

50376
1981
37

50376
1981
37

N° d'ordre : 108

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

T H E S E

Présentée à l'Université de Lille I

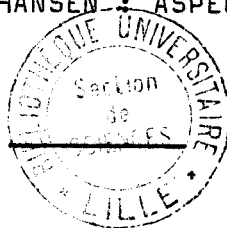
pour obtenir le titre de

Docteur d'Université en Sciences naturelles

par

Pierre-Richard RIDEL

SUPPRESSION DE LA REPONSE D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE
CHEZ LES MALADES ATTEINTS DE FORME POLAIRE LEPROMATEUSE
DE LA MALADIE DE HANSEN : ASPECTS IMMUNOLOGIQUES



Présentée le 10 mars 1981 devant la Commission d'examen

JURY : Président : M. J. MONTREUIL
 Rapporteur : M. A. CAPRON
 Examineurs : Melle G. SPICK
 M. J.P. DESSAINT

A Marie France,

A la mémoire de mon père,

A ma mère.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Vous qui m'avez fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse, je vous prie d'accepter mes sincères remerciements ainsi que mes sentiments les plus élevés.

A Monsieur le Professeur A. CAPRON

Vous avez bien voulu me conseiller pour la rédaction de cette thèse et vous m'avez beaucoup aidé pour sa réalisation grâce à votre apport précieux en réactifs indispensables et en documents. Vous avez également accepté de participer au jury de cette thèse, je vous en remercie très profondément et je vous prie de croire en mon parfait dévouement.

A Mademoiselle SPICK, et à Monsieur J.P. DESSAINT

Vous qui avez accepté de participer au jury de cette thèse, je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement

Messieurs R.C. HASTINGS et E.J. SHANNON ainsi que l'ensemble du personnel du Pharmacology Research dept. de l'U.S.P.H.S. Hospital de Carville, La 70721 U.S.A., qui m'ont patiemment guidés dans le choix des méthodes et dont les conseils m'ont aidés à réaliser ce travail

Monsieur A. OUASSI, Docteur en Sciences, du laboratoire d'immunologie parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille (directeur Professeur A. CAPRON) pour sa collaboration dans la correction de ce manuscrit.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

RIDEL P.R., SAINT ANDRE P., BAQUILLON G., FERRACCI C., BOUCHER P.

Suppressor adherent cells in polar lepromatous leprosy

Letter to the editor

International Journal of Leprosy, march 1981, I, n° 3, in press

RIDEL P.R.

Rôle des macrophages actifs sur la suppression de la réponse
d'hypersensibilité retardée : concepts actuels.

Conférence technique de l'O.C.C.G.E., Bamako, avril 1981, en cours
de publication.

RESUME

Chez les malades atteints de la forme polaire de lèpre lépromateuse, nous avons mis en évidence l'existence d'un effet suppresseur médié par les macrophages activés sur la réponse d'hyper-sensibilité retardée "in vitro".

Dans un premier temps, nous avons utilisé une nouvelle méthode d'appauvrissement en macrophages actifs qui nous a permis de démontrer que les macrophages des sujets lépromateux exerçaient un effet suppresseur.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que cet effet suppresseur était dirigé sur une population hétérogène que nous n'avons pas identifié faute de moyens techniques.

Dans un troisième temps, nous proposons une hypothèse sur l'effet suppresseur induit par les macrophages. Cet effet suppresseur serait la conséquence de la non présentation de l'antigène par les cellules T aux macrophages et à la non coopération des cellules B-T.

En supposant que la population "d'autres cellules" soit constituée en majorité de cellules K, la suppression des mécanismes de défense par ces cellules serait dû à la non spécificité des anticorps sécrétés par les cellules B, l'appauvrissement en macrophages permettant une activation "in vitro" de ces cellules par restauration des mécanismes normaux de l'immunité à médiation cellulaire.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
INTRODUCTION ET BUT DU TRAVAIL.....	1
 Chapitre I : LA MALADIE DE HANSEN.....	 2
. I.1. <u>Historique</u>	2
. I.2. <u>Description de la maladie</u>	3
. I.3. <u>Classification</u>	4
I.3.1. La forme indéterminée.....	5
I.3.2. La forme tuberculoïde polaire (T.T.).....	5
I.3.3. La forme lépromateuse polaire (LL).....	5
I.3.4. Les formes Borderlines (SB, BL, BT).....	6
.I.4. <u>Hypothèses récentes sur la genèse des formes lépro-</u> <u>mateuses polaire de la maladie de Hansen</u>	6
 Chapitre II : LES ORGANES ET CELLULES ENGAGES DANS LA REPONSE D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE, LES MECANISMES CELLULAIRES.....	 9
. II.1. <u>Les organes lymphoïdes</u>	9
. II.2. <u>Les cellules lymphoïdes</u>	14
II.2.1. Définition.....	14
II.2.2. Origine des lymphocytes.....	14
II.2.3. Durée de vie des lymphocytes.....	15
II.2.4. Circulation et re-circulation des lymphocytes..	15
II.2.5. Transformation lymphoblastique.....	15
II.2.5.1. Définition.....	15
II.2.5.2. Aspects morphologiques.....	17

II.2.5.3. Biochimie de la transformation lympho- blastique.....	17
II.2.5.4. Coopération cellulaire dans la transfor- mation lymphoblastique.....	18
II.2.6. Les cellules B.....	18
II.2.6.1. Marqueurs des lymphocytes B.....	18
II.2.6.2. Propriétés des immunoglobulines et des récepteurs de membrane.....	19
II.2.7. Les cellules T.....	20
II.2.7.1. Marqueurs des lymphocytes T.....	20
II.2.7.2. Lymphocytes T helper (T_H) et T supprimeurs (T_S).....	21
II.2.8. Les autres cellules lymphoïdes.....	21
II.2.8.1. Les cellules K.....	22
II.2.8.2. Les cellules NK.....	23
II.2.9. Répartition des cellules lymphoïdes dans les différents tissus chez l'homme.....	24
. II.3. <u>Les monocytes-macrophages</u>	26
II.3.1. Ontogenèse.....	26
II.3.2. Différenciation des monocytes.....	26
II.3.3. Morphologie.....	28
II.3.4. Propriétés.....	28
. II.4. <u>La réaction d'hypersensibilité retardée chez le sujet sain</u>	30
II.4.1. Définition.....	30
II.4.2. Induction de l'hypersensibilité retardée.....	34
II.4.3. Mécanismes cellulaires de l'hypersensibilité retardée.....	35

