between lymphocytes in immune responses.  
*Cell. Immunol.*, 2, 469 (35)
- 259 - MILLER, H.R.P. & JARRETT, W.F.H. (1971)  
Immune reactions in mucous membranes. I - Intestinal mast cell response during helminth expulsion in the rat.  
*Immunology*, 20, 277 (19)
- 260 - MISAKI, A., YUKAWA, S., TSUCHIYA, K. & YAMASAKI, T. (1966)  
Studies on cell walls of *Mycobacteria*. I - Chemical and biological properties of the cell walls and the mucopeptide of BCG.  
*J. Biochem. (Tokyo)*, 59, 388 (54)
- 261 - MISAKI, A., IKAWA, N., KATO, T. & KOTANI, S. (1970)  
Cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium phlei*.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 215, 405 (57)
- 262 - MITCHISON, N.A. (1967)  
Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the immune response.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 32, 431 (34)
- 262 bis - MITCHISON, N.A. (1968)  
Recognition of antigen.  
in "Differentiation and Immunology. K.B. WARREN, ed., Acad. Press., p. 729
- 263 - MITCHISON, N.A. (1969)  
The immunogenic capacity of antigen taken up by peritoneal exudate cells.  
*Immunology*, 16, i (39)
- 264 - MITCHISON, N.A. (1971)  
The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I - Measurement of the effect with the transfer cells and objections to the local environment hypothesis.  
*Eur. J. Immunol.*, 1, 10 (37)
- 265 - MITCHISON, N.A. (1971)  
The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II - Cellular cooperation.  
*Eur. J. Immunol.*, 1, 18 (37)
- 266 - MITCHISON, N.A. (1971)  
Cell interactions and receptor antibodies in immune region.  
A. CROSS, O. MAKELA & T.U. KOSUNEN, eds, P. 249, Acad. Press, N.Y. (36)
- 267 - MÖLLER, G. (1970)  
Induction of DNA synthesis in human lymphocytes : interaction between non specific mitogens and antigens.  
*Immunology*, 19, 583 (49)

- 268 - MOORE, R.D. & SCHONBERG, M.D. (1964)  
The response of the histiocytes and macrophages in the lungs of rabbits injected with Freund's adjuvant.  
Brit. J. Exp. Path., 45, 488 (49)
- 269 - MOSIER, D.E. & COPPLESON, L.W. (1968)  
A three cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 61, 542 (38)
- 270 - MUNOZ, J. (1964)  
Effect of bacteria and bacterial products on antibody response.  
Advanc. Immunol., 4, 397 (32)
- 271 - MURRAY, M., JARRETT, W.F.H. & JENNINGS, F.W. (1971a)  
Mast cells and macromolecules leak reactions. The influence of sex of rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.  
Immunology, 21, 17(19)
- 272 - MURRAY, M., MILLER, H.R.P., SANFORD, J. & JARRETT, W.F.H. (1971b)  
5-hydroxytryptamine in intestinal immunological reactions. Its relationship to mast cell activity and worm expulsion in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.  
Int. Arch. Allergy, 40, 236 (19)
- 273 - MURRAY, M., SMITH, W.D., WADELL, A.H. & JARRETT, W.F.H. (1971c)  
The effect of inhibition of histamine and 5-hydroxytryptamine on intestinal immunological reactions.  
Exp. Parasit., 30, 58 (19)
- 274 - MURRAY, M. (1972)  
Secretory antibody and local immunity : effector mechanisms of immediate hypersensitivity at mucosal surfaces.  
Proc. Roy. Soc. Med., 65, 659 (19)
- 275 - MURRELL, K.D. & CLAY, B. (1972)  
In vitro detection of cytotoxic antibodies to Schistosoma mansoni schistosomules.  
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 21, 569 (10 ; 13)
- 276 - MYRVANG, B., GODAL, T., RIDLEY, D.S., FROLAND, S.S. & SONG, Y.K. (1973)  
Immune responsiveness to Mycobacterium leprae and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy.  
Clin. Exp. Immunol., 14, 541 (27)
- 277 - MYRVIK, O.N., LEAKE, E.S. & FARISS, B. (1961)  
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in a high state of purity.  
J. Immunol. 86, 128 (100 ; 195)



- 278 - NAIMARK, D.H., BENENSON, A.S., OLIVER-GONZALEZ, J., MAC MULLEN, D.B. & RITCHIE, L.S. (1960)  
Studies of schistosomiasis in primates : observations on acquired resistance.  
Amer. J. Trop. Med. Hyge., 9, 430 (8)
- 279 - NASPITZ, C.K., BLENNERHASSETT, J.B., SINGHAL, S.K. & RICHTER, M. (1968)  
The action of phytohemagglutinin in rabbits. II - Histological changes in response to a "single" intravenous administration of phytohemagglutinin.  
Int. Arch. Allergy, 33, 389 (49)
- 280 - NATHAN, C.F., KARNOVSKY, M.L. & DAVID, J.R. (1971)  
Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes.  
J. Exp. Med., 133, 1356 (70)
- 281 - NAUCIEL, C., FLECK, J., MARTIN, J.P. & MOCK, M. (1973)  
Activité adjuvante de peptidoglycane de bactéries à Gram négatif dans l'hypersensibilité de type retardé.  
C.R. Acad. Sc., 276, 3499 (56)
- 282 - NELSON, D.S. & BOYDEN, S.V. (1961)  
The effect of tuberculin on peritoneal macrophages of normal and BCG-vaccinated guinea-pigs and mice.  
Med. Res., 1, 20 (68)
- 283 - NELSON, D.S. & BOYDEN, S.V. (1963)  
The loss of macrophages from peritoneal exudates following the injection of antigen into guinea-pigs with delayed-type hypersensitivity.  
Immunology, 6, 264 (68)
- 284 - NELSON, D.S. & NORTH, R.J. (1965)  
The fate of macrophages from peritoneal exudates following the injection of antigen into guinea pigs with delayed-type hypersensitivity.  
Lab. Invest., 14, 89 (68)
- 285 - NELSON, D.S. (1968)  
Macrophages and immunity.  
in A. Neuberger and E.L. Tatum eds., North-Holland Res. Monographs. Vol. XI, North-Holland, Amsterdam (62)
- 286 - NEWBURGER, P.E., HAMAOKA, T. & KATZ, D.H. (1974)  
Potentiation of helper T cell function in IgE antibody responses by bacterial lipopolysaccharide (LPS)  
J. Immunol., 113, 824 (50)
- 287 - TAM NGUYEN-DANG, HAYAT, M., CHENU, E., MAYER, M. & JANOT M.M. (1973)  
Propriétés immunologiques des parois cellulaires bactériennes. Etude comparée du Corynebacterium parvum et du Bacillus megaterium.  
C.R. Acad. Sci., 276, 3233 (56)