II.4.3.1. Notions d'antigènes thymo-dépendants et thymo-indépendants.....	36
II.4.3.2. Régulation génétique de la réponse immunitaire.....	37
II.4.3.3. Mécanismes génétiques de la réponse immunitaire.....	39
II.4.3.4. Inter-action cellulaire.....	39
II.4.3.5. Rôle des lymphocytes.....	42
II.4.3.6. Rôle des macrophages.....	42
II.4.4. Expression de l'hypersensibilité retardée " <u>in vitro</u> ".....	43
II.4.4.1. Test de transformation lymphoblastique (TTL);	43
II.4.4.2. Cytotoxicité à médiation cellulaire.....	43
II.4.4.3. Test de duplication virale.....	45
II.4.4.4. Test d'inhibition de la migration des macrophages.....	45
II.4.5. Produits d'activation des lymphocytes et mé- diateurs humoraux de l'hypersensibilité retardée, aspects biologiques.....	46
II.4.6. Suppression de l'hypersensibilité retardée.....	53
 Chapitre III : MATERIEL ET METHODES.....	 54
. III.1. <u>Choix des malades</u>	54
. III.2. <u>Méthodologie du test de transformation lympho- blastique (T.T.L.)</u>	57
III.2.1. Préparation des cellules mononuclées.....	57
III.2.2. Cultures et stimulation par le mitogène ou les antigènes.....	60

. III.3. <u>Etude des populations T présentant un récepteur pour les Ig M (Tμ) ou les Ig G (Tγ)</u>	61
III.3.1. Principe.....	63
III.3.2. Réactifs et matériel.....	63
III.3.2.1. Erythrocytes de mouton trypsinés.....	63
III.3.2.2. Erythrocytes de mouton couplés avec Ig G 7S.	64
III.3.2.3. Réactifs divers.....	65
III.3.3. Méthodologie.....	66
III.3.3.1. Isolement des lymphocytes T.....	66
III.3.3.2. Isolement des cellules T présentant un récepteur pour le Fc des Ig G (T γ).....	67
. III.4. <u>Méthodologie utilisée pour l'appauvrissement en macrophages</u>	70
III.4.1. Principe.....	70
III.4.2. Méthodologie.....	72
. III.5. <u>Méthodologie pour l'étude et l'identification des cellules B</u>	73
. III.6. <u>Mise en évidence d'une autre population cellulaire</u>	74
III.6.1. Etude morphologique.....	74
III.6.2. Identification par l'étude des récepteurs des cellules B et des propriétés des macrophages..	75
III.6.3. Identification par l'étude des récepteurs des lymphocytes T et T γ	76
Chapitre IV : RESULTATS.....	79
. IV.1. <u>Résultats avant l'appauvrissement en cellules Tγ</u>	79

. IV.2. Conséquences de l'appauvrissement en $T\gamma$ sur le test de transformation lymphoblastique.....	81
. IV.3. Conséquences de l'appauvrissement en macrophages actifs sur le test de transformation lympho- blastique.....	83
. IV.4. Variation des différentes populations cellulaires après appauvrissement en macrophages ou $T\gamma$	85
. IV.5. Identification de la population "d'autres cellules".....	87
Chapitre V : DISCUSSION.....	90
CONCLUSION.....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	98

INTRODUCTION

Les formes bacillaires de la maladie de Hansen sont les formes contagieuses de la maladie, la forme lépromateuse polaire représentant la forme la plus contagieuse. Chez ces malades, les défenses immunitaires de l'organisme sont inefficaces à se défendre contre M. leprae, agent causal de l'affection, car les mécanismes d'immunité à médiation cellulaire sont déficients. Cette non-réponse de l'organisme vis-à-vis de M. leprae est probablement lié à la nature même du germe et à son trophisme particulier pour les nerfs (LUMSDEN, 1964) (49).

Dans certaines formes miliaires tuberculeuses, ELLNER, 1978, (18) a décrit un effet supprimeur lié au macrophage sur la réponse d'hypersensibilité retardée étudiée "in vitro" par le test de transformation lymphoblastique (T.T.L.)

Quoique tuberculose et lèpre soient des affections très différentes, bien que les agents causals appartiennent à la même famille, nous avons voulu voir si les macrophages des sujets lépromateux présentaient un effet supprimeur sur la réponse d'hypersensibilité retardée étudiée "in vitro" par le T.T.L. et sur quelles populations de cellules cet effet était dirigé.

Dans d'autres affections un effet supprimeur lié aux cellules macrophages a aussi été décrit : maladie de Hodgking (HILLINGER et al., 1978) et lupus érythémateux (MARKENSON et al., 1978) (51).

CHAPITRE I : LA MALADIE DE HANSEN

I.1. HISTORIQUE

L'origine de la lèpre se perd dans la nuit des temps ainsi que le lieu de son apparition et les débuts de sa migration. Certains placent le foyer primitif en Abyssinie et au Soudan, d'autres en Inde ou en Perse. Des descriptions de la maladie existent dès l'antiquité, par exemple dans les Vedas où elle aurait porté le nom de Kushtha. Dans le Sushruta Samitha, recueil des traditions de l'Inde, on trouve la description de cette Kushtha avec sept variétés dont une anesthésique, et déjà des "méthodes thérapeutiques" à base de Tuvarka qui est probablement l'*Hydnocarpus Wightiana* dont on tire l'huile de Chaulmooga, ancien médicament de la maladie de Hansen. Les grecs, les perses et les romains ont décrit aussi la maladie et Hansen ainsi que les médecins chinois qui lui consacrèrent de nombreux traités. La lèpre a été introduite en Europe probablement par le courant des grandes migrations et a frappé de nombreux sujets du IIIe siècle au XIVE siècle. Les causes du déclin de la lèpre en Europe restent mystérieuses : épidémie de peste de 1347 à 1350 ? amélioration de l'hygiène (peu probable au XIVE siècle) ? amélioration des habitudes alimentaires ? Ce point demeure un mystère.

Considérée comme maladie divine, et par les mutilations qu'elle entraîne, la maladie de Hansen a toujours suscité les plus grandes craintes, exposant les malades à l'isolement, aux privations, aux persécutions du reste de la population. La maladie

de Hansen frappe environ 12 à 15 millions de personnes de par le monde, sa répartition est tropicale, sub-tropicale et tous les continents, sauf l'Europe, présentent des foyers d'endémie plus ou moins importants.

En 1873, Armauer Hansen découvre le bacille qui porte aujourd'hui son nom et en 1879, Albert Neisser affirme sa nature bactérienne.

I.2. DESCRIPTION DE LA MALADIE

La maladie de Hansen est une maladie infectieuse dont l'agent causal, Mycobactérium leprae (M. leprae), est un bacille incultivable de la classe des Actinomycetes, de l'ordre des Mycobactérialés et de la famille des mycobactéries. Il se présente, à l'état vivant, sous forme de bâtonnet homogène, cylindrique, se colorant uniformément en rouge vif par la méthode de Zhiel-Neelsen et est généralement rectiligne, parfois incurvé, isolé ou groupés en amas, en globis (forme de groupement particulier à l'intérieur des cellules de Virchow qui sont des cellules phagocytaires). L'invasion bacillaire du malade est différente suivant les formes de lèpre et sera expliquée plus loin.

La maladie de Hansen est une maladie à trophisme nerveux, les atteintes par le bacille seront donc, à plus ou moins long terme, des atteintes nerveuses, la prédilection de M. leprae pour les tissus nerveux n'a pas encore été pleinement élucidée. Certains travaux (LUMSDEN, 1964) (49) insistent néanmoins sur les

besoins nutritifs de M. leprae en acides aminés rencontrés uniquement au niveau de la fibre nerveuse.

I.3. CLASSIFICATION

La maladie de Hansen présente plusieurs aspects différenciés, tant du point de vue clinique, bactériologique, histologique et immunologique. La classification actuelle est celle de RIDLEY JOPLING (1962) (67) adoptée par l'O.M.S.

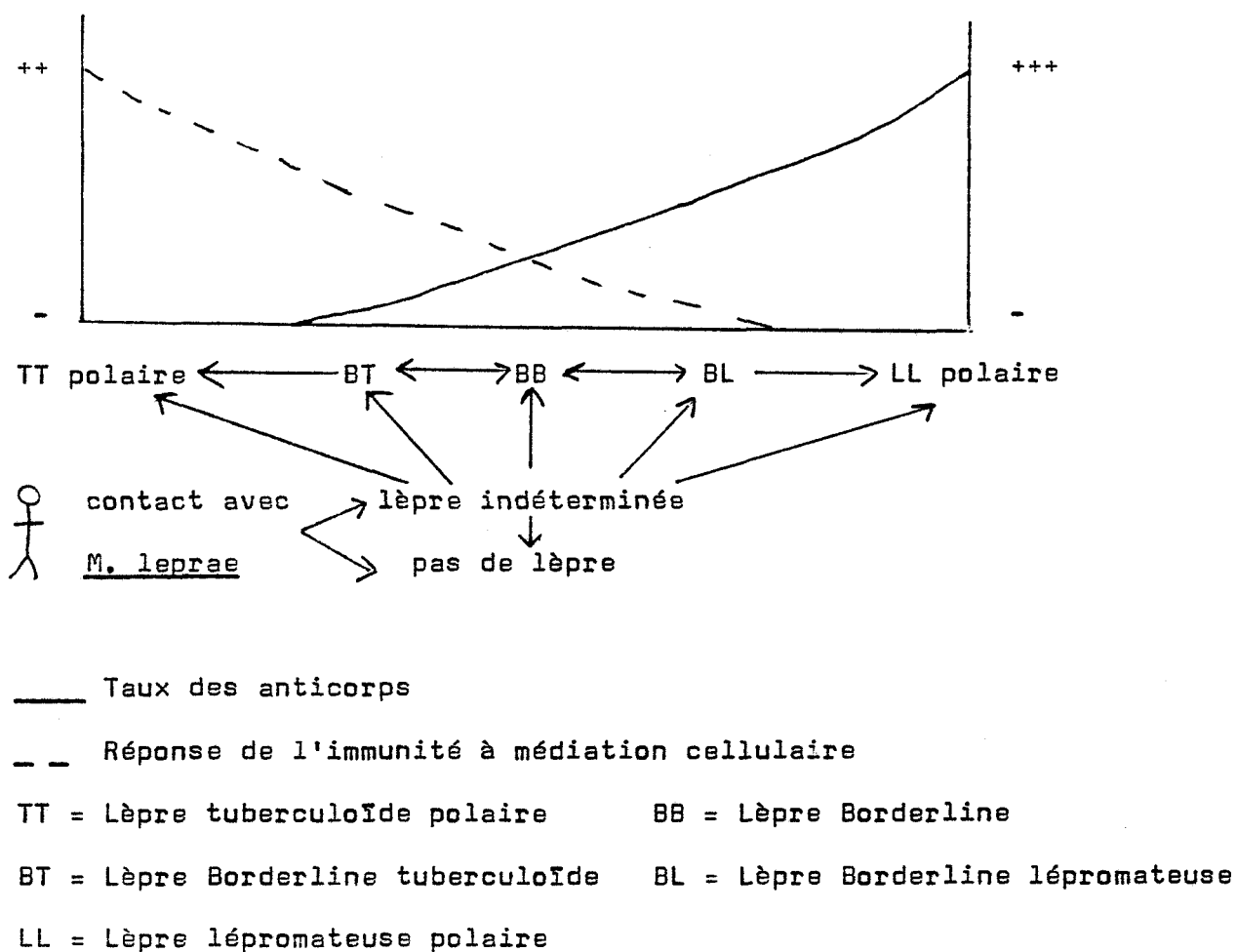


Figure n° 1

Schéma de Ridley Jopling

I.3.1. La forme indéterminée

Forme obligatoire de départ de la maladie de Hansen qui évoluera vers l'une des formes de la maladie ou se guérira spontanément.

I.3.2. La forme tuberculoïde polaire (II)

Encore appelée forme allergique, c'est la forme non contagieuse de la maladie où prédominent les lésions nerveuses. C'est une forme stable, les rares bacilles, trouvés lors des prélèvements histologiques, sont localisés au niveau de la fibre nerveuse avec une prédilection pour la gaine de Schwann. Les malades atteints présentent cependant une réaction d'hypersensibilité retardée (H.R.) que l'on peut mettre en évidence "in vivo" et "in vitro" par différents tests que nous décrirons au chapitre III, paragraphes III.1 et III.2.

I.3.3. La forme lépromateuse polaire (LL)

Forme paucibacillaire et contagieuse de la maladie, avec présence de nombreux bacilles disséminés dans l'organisme. Les malades présentent une H.R. nulle mais, une réaction à médiation humorale très importante mais inefficace. Cette forme lépromateuse polaire est également une forme stable parfois appelée forme anergique.

I.3.4. Les formes Borderlines (BB, BL, BT)

Formes à immunité variable non stables pouvant évoluer vers les formes allergiques (Reversal reaction) ou anergiques (Down grading reaction) : on y trouve toutes les nuances intermédiaires entre TT polaire et LL polaire.

I.4. HYPOTHESES RECENTES SUR LA GENESE DES FORMES LL POLAIRE DE MALADIE DE HANSEN

La lèpre est une maladie à trophisme nerveux. Pour certains auteurs, toutes les formes de lèpre seraient, du moins à leur début, localisées au niveau des nerfs périphériques (SKINSEES, 1971) (74). Les mécanismes de pénétration de M. leprae dans l'organisme, son électivité et sa multiplication dans les nerfs périphériques ne sont pas clairement établis, mais la localisation au niveau des nerfs périphériques pourrait expliquer la défection de l'H.R. chez les sujets LL.