- 288 - NILSSON, B.S. (1972)  
The response of lymphocytes from tuberculin-positive or negative humans to various doses of PPD-tuberculin in vitro.  
Cell. Immunol., 3, 493 (59)
- 289 - NOLL, H., BLOCH, H., ASSELINEAU, J. & LEDERER, E. (1956)  
The chemical structure of the cord-factor of Mycobacterium tuberculosis.  
Biochem. Biophys. Acta, 20, 299 (57)
- 290 - NOSSAL, G.J.V., ABBOTT, A., MITCHELL, J. & LUMMUS, Z. (1968)  
Antigens in immunity. XV - Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles.  
J. Exp. Med., 127, 277 (40)
- 291 - NOSSAL, G.J.V., WARNER, N.L. & LEWIS, H. (1971)  
Incidence of cells simultaneously secreting IgM and IgG antibody to sheep erythrocytes.  
Cell. Immunol., 2, 41 (35)
- 292 - NOWELL, P.C. (1960)  
Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.  
Cancer Res., 20, 462 (33 ; 48)
- 293 - OGILVIE, B.M. (1964)  
Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites.  
Nature, 204, 91 (18)
- 294 - OGILVIE, B.M., SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1966)  
Reagin-like antibodies in experimental infections of Schistosoma mansoni and the passive transfert of resistance.  
Nature, 209, 1221 (18)
- 295 - OGILVIE, B.M. & JONES, V.E. (1967)  
Reaginic antibodies and immunity to Nippostrongylus brasiliensis in the rat. I - The effect of thymectomy, neonatal infections and splenectomy.  
Parasitol., 57, 335 (37)
- 296 - OGILVIE, B.M. (1967)  
Reagin-like antibodies in rats infected with the nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis.  
Immunology, 12, 113 (18)
- 297 - OGILVIE, B.M. & LOVE, R.J. (1974)  
Cooperation between antibodies and cells in immunity to a nematode parasite.  
Transpl. Rev., 19, 147 (18 ; 19)

- 298 - OKUMURA, K. & TADA, T. (1971)  
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat.  
III - Effect of thymectomy and splenectomy.  
*J. Immunol.*, 106, 1019 (37)
- 299 - ORR, T.S.C. & BLAIR, A.M.J.N. (1969)  
Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats.  
*Life Sci.*, 8, 1073 (50)
- 300 - OUCHTERLONY, Ö. & NILSSON, L.A. (1973)  
Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.  
In "Handbook of experimental Immunology", Vol.1, D.M. Weir, ed., Blackwell Scientific Public., Seconde édition, Oxford, chapitre 19 (179)
- 301 - PAGE, R.C., DAVIES, P. & ALLISON, A.C. (1973)  
Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolysis by macrophages in culture.  
*Arch. Oral Biol.*, 18, 1481 (72)
- 302 - PAGE, R.C., DAVIES, P. & ALLISON, A.C. (1974)  
Pathogenesis of the chronic inflammatory lesion induced by group A streptococcal cell wall substance.  
*Lab. Invest.*, 30, 568 (72 ; 74)
- 303 - PATTERSON, R.J. & YOUNG, G.P. (1970)  
Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis.  
*Infect. Immunity*, 1, 600 (65)
- 304 - PATTERSON, R., FINK, J.N., PRUZANSKY, J.J., REED, C., ROBERTS, M., SALVIN, R. & ZEISS, C.R. (1973)  
Serum immunoglobulin levels in pulmonary allergic aspergillosis and certain other lung diseases, with special reference to immunoglobulin E.  
*Amer. J. Med.*, 54, 16 (18)
- 305 - PEREZ, H., CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1974)  
Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat : measurement of immunity by the lung recovery technique.  
*Parasitol.*, 69, 349 (8 ; 15)
- 305 bis - PEREZ, H. (1975)  
Thèse de doctorat, Londres.  
Résultat cité in "A report of a conference on newer immunologic approaches to schistosomiasis", WAKSMAN, B.H. & COOK, J.A.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 1037 - 1039
- 306 - PERINI, A. & MOTA, I. (1973)  
The production of IgE and IgG<sub>1</sub> antibodies in guinea-pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides.  
*Immunology*, 25, 297 (50 ; 146)
- 307 - PERINI, B. & PARONETTO, F. (1962)  
Adjuvant effect of silica (trydymite) on antibody production.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 110, 390 (49)

- 308 - PHILLIPS, S.M. & ZWEIMAN, B. (1970)  
Characteristics of the in vitro response of guinea-pig blood lymphocytes to PHA and antigen.  
*J. Immunol.*, 105, 204 (49)
- 309 - PHILLIPS, S. M., REID, W.A., BRUCE, J.I., HEDLUND, K., COLVIN, R.C., CAMPBELL, R., DIGGS, C.L. & SADUN, E.H. (1975)  
The cellular and humoral immune response to Schistosoma mansoni infections in inbred rats. I - Mechanisms during initial exposure.  
*Cell. Immunity*, 19, 99 (15 ; 26)
- 310 - PIESSENS, W.F., CHURCHILL, W.H. & DAVID, J.R. (1975)  
Macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells.  
*J. Immunol.*, 114, 293 (66)
- 311 - PINCUS, W.B., WOODS, W.W. & PANG, R.K. (1970)  
Immune-specific cytotoxic factor formation by small lymphocytes.  
*J. Reticuloendoth. Soc.*, 7, 220 (72)
- 312 - POLLOCK, E.M. & VAZQUEZ, J.J. (1971)  
Studies on the behavior of guinea-pig macrophages in the migration inhibition assay.  
*Amer. J. Pathol.*, 62, 42a (100)
- 313 - RABINOVITCH, M. (1967)  
The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages.  
*Exp. Cell. Res.*, 46, 19 (67)
- 314 - RAFFEL, S. (1948)  
The components of the tubercle bacillus responsible for the delayed type of "infectious allergy".  
*J. Infect. Dis.*, 82, 267 (52)
- 314 bis - RAJEWSKY, K., SCHIRRMACHER, V., NASS, S. & JERNE, N.K. (1969)  
The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.  
*J. Exp. Med.*, 129, 1131 (37)
- 315 - RAMON, G. (1926)  
Procédés pour accroître la production des antitoxines.  
*Ann. Inst. Pasteur*, 40, 1 (32)
- 316 - REED, W.P. & LUCAS, Z.J. (1975)  
Cytotoxic activity of lymphocytes. V - Role of soluble toxin in macrophage-inhibited cultures of tumour cells.  
*J. Immunol.*, 115, 395 (71)
- 317 - REMOLD-O'DONNELL, E. & REMOLD, H.G. (1974)  
The enhancement of macrophage adenylate cyclase by products of activated lymphocytes.  
*J. Biol. Chem.*, 249, 395 (71)
- 318 - REVOLTELLA, R. & OVARY, Z. (1969)  
Preferential production of rabbit reaginic antibodies.  
*Int. Arch. Allergy*, 36, 282 (38 ; 146)

- 319 - RITCHIE, L.S., GARSON, S. & KNIGHT, W.B. (1963)  
The biology of Schistosoma mansoni in laboratory rats.  
J. Parasit., 49, 571 (7)
- 320 - ROBERTS, A. (1970)  
Early mast cell responses in mouse popliteal lymph nodes to localised primary antigenic stimulus.  
J. Immunol., 105, 187 (44)
- 321 - ROKITANSKY, S. (1855)  
Lehrbuch der pathologischen Anatomie  
3rd. ed., Vol. 1, P. 295, Braumüller, Wien (69)
- 322 - ROOK, G.A.W. (1975)  
The immunological consequences of antigen overload in experimental mycobacterial infections of mice.  
Clin. Exp. Immunol., 19, 167 (27)
- 323 - ROOS, P., TACQUET, A., TISON, F. & GUILLAUME, J. (1967)  
Obtention et séparation d'antigènes de "Mycobacterium phlei".  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 264, 418 (87)
- 324 - ROOS, P., GUILLAUME, J. & TACQUET, A. (1967)  
Etude de la structure antigénique de Mycobacterium phlei.  
Ann. Inst. Pasteur, Lille, 18, 35 (87 ; 88)
- 325 - ROOS, P. (1970)  
Etude immunologique de Mycobacterium phlei.  
Thèse de Doctorat ès Sciences, Lille (89 ; 94 ; 178)
- 326 - ROOS, P. & JOSEPH, M. (1970)  
Localisation des antigènes bactériens en microscopie électronique par marquage des anticorps à la ferritine.  
Ann. Inst. Pasteur, Lille, 21, 61 (93)
- 327 - ROUSSEAU, R. (1974)  
Caractérisation et dosage des immunoglobulines E chez le rat. Application à la bilharziose expérimentale.  
Thèse de DEA, Biochimie, Lille (147)
- 328 - ROWLEY, D.A., COSENZA, H., LESERMAN, L.D. & FITCH, F.W. (1975)  
The third cell type in the macrophage population required for the antibody response.  
in "Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology", P. 755, R. Van Furth, ed., Blackwell Scient. Public., Oxford (38)
- 329 - RUBIN, A.S. & COONS, A.H. (1972)  
Specific heterologous enhancement of immune responses. IV - Specific generation of a thymus-derived enhancing factor.  
J. Exp. Med., 1972, 136, 1501 (37)

- 330 - RUDE, E., MOZES, E. & SELA, M. (1968)  
Role of the net electrical charge of the complete antigen in determining the chemical nature of anti-p-azobenzene arsonate antibodies.  
Biochem., 7, 2971 (45)
- 331 - SADUN, E.H. & LIN, S.S. (1959)  
Studies on the host-parasite relationships to S. japonicum. IV - Resistance acquired by infection, by vaccination, and by the injection of immune serum in monkeys, rabbits and mice.  
J. Parasit., 45, 543 (10)
- 332 - SADUN, E.H. (1963)  
Immunization in schistosomiasis by previous exposure to homologous and heterologous cercariae, by inoculation of preparations from schistomes and by exposure to irradiated cercariae.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 113, 418 (10)
- 333 - SADUN, E.H. (1972)  
Homocytotropic antibody response to parasitic infections.  
in "Immunity to animal parasites", p. 97, E.J.L. Soulsby, ed., Acad. Press New York (17 ; 18)
- 334 - SAITO, K. & SUTER, E. (1965)  
Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG.  
J. Exp. Med., 121, 727 (72 ; 73)
- 335 - SAITO, K. & SUTER, E. (1965)  
Lysosomal acid hydrolases and hyperreactivity to endotoxin in mice infected with BCG.  
J. Exp. Med., 121, 739 (72 ; 74)
- 336 - SALVIN, S.B., SELL, S. & NISHIO, J. (1971)  
Activity in vitro of lymphocytes and macrophages in delayed hypersensitivity.  
J. Immunol., 107, 655 (69)
- 337 - SALVIN, S.B., YOUNGNER, J.S. & LEDERER, W.H. (1973)  
Migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity.  
Infect. Immun., 7, 68 (70)
- 338 - SALVIN, S.B., RIBI, E., GRANGER, D.L. & YOUNGNER, J.S. (1975)  
Migration inhibitory factor and type II interferon in the circulation of mice sensitized with mycobacterial components.  
J. Immunol., 114, 354 (70)
- 339 - SCHENK, J.R., HARGIE, M.P., BROWN, M.S., EBERT, D.S., YOD, A.L. & MC INTIRE, F.C. (1969)  
The enhancement of antibody formation by Escherichia coli lipopolysaccharide and detoxified derivations.  
J. Immunol., 102, 1411 (45)