Des études histologiques ont montré que M. leprae se trouve dans l'endoneurium du nerf périphérique (SUNDERLAND, 1978) (78) et, de là, il se multiplie et essaime le long de la fibre nerveuse soit par passage rétrograde axonal (RIDLEY, 1973) (68) soit par passage de cellules de Schwann en cellules de Schwann (LUMSDEN, 1964) (49). Le bacille est confiné par le perineurium dans l'endoneurium qu'il infecte en se propageant de funiculus en funiculus. Dans le nerf périphérique, au niveau du funiculus, il n'existe pas de vaisseaux lymphatiques (SUNDERLAND, 1978) (78) : le

réseau se trouve dans l'épineurium entourant les funiculus et le perineurium joue alors le rôle d'une barrière empêchant tout contact entre M. leprae et circulation lymphatique (SUNDERLAND, 1978) (78). M. leprae va donc, par voie de propagation, se retrouver dans le flux sanguin et il pénétrera dans le ganglion lymphatique par voie sanguine avant d'y pénétrer par voie lymphatique. Nous savons maintenant l'importance considérable de la voie de pénétration d'un antigène dans le ganglion lymphatique, car, s'il y pénètre par voie sanguine, il se trouvera d'abord dans la partie médullaire du ganglion lymphatique avant de se trouver dans la zone para-corticale et la primo-stimulation sera donc une stimulation des cellules B avant d'être une stimulation des cellules T (LAGRANGE et al., 1974) (46), (PARISH, 1972) (60). On sait aussi que cette "inversion" de pénétration et cette induction de la réponse à cellules B supprime la réaction d'H.R. On sait également que si la réaction de type humoral se développe avant la réaction d'H.R., l'induction d'une population de cellules T suppressives (T_{γ}) sera la conséquence de cette inversion. Cette population de cellules T_{γ} contribuera à maintenir l'effet suppresseur sur l'H.R. (RAMSHAW et al., 1976) (64) et pourrait se comparer à l'induction d'une tolérance par l'effet suppresseur lié aux cellules T. De plus, tant que l'infection ne sera pas assez étendue, M. leprae sera protégé d'une attaque immunologique (par le perineurium) et des effets de la circulation et de la recirculation des lymphocytes, et par conséquent il ne se produira pas d'induction de l'H.R.

Au fur et à mesure que l'infection progresse, lorsque

des plexus nerveux plus importants sont touchés, le bacille est drainé dans le ganglion vers les zones para-corticales T dépendantes et, la réaction d'H.R. pourrait alors se produire. Dans certains cas, lorsque l'effet supprimeur sur les cellules T n'est pas trop marqué, elle se produit effectivement, et le sujet atteint présente alors une lèpre de forme TT polaire. Lorsqu'elle ne se produit pas du tout, le sujet présente alors une lèpre de forme LL polaire. Entre ces deux formes, et suivant le degré de suppression, on aura le spectre des lèpres Borderlines.

CHAPITRE II : LES ORGANES ET CELLULES ENGAGES DANS LA REPONSE D'HYPER-
SENSIBILITE RETARDEE, LES MECANISMES CELLULAIRES

II.1. LES ORGANES LYMPHOIDES

Le thymus est l'organe d'où proviennent les lymphocytes thymiques (ou lymphocytes T). Nous savons que les lymphocytes humains sont tous de la même origine mésenchymateuse (LE DOUARIN et al., 1974) (47) et qu'une partie de ces cellules colonise le thymus pendant la période embryonnaire. Ces cellules, qui migrent ensuite vers les autres organes lymphoïdes, acquièrent des propriétés particulières spécifiques des lymphocytes T dans le thymus sous l'effet du micro-environnement thymique (SANNOSY et al., 1972) (36). Les autres cellules lymphoïdes, qui n'ont pas été en contact avec le thymus, sont appelées lymphocytes B par analogie avec les lymphocytes d'oiseaux ayant pour origine la bourse de Fabricius, sans équivalent chez l'homme.

Le système lymphatique, et en particulier le ganglion lymphatique, joue un très grand rôle dans la forme polaire répromateuse de la maladie de Hansen. Nous rappellerons ci-après les structures et la physiologie du système lymphatique.

Les vaisseaux lymphatiques conduisent la lymphe des espaces extra-vasculaires jusqu'au sang. La lymphe, venant d'abord des vaisseaux lymphatiques capillaires, est drainée par des vaisseaux de plus en plus importants et se jette, par le canal thoracique, dans les gros vaisseaux du coeur.

Les capillaires lymphatiques ont une paroi très mince mononuclée permettant les échanges avec le milieu alors que les plus gros vaisseaux ont une structure de paroi plus épaisse avec des fibres collagènes et parfois musculaires dont l'aspect est cependant moins structuré que celui des vaisseaux sanguins. On note un système de valve dans la lumière des vaisseaux lymphatiques dont l'orientation empêche le reflux de la lymphe. Les ganglions placés sur le circuit lymphatiques reçoivent la lymphe qui pénètre dans la capsule. Cette capsule est séparée du parenchyme ganglionnaire par un sinus périmérique enserré dans des cloisons fibreuses, et des sinus intermédiaires qui pénètrent dans le parenchyme et donnent les sinus médullaires séparés les uns des autres par les cordons de la médullaire. La lymphe arrive aux sinus médullaires, quitte le ganglion par la voie lymphatique afférente hilaire. Les sinus sont bordés de cellules endothéliales sur une trame réticulinique en continuité avec celle du parenchyme. On note des ponts fibreux d'une berge à l'autre du sinus supportant des cellules étoilées et des macrophages.

La vascularisation se fait par une artériole qui pénètre le ganglion au niveau du hile, se ramifie et dont les branches, en suivant les cloisons fibreuses, s'apanouissent en un bouquet capillaire terminal au niveau de la corticale. Les veinules post-capillaires font suite à ce capillaire artériel dans le cortex profond et ressortent du ganglion au niveau du hile.

Les parois de ces vaisseaux capillaires sont unicellulaires permettant un passage des lymphocytes du sang vers le

système lymphatique par diapédèse trans-cellulaire.

Les différentes zones ganglionnaires varient suivant que le ganglion est au repos ou le siège d'une immunisation active. Les modifications sont différentes suivant les zones touchées, en effet, la population lymphoïde ganglionnaire est hétérogène : il existe des zones contenant des cellules de type T, dites zones thymo-dépendantes, et des zones contenant des cellules de type B, dites zones thymo-indépendantes (voir figure n° 2 page 13) (PARROT et al., 1971) (61).

Les zones dites thymo-dépendantes répondent à une immunisation à médiation cellulaire et sont localisées dans le cortex profond qui, lors du contact avec l'antigène se modifie : des îlots de cellules blastiques y apparaissent, ces cellules prolifèrent jusqu'au quatrième jour, augmentant le volume du cortex et comprimant la médullaire. Les veinules post-capillaires se modifient de façon importante durant les premiers jours, devenant très perméables au passage des lymphocytes sanguins. Puis les cellules blastiques disparaissent progressivement et complètement au septième jour après avoir donné naissance à une nouvelle population de petits lymphocytes. Cette réaction est stéréotypée mais il n'est cependant pas rare de voir, dès le début de la deuxième semaine, une réaction des zones thymo-indépendantes avec formation de centres germinatifs et apparition de plasmocytes matures dans la médullaire.