- 340 - SCHIMPL, A. & WECKER, E. (1975)  
A third signal in B cell activation given by TRF.  
*Transplant. Rev.*, 23, 176 (38)
- 341 - SCHMIDTKE, J.R. & UNANUE, E.R. (1971)  
Macrophage-antigen interaction : Uptake, metabolism and immunogenicity of foreign albumin.  
*J. Immunol.*, 107, 331 (40 ; 41)
- 342 - SCHWARTZMAN, R.M., ROCKEY, J.H. & HALLIWELL, R.E. (1971)  
Immune-reaginic antibody : characterization of the spontaneous anti-ragweed and induced anti-DNP reaginic antibodies of the atopic dog.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 9, 549 (38)
- 343 - SEGREST, J.P. & JACKSON, R.L. (1972)  
Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.  
*Methods in Enzymol.*, 28, 54 (92)
- 344 - SEIBERT, F.B., PEDERSON, K.O. & TISELIUS, A. (1938)  
Molecular weight, electrochemical and biological properties of tuberculin protein and polysaccharide molecules.  
*J. Exp. Med.*, 68, 413 (59)
- 345 - SEIBERT, F.B., SOTO-FIGUEROA, E. & DUFOUR, E. (1955)  
Isolation, identification, and classification of proteins of tuberculin and the tubercle bacillus.  
*Amer. Rev. Tuberc. Pulmon. Dis.*, 71, 704 (59)
- 346 - SELA, M., FUCHS, S. & ARNON, R. (1962)  
Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. V - Synthesis, characterization and immunogenicity of some multichain and linear polypeptides containing tyrosine.  
*Biochem. J.*, 85, 223 - 235 (33)
- 347 - SELA, M., GIVOL, D. & MOZES, E. (1963)  
Resolution of rabbit gamma globulin into two fractions by chromatography on diethylaminoethyl-Sephadex.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 78, 649 (45)
- 348 - SELA, M. & MOZES, E. (1966)  
Dependance of the chemical nature of antibodies on the net electrical charge of antigens.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 55, 445 (45)
- 349 - SELL, S., ROWE, D.S. & GELL, P.G.H. (1965)  
Studies on rabbit lymphocytes *in vitro*. III - Protein, RNA and DNA synthesis by lymphocyte cultures after stimulation, with phytohemagglutinin, with staphylococcal filtrate, with anti-allotype serum and with heterologous antiserum to rabbit whole serum.  
*J. Exp. Med.*, 122, 823 (49).

- 350 - SETHI, K.K., TESCHNER, M. & BRANDIS, H. (1974)  
In vitro antilisterial activity of soluble product(s) released from  
Listeria-immune murine peritoneal macrophages.  
*Infect. Immunity*, 10, 960 (71)
- 351 - SHAW, C.M., ALVORD, E.C.Jr & KIES, M.W. (1964)  
Straight chain hydrocarbons as substitutes for the oil in Freund's adjuvants  
in the production of experimental "allergic" encephalomyelitis in the  
guinea pig.  
*J. Immunol.*, 92, 24 (45)
- 352 - SHER, A., KUSEL, J.R., PEREZ, H. & CLEGG, J.A. (1974)  
Partial isolation of a membrane antigen which induces the formation  
of antibodies lethal to schistosomes cultured in vitro.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 18, 357 (10 ; 14 ; 15)
- 353 - SIMON, H.B. & SHEAGREN, J.N. (1972)  
Enhancement of macrophage bactericidal capacity by antigenically stimulated  
immune lymphocytes.  
*Cell. Immunol.*, 4, 163 (71)
- 354 - SLONECKER, C.E. & RIEKE, W.O. (1965)  
Protein production by lymph node cells of rats stimulated with pertussis  
vaccine.  
*Nature*, 207, 729 (49)
- 355 - SMITHERS, S.R. (1962)  
Acquired resistance to bilharziasis.  
in "Ciba Found. Symp. on Bilharziasis", p. 239, G.E.W. Wolstenholme &  
M. O'Lonnor, eds, Churchill, London (12)
- 356 - SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965a)  
Naturally acquired resistance to experimental infections of S. mansoni  
in the Rhesus monkeys (Macaca mulatta).  
*Parasitology*, 55, 701 (8)
- 357 - SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965b)  
Acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the albino  
rat.  
*Parasitology*, 55, 711 (7 ; 8)
- 358 - SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1967)  
Resistance to experimental infection with S. mansoni in Rhesus monkeys  
induced by the transfer of adult worms.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 517 (10)
- 359 - SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969)  
Immunity in schistosomiasis.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 160, 826 (7 ; 10 ; 22)



- 360 - SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969b)  
The immunology of schistosomiasis.  
Adv. Parasitol., 7, 41 (10)
- 361 - SODOMANN, C.P. & HAFERKAMP, O. (1969)  
Macrophage cytophilic antibodies to tuberculo-protein in rats immunized  
with Bacillus Calmette-Guérin.  
Int. Arch. Allergy, 36, 566 (69)
- 362 - SORKIN, E. & BOYDEN, S.V. (1959)  
Studies on the fate of antigens in vitro. I - The effect of specific antibody  
in the fate of I<sup>131</sup>-trace labelled human serum albumin in vitro in the  
presence of guinea pig monocytes.  
J. Immunol., 82, 332 (68)
- 363 - SPITZNAGEL, J. & ALLISON, A.C. (1970)  
Mode of action of adjuvants : retinol and other lysosome-labilizing agents  
and adjuvants.  
J. Immunol., 104, 119 (48)
- 364 - SPITZNAGEL, J.K. & ALLISON, A.C. (1970)  
Mode of action of adjuvants ; effects on antibody responses to macrophage  
associated bovin serum albumin.  
J. Immunol., 104, 128 (39)
- 365 - STANWORTH, D.R. (1973)  
Immediate hypersensitivity. The molecular basis of the allergic response.  
in "Frontiers of Biology", Vol. 28, Neuberger A. & Tatum, E.L., eds, North-  
Holland, Publ. Co., Amsterdam (17)
- 366 - STEINKULLER, C.B., KRIGBAUM, L.G. & WEISS, D.W. (1969)  
Studies on the mode of action of the heterologous immunogenicity of a  
methanol insoluble fraction of attenuated tubercle bacilli (BCG)  
Immunology, 16, 255 (48)
- 367 - STEWART, D.F. (1955)  
Self-cure in Nematode infestation of sheep.  
Nature, 176, 1273 (18)
- 368 - STEWART-TULL, D.E.S., SHIMONO, T., KOTANI, S., KATO, M., OGAWA, Y.,  
YAMAMURA, Y., KOGA, T. & PEARSON, C.M. (1975)  
The adjuvant activity of a non-toxic, water-soluble glocopeptide present  
in large quantities in the culture filtrate of Mycobacterium tuberculosis  
strain D.T.  
Immunology, 29, 1 (54 ; 56)
- 369 - STIREWALT, M.A., MINNICK, D.R. & FREGEAU, W.A. (1966)  
Definition and collection in quantity of schistosomes of S. mansoni.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 352 (13 ; 150)

- 370 - STRANNGÄRD, Ö. & BELIN, L. (1970)  
Suppression of reagin synthesis in rabbits by passively administered antibody.  
*Immunology*, 18, 775 (38)
- 371 - STRANNGÄRD, Ö. (1971)  
Regulatory effects of antigen and antibody on the reagin response in rabbits.  
*Clin. Exp. Immunol.* 8, 961 (38)
- 372 - SULZER, B.M. & NILSSON, B.S. (1972)  
PPD tuberculin - a B-cell-mitogen.  
*Nature, New Biol.*, 240, 198 (59)
- 373 - SUTER, E., ULLMANN, G.E. & HOFFMAN, R.G. (1958)  
Sensitivity of mice to endotoxin after vaccination with BCG.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 99, 167 (57)
- 374 - SUTTON, J.S. (1967)  
Ultrastructural aspects of *in vitro* development of monocytes into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells.  
*Natl. Cancer Inst. Monograph.*, 26, 71 (72)
- 375 - SZASZ, G. (1967)  
Die Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität in Serum mit *o*-Nitrophenyl-Glucuronic.  
*Clin. Chim. Acta*, 15, 275 (200)
- 376 - TACQUET, A., PLANCOT, M.T., DEBRUYNE, J., DEVULDER, B., JOSEPH, M. & LOSFELD, J. (1971)  
Etudes préliminaires sur la classification numérique des Mycobactéries et des Nocardias. I - Relations taxonomiques entre *Mycobacterium rhodocrous*, *Mycobacterium pellegrino* et les genres *Mycobacterium* et *Nocardia*.  
*Ann. Inst. Pasteur*, 22, 121 (95)
- 377 - TADA, T. & ISHIZAKA, K. (1970)  
Distribution of E forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey.  
*J. Immunol.*, 104, 377 (36)
- 378 - TADA, T. & OKUMURA, X. (1971)  
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. I - Feedback regulation by passively administered antibody.  
*J. Immunol.*, 106, 1002 (38)
- 379 - TADA, T., OKUMURA, K. & TANIGUCHI, M. (1973)  
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VIII - An antigen-specific T cell fraction that regulates anti-hapten homocytotropic antibody response.  
*J. Immunol.*, 111, 952 (38)

- 380 - TAKAHASHI, Y. (1969)  
Immunological aspects of the different antigenic substances of the tubercle bacillus with special reference to their roles in the development of allergy and immunity in tuberculosis.  
in "Immunologisch bedeutsame Mykobakterien - Fraktionen, Intern. Kollog. Forschungsinst. Borstel - 10/11 Oct. 1967, E. Freerksen, R. Fetting und J.H. Thunim, eds.  
Gustav Fischer Verlag - Stuttgart 1969, P. 10 (59)
- 381 - TAUSSIG, M.J. & MUNRO, A.J. (1974)  
Removal of specific cooperative T cell factor by anti-H<sub>2</sub> but not by anti-Ig sera.  
Nature, 251, 63 (38)
- 382 - TAYLOR, R.B., DUFFUS, W.P.H., RAFF, M.C. & DEPETRIS, S. (1971)  
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface Ig molecules induced by anti-Ig antibody.  
Nature, New Biol., 233, 225 (35)
- 383 - TERRES, G. & WOLINS, W. (1961)  
Enhanced immunological sensitization of mice by the simultaneous injection of antigen and specific antiserum. I - Effect of varying the amount of antigen used relative to the antiserum.  
J. Immunol., 86, 361 (46)
- 384 - TERRES, G. & STONER, R.D. (1962)  
Specificity of enhanced immunological sensitization of mice following injections of antigens and specific antisera.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 109, 88 (46)
- 385 - TIZARD, I.R. (1969)  
Macrophage cytophilic antibody in mice. Differentiation between antigen adherence due to these antibodies and opsonic adherence.  
Int. Arch. Allergy, 36, 332 (22)
- 386 - TORRIGIANI, G. & ROITT, I.M. (1965)  
The enhancement of 19S antibody production by particulate antigen.  
J. Exp. Med., 122, 181 (49)
- 386 bis - UHR, J.W. & VITETTA, E.S. (1973)  
Synthesis, biochemistry and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes.  
Fed. Proc., 32, 35 (33)
- 387 - UNANUE, E.R. & ASKONAS, B.A. (1968)  
Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages.  
J. Exp. Med., 127, 915 (39)
- 388 - UNANUE, E.R. & ASKONAS, B.A. (1968)  
The immune response of mice to antigen in macrophages.  
Immunology, 15, 287 (39)
- 389 - UNANUE, E.R., ASKONAS, B.A. & ALLISON, A.C. (1969)  
A role of macrophages in the stimulation of immune responses by adjuvants.  
J. Immunol., 103, 71 (33)

- 390 - UNANUE, E.R. & CEROTTINI, J.C. (1970)  
The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages.  
*J. Exp. Med.*, 131, 711 (40)
- 391 - UNANUE, E.R. (1975)  
The regulation of the immune response by macrophages.  
in "Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology", p. 721,  
Van Furth, ed., Blackwell Scient. Publ., Oxford (40)
- 392 - URQUHART, G.M., MULLIGAN, W., EADIE, R.M. & JENNINGS, F.W. (1965)  
Immunological studies on Nippostrongylus brasiliensis infection in the rat :  
the role of local anaphylaxis.  
*Exp. Parasit.*, 17, 210 (18)
- 393 - VERNES, A., CAMUS, D., CAPRON, A., CAPRON, M. & GENTILINI, M. (1973)  
Les phénomènes d'hypersensibilité au cours des schistosomoses humaines à  
Schistosoma mansoni et Schistosoma haematobium. I - Etude de l'hypersensibi-  
lité retardée in vivo par intradermo-réaction et in vitro par le test  
de migration leucocytaire et un test mixte dérivé du test d'inhibition  
l'étalement des macrophages.  
*Path. Biol.*, 21, 1073 (28)
- 394 - VOGEL, H. (1958)  
Acquired resistance to Schistosoma infection in experimental animals.  
*Bull. OMS*, 18, 1097 (10)
- 395 - VON LICHTENBERG, F., SADUN, E.H. & BRUCE, J.I. (1962)  
Tissue responses and mechanisms of resistance in schistosomiasis mansoni  
in abnormal hosts.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 11, 347 (166)
- 396 - WAHL, S.M., WILTON, J.M., ROSENSTREICH, D.L. & OPPENHEIM, J.J. (1975)  
The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lym-  
phocytes.  
*J. Immunol.*, 114, 1296 (65)
- 397 - WALKER, W.S. (1974)  
Functional heterogeneity of macrophages : subclasses of peritoneal macro-  
phages with different antigen-binding activities and immune-complex recep-  
tors.  
*Immunology*, 26, 1025 (82)
- 398 - WALLS, R.S., CARTER, R.L., LEUCHARS, E. & DAVIES, A.J.S. (1973)  
The immunopathology of Trichiniasis in T-cell deficient mice.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 13, 231 (37)
- 399 - WARREN, K.S., DOMINGO, E.O. & COWAN, R.B.T. (1967)  
Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed  
hypersensitivity.  
*Amer. J. Path.*, 51, 735 (25)