Les zones dites thymo-indépendantes répondent à une

immunisation médiée par les cellules B. L'antigène se trouve alors rapidement dans la zone médullaire, il est capté par les nodules lymphoïdes du cortex superficiel (en une heure lors d'une immunisation secondaire) puis est attiré vers le centre du follicule où il induit une prolifération de la zone fertile du centre germinatif. Les néo-cellules prennent l'aspect de plasmocytes immatures qui migrent vers le pôle apical clair du centre germinatif et deviennent des plasmocytes matures, entre le cinquième et le sixième jour, puis migrent vers la médullaire. Le cortex profond est peu ou pas modifié. Les cellules réticulaires de la zone marginale folliculaire jouent un rôle important en captant l'antigène et probablement en le présentant aux cellules de la zone fertile du centre germinatif (FIORE DONATI et al., 1969) (25).

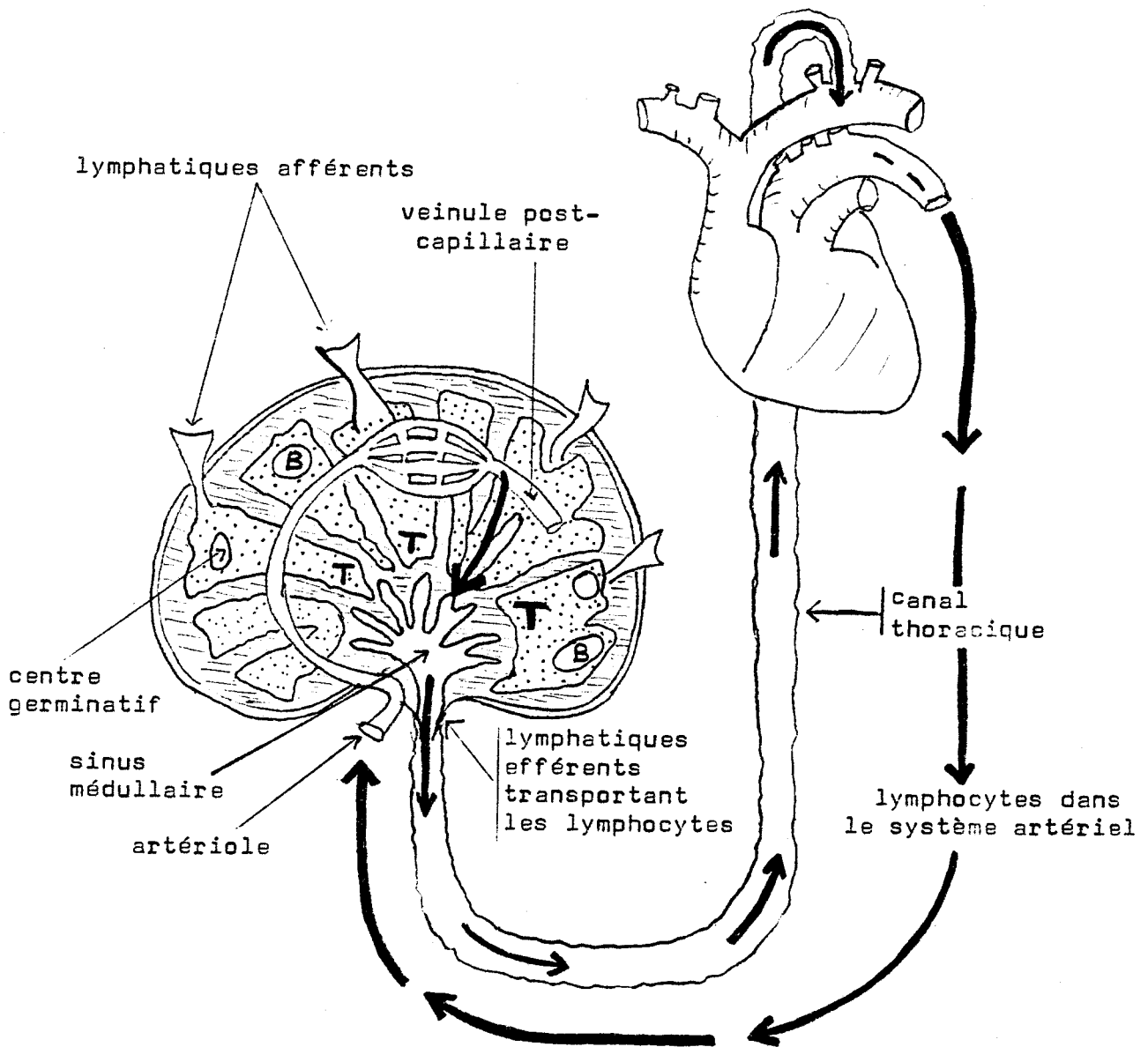


figure n° 2

Représentation schématique du ganglion et de la circulation lymphatique

(Douglas S.D. in Basic & Clinical Immunology, Lange Medical Publications, 1978, 81)



II.2. LES CELLULES LYMPHOIDES

II.2.1. Définition

Les cellules T et B, cellules lymphoïdes, sont des cellules qui assurent l'immunité spécifique à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale (GREAVES et al., 1973) (27). Elles sont caractérisées, du point de vue morphologique, par un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (rapport N/C). Ce sont des cellules de taille variable dont la morphologie peut se modifier en cellules lymphoblastiques au contact, par exemple, de mitogènes comme le Conca^ovalin A (Con. A) ou la phytohemmaglutinine (P.H.A.) (MOLLER, 1972) (54).

II.2.2. Origine des lymphocytes

Ils sont primitivement issus de cellules souches hématopoïétiques ayant la propriété de proliférer en divers cellules plus différenciées : érythrocytes, polynucléaires, lymphocytes, mégacaryocytes et monocytes. Chez le fœtus, ces cellules sont trouvées dans le sac vitellin puis, par migration, dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Ces cellules souches sont multipotentiellles, c'est-à-dire capables de se différencier vers une lignée sanguine quelconque. Le renouvellement des cellules souches est constant et assure la production de cellules plus différenciées (GREAVES et al., 1973) (27).

II.2.3. Durée de vie des lymphocytes

L'étude de la durée de vie des lymphocytes permet de distinguer deux types de cellules : les lymphocytes à durée de vie longue (plusieurs mois à plusieurs années) et ceux à durée de vie courte (quelques jours).

II.2.4. Circulation et re-circulation des lymphocytes

Une partie des lymphocytes sanguins peut passer dans la circulation lymphoïde, au niveau des ganglions, par le biais de veinules post-capillaires, puis regagner le tissu sanguin par le canal thoracique : c'est le phénomène de re-circulation. Cette re-circulation a une grande importance physiologique : elle permet aux lymphocytes d'aller à la rencontre des antigènes présents dans l'organisme quelque soit leur localisation (EVERETT et al., 1978) (26).