- 400 - WARREN, K.S., KELLERMEYER, R.W., JORDAN, P., LITTELL, A.S., COOK, J.A. & KAGAN, I.G. (1973a)  
Immunological diagnosis of schistosomiasis. I - Controlled study of intradermal immediate and delayed reactions and serologic tests on St Lucians infected with Schistosoma mansoni and uninfected St Vincentians.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 189 (28)
- 401 - WARREN, K.S., COOK, J.A., LITTELL, A.S., KAGAN, I.G. & JORDAN, P. (1973b)  
Immunological diagnosis of schistosomiasis. II - Further studies on the sensitivity and specificity of delayed intradermal reactions.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 199 (28)
- 402 - WATSON, J. (1975)  
The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis.  
*J. Exp. Med.*, 141, 97 (35)
- 403 - WEATHERLY, N.F. (1970)  
Increased survival of Swiss mice given sublethal infections of Trichinella spiralis.  
*J. Parasitol.*, 56, 748 (63)
- 404 - WEBER, K. & OSBORN, M. (1969)  
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.  
*J. Biol. Chem.* 244, 4406 (185)
- 405 - WEIGLE, W.O., DIXON, F.J. & DEICHMILLER, M.P. (1961)  
Effect of Mycobacteria on antibody production induced by water in oil emulsion of soluble protein antigens.  
*Proc. Soc. Exp. Biol.*, 105, 535 (44)
- 406 - WEISS, D.W., BONHAG, R.S. & PARKS, J.A. (1964)  
Studies on the heterologous immunogenicity of a methanol-insoluble fraction of attenuated tubercle bacilli (BCG). I - Antimicrobial protection  
*J. Exp. Med.*, 119, 53 (59)
- 407 - WEISSMANN, G. & THOMAS, L. (1962)  
Studies on lysosomes. I - The effects of endotoxin, endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver.  
*J. Exp. Med.*, 116, 433 (73)
- 408 - WELLEK, B., HAHN, H.H. & OPFERKUCH, W. (1975)  
Evidence for macrophage C3d<sub>2</sub>-receptor active in phagocytosis.  
*J. Immunol.*, 114, 1643 (69)
- 409 - WERNER, G.H., MARAL, R., FLOC'H, F., MIGLIORE-SAMOUR, D. & JOLLES, P. (1974)  
Activités biologiques des adjuvants hydrosolubles de faible poids moléculaire extraits de Mycobacterium tuberculosis var. hominis.  
*C.R. Acad. Sci. D*, 278, 789 (79)

- 410 - WHITE, R.G., COONS, A.H. & CONNOLLY, J.M. (1955)  
Studies on antibody production : IV - Therole of a wax fraction of M. tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin.  
J. Exp. Med., 102, 83 (53 ; 79)
- 411 - WHITE, R.G., BERNSTOCK, L., JOHNS, R.G.S. & LEDERER, E. (1958)  
The influence of components of M. tuberculosis and other mycobacteria upon antibody production to ovalbumin.  
Immunology, 1, 54 (33)
- 412 - WHITE, R.G. (1963)  
in "The immunologically competent cell", Ciba Found. Study group n°16,  
P. 6, Churchill, London (46)
- 413 - WHITE, R.G., JOLLES, P., SAMOUR, D. & LEDERER, E. (1964)  
Correlation of adjuvant activity and chemical structure of wax D fractions of mycobacteria.  
Immunology, 7, 158 (53)
- 414 - WHITE, R.G., FRENCH, V.I. & STARK, J.M. (1966)  
Germinal center formation and antigen localization in Malpighian bodies of the chicken spleen.  
In "Germinal Centers in Immune Responses", P. 131, H. Cottier, N. Odartchenko, R. Schnidler & C.C. Conqdon, eds, Springer-Verlag, Berlin (40)
- 415 - WHITE, R.G. (1967)  
Concepts relating to the mode of action of adjuvants.  
in "Intern. Symp. Adjuvants of Immunity" , P. 3, Utrecht 1966, Karger, 1967 (32)
- 416 - WHITE, R.G., FRENCH, V.I. & STARK, J.M. (1970)  
A study of the localisation of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centres.  
J. Med. Microbiol., 3, 65 (46)
- 417 - WHITE, R.G. (1973)  
Immunopotentialiation by mycobacteria in complete Freund-type adjuvant as the failure of normal immunological homeostasis.  
in "Immunopotentialiation", Ciba Found. Symp., p. 47, Elsevier, Amsterdam. (47)
- 418 - WIGZELL, H. (1966)  
Antibody synthesis at the cellular level : some studies on naturel anti-sheep red cell antibodies in the mouse.  
J. Immunol., 97, 608 (46)
- 419 - WILKINS, H.A. & BROWN, J. (1973)  
Plasma IgE levels and Schistosoma haematobium infection.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 726 (18)

- 420 - WILKINSON, P.C., FLEMING, W.A. & WHITE, R.G. (1967)  
The effect of adjuvants on biosynthesis of 19S and 7S antibody against bacteriophage X 174 in the guinea pig.  
*Immunology*, 13, 603 (49)
- 421 - WILLIS, H.S. & CUMMINGS, M.M. (1952)  
Culture media.  
(Milieu de Sauton, p. 126)  
In "Diagnostic and experimental methods in tuberculosis". 2nd ed. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois (178)
- 422 - WOODRUFF, M.F.A., MC BRIDE, W.H. & DUNBAR, N. (1974)  
Tumor growth, phagocytic activity and antibody response in Corynebacterium parvum - treated mice.  
*Clin. Exper. Immunol.*, 17, 509 (80)
- 422 bis - WROBLEWSKI, F. & LA DUE, J.S. (1955)  
Lactic dehydrogenase activity in blood.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90, 210 (206)
- 423 - YAMAMURA, Y. (1959)  
Studies on the virulence of tubercle bacilli using  $^{32}\text{P}$  as a tracer.  
III - The effect of the toxic lipid component of virulent tubercle bacilli on the in vivo breakdown of bacteria.  
*Am. Rev. Respir. Dis.*, 79, Abstracts 61 (59)
- 423 bis - YAMAMURA, Y., ONOUE, K. & AZUMA, I. (1968)  
Chemical and immunological studies on peptides and polysaccharides from tubercle bacilli.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 154, 88 (59)
- 424 - YAMAMURA, Y., ONOUE, K. & TAHARA, T. (1969)  
Purification and properties of tuberculin active peptides.  
in "Immunologisch bedeutsame Mykobakterien-Fraktion", P. 171, E. Freerksen, R. Fetting und J.H. Thumim, eds, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart (59)
- 425 - YASHPHE, D.J. (1971)  
Immunological factors in non-specific stimulation of host resistance to syngeneic tumors.  
*Israel J. Med. Sci.*, 7, 90 (64)
- 426 - YOUNGNER, J.S. & SALVIN, S.B. (1973)  
Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity.  
*J. Immunol.*, 111, 1914 (70)
- 427 - ZATZ, M.M. & LANCE, E.M. (1971)  
The distribution of  $^{51}\text{Cr}$  labelled lymphocytes in antigen-stimulated mice.  
*J. Exp. Med.*, 134, 224 (28 ; 42)
- 428 - ZBAR, B., RAPP, H.J. & RIBI, E.E. (1972)  
Tumor suppression by cell walls of *Mycobacterium bovis* (BCG) attached to oil droplets.  
*J. Nat. Cancer Inst.*, 48, 831 (53)
- 429 - ZOLOV, D.M. & LEVINE, B.B. (1969)  
Correlation of blood eosinophilia with antibody classes. Studies with the penicillin hypersensitivity system.  
*Int. Arch. Allergy*, 25, 179 (19)

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION et BUT DU TRAVAIL.....	1
-------------------------------------	---

### Chapitre 1

L'IMMUNITE VIS-A-VIS DE LA SCHISTOSOMIASE.....	6
I - RESISTANCE A LA REINFECTION.....	8
II - LES ANTIGENES SCHISTOSOMIENS IMMUNOGENES.....	8
III - MECANISMES DE LA RESISTANCE.....	12
A) Immunité à médiation humorale.....	12
1 - L'anticorps léthal.....	13
2 - Les anticorps réaginique.....	16
B) Coopération humorale et cellulaire.....	19
C) Immunité à médiation cellulaire.....	24
CONCLUSION.....	30

### Chapitre 2

LES STIMULANTS DE LA REPOSE A MEDIATION HUMORALE.....	31
I - MECANISMES DE LA REPOSE HUMORALE.....	33
A) Les cellules productrices d'anticorps.....	33
B) La coopération cellulaire.....	36
1 - Les lymphocytes.....	36
2 - Les macrophages.....	38
3 - La séquestration des lymphocytes.....	42
II - LES ADJUVANTS HUMORAUX.....	44
A) Mécanismes de l'activité adjuvante.....	44
1 - Action sur les propriétés des antigènes.....	44
2 - Action sur le destin de l'antigène.....	45
a) Fixation.....	45
b) Localisation.....	46
c) Catabolisme.....	47



3 - Action sur les cellules immunocompétentes ..	48
a) Métabolisme cellulaire.....	48
- les phagocytes.....	48
- les lymphocytes.....	48
b) Multiplication cellulaire.....	49
B) Les adjuvants humoraux d'origine mycobactérienne.....	51
1 - La paroi et ses constituants.....	52
2 - Le cord-factor.....	57
3 - Le M.E.R.....	59
4 - Le P.P.D.....	59

### Chapitre 3

LES STIMULANTS DE LA REPOSE A MEDIATION CELLULAIRE.....	61
I - LE MACROPHAGE DANS L'IMMUNITE CELLULAIRE.....	62
A) Rôle du macrophage dans l'immunité cellulaire.....	62
1 - Immunité spécifique.....	62
2 - Immunité non spécifique.....	63
B) Mécanisme de l'activation.....	64
1 - Armement spécifique.....	64
2 - Armement non spécifique.....	65
C) Mécanismes cellulaires de la cytotoxicité.....	67
1 - Phagocytose accrue.....	67
2 - Mobilité diminuée.....	69
3 - Surface modifiée.....	70
4 - Production de toxines.....	71
5 - Inflation enzymatique et exocytose des hydrólases.....	72
6 - Autres mécanismes cytotoxiques.....	75
CONCLUSION.....	76
II - <u>LES STIMULANTS DU MACROPHAGE</u>	
A) Adjuvants mycobactériens.....	78
B) Autres stimulants des macrophages.....	80
1 - L'EBP.....	80
2 - Le NWSM.....	80
3 - <u>Corynebacterium parvum</u> .....	80
4 - Le L.P.S.....	81
TRAVAUX PERSONNELS.....	83
Introduction.....	84

## Chapitre 4

IMMUNOSTIMULATION HUMORALE ET MACROPHAGIQUE.....	86
I - ISOLEMENT D'UNE FRACTION ANTIGENIQUE MYCOBACTERIENNE : AgR.....	87
A) Obtention de l'antigène.....	87
1 - Culture et broyage.....	87
2 - Séparation des parois et du contenu cellulaire.....	88
3 - Isolement de l'antigène R.....	89
B) Nature de l'antigène R.....	90
1 - Caractérisation.....	90
2 - Poids moléculaire.....	92
3 - Localisation cellulaire.....	93
II - PROPRIETES DE L'ANTIGENE R.....	94
A) Propriétés antigéniques.....	94
1 - Communauté mycobactérienne.....	94
2 - Spécificité mycobactérienne.....	95
B) Propriétés biologiques.....	96
1 - Hypersensibilité retardée.....	96
a) Révélation (tests cutanés).....	96
b) Induction.....	98
c) Inhibition de migration des macrophages.....	100
2 - Effets physiologiques.....	103
a) Poids des animaux.....	103
b) Granulome.....	104
c) Volume du foie, de la rate et des poumons.....	105
3 - Effet adjuvant.....	105
a) Sur les anticorps spécifiques de l'ovalbumine.....	105
b) Sur les anticorps spécifiques de la sérum-albumine.....	107
III - ACTIVATION DES MACROPHAGES.....	109
A) Activation <u>in vitro</u> .....	110
1 - Substances utilisées.....	111
2 - Cultures cellulaires.....	111
3 - Dosages.....	112
4 - Résultats.....	113
5 - Stimulation avec du sérum de rats infectés par <u>S. mansoni</u> .....	117