II.2.5. Transformation lymphoblastique

II.2.5.1. Définition

La transformation lymphoblastique est une étape normale lymphoïde et découle de la rencontre de lymphocytes avec un antigène vis-à-vis duquel ils sont sensibilisés (ou de la rencontre d'un mitogène non spécifique) (voir tableau n° 1 page 16). Cette transformation est suivie d'une phase proliférative et peut être étudiée par des méthodes morphologiques ou isotopiques

(précurseurs marqués de l'acide désoxyribonucléique - A.D.N. - ou de l'acide ribonucléique -A.R.N. -) (GREAVES et al., 1973) (27).

	HUMAIN		SOURIS	
	T	B	T	B
<u>PHYTOMITOGÈNES</u>				
Phytohemmaglutinine (P.H.A.)	++	?+	+	-
Concanavalin A (Con. A)	++	-	+	-
Pakewed mitogen (P.W.M.)	++	+	+	+
Insoluble P.H.A., Con. A, P.W.M.	+	+	+	+
<u>PRODUITS BACTÉRIENS</u>				
Lipopolysaccharides (L.P.S.)	-	-	-	+
Aggrégat de tuberculine	non étudiée		-	+
Tuberculine purifiée	+	+	non étudiée	
<u>DIVERS</u>				
Sérum anti immunoglobulines	-	+	-	?

Tableau n° 1

Principaux mitogènes de la lignée lymphoïde
chez l'homme et la souris

(D'après DOUGLAS S.D., Basic & Clinical Immunology, Lange Publications, 1978, 91)



II.2.5.2. Aspects morphologiques

L'aspect sera différent suivant qu'il s'agisse d'une stimulation sur les cellules B ou sur les cellules T.

Pour les lymphocytes B, le réticulum endoplasmique se développe considérablement, alors que pour les cellules T, on ne note que quelques lamelles, ces cellules sont en fait considérée comme des "plasmoblastes" du fait de cette stimulation ergastoplasmique propre aux lymphocytes. Pour l'ensemble des deux cellules, on note une augmentation de la taille et de la basophilie du cytoplasme et l'apparition de nombreux lysosomes, le noyau montre peu d'hétérochromatine et contient un large nucléole. Le cytoplasme est riche en ribosomes, l'appareil de Golgi est de grande taille, les mitochondries sont nombreuses et dilatées, certains éléments ont cependant un réticulum endoplasmique peu développé correspondant à des sécrétions plus ou moins importantes d'immunoglobulines (Ig) (JANNOSSY et al., 1973) (37).

II.2.5.3. Biochimie de la transformation lymphoblastique

On note une modification du taux d'A.M.P. cyclique, d'adenyl cyclase, de G.M.P. cyclique, un influx calcique et un turn over lipidique augmenté, une augmentation de la synthèse de l'A.R.N. et de la synthèse des protéines puis de l'A.D.N.

II.2.5.4. Coopération cellulaire dans la transformation lympho- blastique

La présence de macrophages est nécessaire à la transformation lymphoblastique (NELSON, 1976) (58), leur pourcentage ne doit cependant pas être ni trop élevé ni trop bas car la réaction est alors inhibée de façon définitive. (WING et al., 1978) (84)

II.2.6. Les cellules B

Il existe au minimum deux populations de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T dont l'origine est, pour les cellules B, la bourse de Fabricius chez les oiseaux. Cet organe, qui n'a pas d'équivalent chez les mammifères, est supposé avoir des zones de fonction équivalente disséminées dans tout l'organisme.

L'ontogenèse des cellules B est, du fait de l'absence d'un organe spécifique, beaucoup moins connue que celle des cellules T.

Les lymphocytes B sont impliqués dans les phénomènes de l'immunité humorale car, ils ont la propriété de sécréter des immunoglobulines des classes Ig G, Ig M, Ig A, Ig D et Ig E.

II.2.6.1. Marqueurs des lymphocytes B

Il faut faire la différence entre déterminant

antigénique, qui est une macromolécule présente à la surface de la membrane du lymphocyte (détectée par anticorps marqué), et récepteur, qui est aussi une macromolécule qui peut être caractéristique d'un type cellulaire et possède une affinité pour un ligant spécifique (ZULKERMAN et al., 1976) (85).

Les principaux déterminants antigéniques sont, pour les cellules circulantes, les Ig M, Ig D, Ig A (Ig M et Ig D) pouvant, dans certaines circonstances, être présents sur la même cellule.

Les récepteurs, pour les complexes antigènes-anticorps ou les agrégats d'immunoglobulines, sont des récepteurs spécifiques de la fraction Fc d'une molécule d'immunoglobuline. Il existe plusieurs récepteurs pour les fractions du complément : C₃ b, C₃ d, C₄ et un récepteur spécifique pour les alloanticorps (anti p 23,30) de découverte récente qui correspondrait aux antigènes Ia des B lymphocytes murins. (FEKETE et al., 1979) (21)

II.2.6.2. Propriétés des immunoglobulines et des récepteurs de membrane

Immunoglobulines et récepteurs ne sont pas immobiles à la surface de la cellule. Quand un déterminant ou récepteur est combiné avec sa molécule complémentaire, on assiste :

- à un phénomène de "patching" qui correspond à une aggrégation des immunoglobulines de surface,

- puis à un phénomène de "capping" qui correspond au groupement de "patches" à un pôle de la cellule près de l'appareil de Golgi,

- il y a ensuite une picnocyte aboutissant à la disparition des immunoglobulines.

Les immunoglobulines de surface réapparaissent en quelques heures à la surface de la cellule. L'ensemble du phénomène est dénommé "turn over" (PREUD'HOMME et al., 1974) (63).

II.2.7. Les cellules T

Encore apellées cellules thymo-dépendantes, ce sont les cellules impliquées dans les phénomènes de l'immunité cellulaire.

II.2.7.1. Marqueurs des lymphocytes T

Chez la souris, plusieurs déterminants des cellules T sont connus : Ag téta (θ), Ag thymus leukémia (T.L.), Ag Ly 1, 2 et 3... (CANTOR et al., 1975) (11). Chez l'homme, l'étude des déterminants antigéniques est encore au stade expérimental et la détermination de sous populations analogues aux sous populations définies chez la souris par les antigènes T.L. et Ly est à l'étude. Les récepteurs des lymphocytes T sont, chez l'homme, beaucoup mieux connus que ceux des lymphocytes B et utilisés pour l'étude des sous populations T. Les lymphocytes T ont la propriété de former des rosettes avec les érythrocytes de mouton (BACH, 1973) (5)

(STOBER et al., 1975) (77). Cette propriété n'est pas liée à une spécificité de l'antigène, ni inhibée par le sérum anti immunoglobuline. Les méthodes et techniques seront décrites au chapitre III.