B) Activation <u>in vivo</u> .....	120
1 - Stimulation des macrophages.....	120
2 - Résultats.....	121
 <u>Chapitre 5</u> 	
APPLICATION A LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE DU RAT.....	125
I - POTENTIALISATION DES IgE.....	126
A) Protocole d'infestation et d'immunostimulation.....	126
1 - Infestation des rats.....	126
2 - Injection des adjuvants.....	127
3 - Réponse secondaire.....	128
4 - Dosage des IgE.....	129
B) Résultats.....	129
1 - Première infestation.....	129
2 - Réinfestation.....	145
C) Discussion.....	145
II - ARMEMENT DES MACROPHAGES CONTRE LES SCHISTOSOMULES.....	149
A) Techniques et méthodes.....	150
1 - Marquage des schistosomules au chrome 51....	150
2 - Contact schistosomules-macrophages activés <u>in vivo</u> .....	151
3 - Armement des macrophages <u>in vitro</u> .....	152
B) Résultats.....	154
1 - Macrophages immunostimulés <u>in vivo</u> .....	157
2 - Armement <u>in vitro</u> par les IgE.....	157
3 - Activation <u>in vivo</u> et armement <u>in vitro</u> .....	161
C) Discussion.....	164
 COMMENTAIRE GENERAUX.....	 166
CONCLUSION.....	173
RESUME.....	176
Pages techniques (couleur jaune).....	177
BIBLIOGRAPHIE.....	208
Table des matières.....	251

Tableau 1	: Mécanismes effecteurs <u>in vitro</u> dans la schistosomiase	20
Figure 2	: Cire D, WSA et Muramyl-dipeptide (MDP) des Mycobactéries	55
Figure 3	: Cord-factor et acides mycoliques des Mycobactéries	58

#### FRACTIONNEMENT DE L'ANTIGENE R

Photos 4 à 8 (Planche I)	: Immunodiffusion des antigènes de <u>M. phlei</u>	89
Photos 9 à 13 (Planche II)	: Fractionnement de l'AgR mycobactérien	90
Photos 14 à 20 (Planche III)	: Communauté mycobactérienne de l'AgR et immunoélectrophorèse bidimensionnelle	96

#### PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DE L'ANTIGENE R

Tableaux 21 et 22	: l'AgR comme révélateur de l'HSR tuberculinique	97 & 98
Tableau 23	: L'AgR comme adjuvant de l'immunité à médiation cellulaire	99
Tableau 24	: Inhibition de migration des macrophages par l'AgR	100
Tableau 25	: Inhibition de migration des macrophages par la sérum-albumine bovine après sensibilisation par divers adjuvants	102
Tableau 26	: Effet de l'AgR sur le poids des animaux traités	103
Tableau 27	: Effet de l'AgR sur le volume des pattes d'injection	104
Tableau 28	: Effet de l'AgR sur le foie, la rate et les poumons	105
Tableau 29	: L'AgR comme adjuvant humoral vis-à-vis de l'ovalbumine	106
Tableau 30	: AgR et WSA comme adjuvants humoraux de la sérum-albumine	108

#### ACTIVATION MACROPHAGIQUE

Tableau 31	: Effet <u>in vitro</u> de divers immunostimulants sur les macrophages	114
Tableau 32	: Effet <u>in vitro</u> du latex sur les macrophages	117
Tableau 33	: Effet <u>in vitro</u> de sérums de rats sains ou immuns	118
Tableau 34	: Effet <u>in vitro</u> d'antigènes schistosomiens sur des macrophages préalablement sensibilisés par des sérums de rats	119
Tableau 35 et figure 36	: Stimulation <u>in vivo</u> des macrophages par divers immunostimulants	121 & 122

#### APPLICATION A LA SCHISTOSOMIASE

Tableau 37	: Taux sériques en IgE totales ( <u>B. pertussis</u> , AgR et LP)	130
Figures 38 à 43	: Taux sériques en IgE totales avec Al(OH) <sub>3</sub> p.131, avec 10 <sup>6</sup> <u>B. pertussis</u> p.132, avec 10 <sup>9</sup> <u>B. pertussis</u> p.133, avec AgR de <u>M. smegmatis</u> p.134, avec LP d' <u>E. granulosus</u> p.135, et comparaison entre AgR et 10 <sup>6</sup> <u>B. pertussis</u> p.136	

Tableau 44 et figure 45 : Taux sériques en IgE totales avec LPS	137 & 138
Tableau 46 et figure 47 : Taux sériques en IgE totales avec 4 injections de LP d' <u>E. granulosus</u>	139 & 140
Tableau 48 et figure 49 : Taux sériques en IgE totales avec WSA	141 & 142
Tableau 50 et figure 51 : Taux sériques en IgE totale après réinfest.	143 & 144
Photos 52 à 54 (Planche iv) : Immunoadhérence des macrophages aux larves	150
Figure 57 : Rapport entre mortalité des schistosomules et relargage de chrome radioactif	155
Tableau 58 : Macrophages activés <u>in vivo</u> par des immunostimulants actifs sur des schistosomules marqués	156
Tableau 59 : Macrophages sensibilisés <u>in vitro</u> par des IgE actifs sur des schistosomules marqués	158
Tableau 60 : Relation entre relargage de chrome et taux sériques des IgE	159
Figure 61 : Effets de la dilution d'un sérum sur l'armement des macrophages	160
Tableau 62 : Thermolabilité du facteur d'armement des macrophages	162
Tableau 63 : Non intervention du complément dans le mécanisme d'armement du macrophage (inactivation par chauffage et recomplémentation)	162
Tableau 64 : Non intervention du complément dans le mécanisme d'armement du macrophage (décomplémentation par l'EDTA)	162
Tableau 65 : Effet d'une stimulation <u>in vivo</u> puis d'un armement <u>in vitro</u> des macrophages sur des schistosomules marqués	163
Tableau 66 : Composition des gels de polyacrylamide	184

\*  
\* \*