II.2.7.2. Lymphocytes T helper (T_H) et I suppresseur (T_S)

Il existe également deux récepteurs pour le fragment Fc des Ig G et le fragment Fc des Ig M qui correspondent à deux sous populations de cellules T : les cellules T_H (pour les Ig M) et les cellules T_S (pour les Ig G). L'étude de l'effet facilitant ou suppresseur sur la prolifération polyclonale des cellules B de ces deux sous populations a permis de déterminer que la fraction T_H était la fraction facilitante et la fraction T_S la fraction suppressive (MORETTA et al., 1977) (53).

Il existe une troisième population de cellules T sans récepteurs connus : ce sont les cellules T nulles.

II.2.8. Les autres cellules lymphoïdes

Dans ce chapitre, nous parlerons des cellules Killer (K) (CORDIER et al., 1976) (13) et Natural Killer (NK) (HERBERMAN et al., 1979) (32) dont la filiation aux cellules lymphoïdes n'est pas formellement prouvée. Ces deux populations sont très voisines et, actuellement certains auteurs les rattachent l'une à l'autre (DE LANDAZURI et al., 1979) (15).

II.2.8.1. Les cellules K

Les cellules K sont des cellules qui ne possèdent ni déterminant ni marqueurs des cellules B ou T, à l'exception d'un récepteur pour le fragment Fc des Ig G. Les cellules K sont surtout définies par la fonction cytotoxique en A.D.C.C. (antibody-dependant cell cytotoxicity) (MOLLER, 1974) (55). Il faut cependant signaler que d'autres cellules peuvent donner des phénomènes d'A.D.C.C. dans certaines conditions : cellules NK (DE LANDAZURI et al., 1979) (15), cellules T μ (HANDWERGER et al., 1979) (30), cellules T γ (HANDWERGER et al., 1979) (30), macrophages ou précurseurs (LHOMANN-MATHES et al., 1979) (48), cellules B (JUY et al., 1976) (38) et éosinophiles (CAPRON et al., 1977) (12).

Les cellules K semblent représenter une population hétérogène incluant peut-être les précurseurs des cellules B ou T ou incluant des cellules pré-thymiques ayant échappé à la maturation thymique ou des cellules thymiques dédifférenciées.

Le phénomène d'A.D.C.C., non spécifique à un antigène, nécessite la présence d'une cellule cible recouverte de très faible quantité d'anticorps (Ig) (MAC LENNAM, 1972) (50) anti cellule cible en l'absence de complément : érythrocytes de mouton recouverts d'Ig G anti érythrocytes de mouton, lymphocytes recouverts d'anticorps anti H.L.A...., une incubation préalable anticorps/cellules cibles. Le phénomène A.D.C.C. est rapide (quelques heures) et sa cinétique superposable à celle d'une réaction enzymatique (HERRICK et al., 1978) (33). L'effet A.D.C.C. semble

potentialisé par l'interféron (ATALLAH et al., 1979) (1).

La signification de l'A.D.C.C. et le rôle des cellules K sont mal connus mais, les applications du phénomène sont considérables dans les problèmes de tolérance impliqués dans les greffes d'organe, dans les tumeurs, les parasitoses (éosinophiles + Ig G ra, éosinophiles + Ig E...) et, peut-être dans les affections comme la maladie de Hansen.

II.2.8.2. Les cellules NK

Ces cellules, encore moins connues que les cellules K, s'en distinguent par leurs particularités à exercer une cytotoxicité naturelle en l'absence d'anticorps ; cependant, de récents travaux semblent indiquer que les cellules K et NK sont une seule et même cellule (DE LANDAZURI et al., 1979) (15). Elles possèdent ni déterminants ni marqueurs connus. Leur existence a été révélée par leur fonction Natural Killer, qui se révèle par leur pouvoir lytique "in vitro" vis-à-vis de certaines lignées de cellules lymphoblastiques viro-induites, cette action ne nécessite pas la présence d'immunoglobuline ou du complément. Leur présence a été observée au sein de tumeurs. L'interféron potentialise l'action NK sur la lyse des lymphoblastes viro-induits (ATALLAH et al., 1979) (1).

L'action des cellules NK n'est pas spécifique à un antigène, et leur rôle est identique à celui des cellules K.

II.2.9. Répartition des cellules lymphoïdes dans les différents
tissus chez l'homme

Les pourcentages des cellules lymphoïdes dans les différents tissus, chez l'homme, sont indiqués dans le tableau n° 2 page 25.

	T	T μ	T γ	B	K	NK
sang	de 55 %	de 75 %	de 15 %	de 15 %	10 %	5 %
périphérique	à 75 %	à 85 %	à 20 %	à 30 %		
moelle	< 25 %	idem	idem	> 75 %	?	?
ganglion lymphatique	75 %	idem	idem	15 %	< 2 %	?
lymphe	> 75 %	idem	idem	< 25 %	?	?
rate	50 %	idem	idem	50 %	≈ 10 %	?
amygdales	50 %	idem	idem	50 %	?	?
thymus	> 75 %	idem	idem	< 25 %	< 0,01 %	?

T = cellules T

T μ = lymphocytes T helper

T γ = lymphocytes T supresseurs

B = lymphocytes B

K = cellules Killer

NK = cellules Natural Killer

Les pourcentages sont exprimés par rapport aux cellules mononuclées.

Les pourcentages de T μ et de T γ sont exprimés par rapport aux cellules T.

Tableau n° 2

Répartition des cellules lymphoïdes dans les différents tissus chez l'homme

(D'après DOUGLAS S.D. in Basic & Clinical Immunology

Lange Medical Publications, 1978, 81)



II.3. LES MONOCYTES-MACROPHAGES

On inclut dans ce groupe monocytes-macrophages, les monocytes sanguins qui sont les précurseurs des cellules macrophages (NELSON, 1976) (58).

II.3.1. Ontogénèse

Le macrophage provient de cellules souches hématopoïétiques. L'intermédiaire entre monocytes et cellules souches est le promocyte, mais il existerait d'autres cellules intermédiaires. La différenciation entre cellules souches et monocytes se fait dans la moelle osseuse (NELSON, 1976) (58).

II.3.2. Différenciation des monocytes

Les monocytes sanguins quittent les vaisseaux par diapédèse et se fixent dans divers tissus (NELSON, 1976) (58) comme nous l'indiquons sur le tableau n° 3 page 27.

CELLULES	LOCALISATION
cellules souches	moelle osseuse
promocytes	moelle osseuse
monocytes	moelle osseuse, sang
macrophages	tissu conjonctif (histiocytes) foie (cellules de Kupffer) poumons (macrophages alvéolaires) rate (macrophages libres et liés) ganglions lymphatiques (macrophages libres et liés, cellules dendritiques) moelle (macrophages) séreuses (macrophages péritoneaux et pleuraux) os (ostéoclastes ?) système nerveux (cellules microgliales ?)

Tableau n° 3

Le système monocytes-macrophages

(In Bull. W.H.O., 1972, 46, 849)



II.3.3. Morphologie

La morphologie est variable suivant qu'il s'agisse d'un monocyte, d'un macrophage actif, d'un histiocyte... Cependant, de nombreux critères les différencient des autres cellules. Nous donnerons ici les caractéristiques des monocytes-macrophages :

- présence de pseudopodes qui résultent de l'étirement de la cellule et qui sont des prolongements du hyaloplasme de longueur variable. Ces hyaloplasmes sont émis non seulement sur le diamètre des cellules, mais aussi sur l'ensemble de celle-ci, ils sont très augmentés lorsque les macrophages sont "activés" (STEIGBIGEL et al., 1974) (75).

- Le cytoplasme des monocytes-macrophages contient de nombreux organites : mitochondries, réticulum endoplasmiques en importance variable, appareil de Golgi, lysosomes en nombre variable suivant que la cellule est active ou non, structures rétractiles qui seraient responsables de la motilité des cellules, et enfin de vacuoles de pinocytoses et de phagocytoses lorsque ces macrophages ou monocytes sont actifs et possèdent des propriétés phagocytaires.

II.3.4. Propriétés

En dehors de la fonction non immunitaire (détoxification, dégradation des graisses, des protéines et des polysaccharides) les fonctions des macrophages dans l'immunité sont : la phagocytose, la pinocytose, la synthèse de fractions du complément

et la synthèse d'interféron, ils jouent aussi un rôle important dans l'hypersensibilité retardée et l'immunité humorale (KRAHENBULH et al., 1974) (45), (MOLLER, 1974) (56), (NELSON, 1972) (57), (NELSON, 1976) (58).

Le rôle du macrophage dans l'H.R. sera étudié plus loin. Nous allons étudier ici simplement et rapidement les fonctions phagocytaires et pinocytaires en portant une attention spéciale sur les causes de la multiplication intra-cytoplasmique de certaines bactéries :

- La pinocytose est le processus d'ingestion des particules dont le diamètre est d'environ 10 nm.

- La phagocytose est le processus d'ingestion des particules plus volumineuses.

Le processus de phagocytose est schématiquement le suivant :

- Déplacement de la cellule pour venir au contact de la cellule à phagocyter, puis adhérence. La nature des particules à ingérer, certaines fonctions extra-cellulaires (température, pH, force ionique, composition du milieu, présence ou non de complément, d'anticorps liés à l'antigène...) conditionnent cette opération (GRIFFIN et al., 1973) (28).

- Ingestion par invagination de la membrane puis

fusion : la particule se trouve donc ingérée dans une vacuole de phagocytose (STEIGRIGEL et al., 1974) (76).

- Digestion par action lysosomale,

- ou persistance qui entraîne, lorsqu'il s'agit de bactéries, plusieurs conséquences : ces bactéries sont à l'abri de l'atteinte des antibiotiques et également à l'abri des mécanismes humoraux. Les macrophages, dans lesquels persistent ces bactéries, perdent en partie leur pouvoir phagocytaire. Cependant, certains protozoaires parasites, bactéries et virus (toxoplasma, histoplasma, pasteurilla, brucella, mycobactérium tuberculosis, M. leprae...) peuvent se multiplier activement dans le cytoplasme du macrophage. Le mécanisme de cette multiplication est dû à l'inhibition de la décharge du contenu lysosomal au sein de la vacuole de phagocytose (FAUVE et al., 1971) (20), (GOREN et al., 1976) (29) permettant à la bactérie de résister aux antibiotiques (qui sont ingérés dans les lysosomes secondaires) et de détruire la cellule par effet toxique dû à la diffusion de certains métabolites bactériens lors de la multiplication bacillaire (GOREN et al., 1976) (29). Les mécanismes de cette multiplication intramacrophagique seraient dûs, chez les sujets LL, à la non-coopération T-macrophage (voir chapitre I, paragraphe I.4.)

II.4. LA REACTION D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE CHEZ LE SUJET SAIN

II.4.1. Définition

La réaction d'hypersensibilité retardée (H.R.) a pour

modèle la réaction observée dans l'allergie tuberculeuse. Le caractère retardé concerne l'expression de la réaction provoquée par la deuxième stimulation de la substance antigénique, et est connue sous le nom de phénomène de Koch (1890) : une deuxième injection intradermique d'un antigène à un hôte préalablement sensibilisé provoque une réaction à médiation cellulaire (TURK, 1974) (81) montrant, dès la 24^e heure, une papule érythémateuse prurigineuse pouvant se nécroser et dont l'infiltrat est essentiellement constitué de macrophages, de lymphocytes et d'histiocytes (TURK, 1974) (81). Cette réaction est transmise par les cellules (BLOOM et al., 1967) (6) et non par le sérum, ce qui la différencie des réactions de type allergique, anaphylaxie, ou semi-retardée (arthus). La réaction d'H.R. traduit à la fois un état d'hypersensibilité et, dans le phénomène de Koch, également une augmentation de la résistance du sujet : en effet, si on injecte à un cobaye du bacille tuberculeux vivant, il se produit en 10 à 14 jours, un nodule au site d'inoculation accompagné d'une adénopathie régionale évoluant vers la nécrose, l'ulcération et la mort de l'animal, tandis que la deuxième injection de bacille tuberculeux vivant, par voie intradermique, provoque une réaction d'H.R. évoluant habituellement vers la guérison.

Les critères de classification de cette réaction sont :

- Le délai d'apparition (12 à 48 heures), d'où le nom d'hypersensibilité retardée par rapport aux phénomènes d'apparition immédiate, phénomènes d'anaphylaxie, ou d'apparition plus précoce, phénomènes d'arthus (TURK, 1974) (81).

- L'infiltrat : prédominance de cellules mononuclées au sein d'un infiltrat périvasculaire (TURK, 1974) (81).

- La possibilité du transfert de la réaction par les cellules et jamais par le sérum des sujets sensibilisés, d'où le nom d'hypersensibilité à médiation cellulaire par opposition à l'hypersensibilité à médiation humorale (DIENER et al., 1977) (16).

- La nature des cellules lymphoïdes présentes lors de cette réaction : les cellules effectrices sont des lymphocytes de type T alors que l'immunité à médiation humorale a des cellules B pour effectrices, devenues des plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques avec ou sans la coopération des cellules T et des macrophages (dépendant du degré de thymo-dépendance de l'antigène).

- La spécificité de la réaction : la réponse optimale vis-à-vis d'un antigène voisin de l'antigène relaté ne provoque pas ou peu de réaction d'H.R. chez le sujet (KATZ, 1977) (42). Cette propriété pourrait être importante pour les formes lépromateuses polaires de la maladie de Hansen comme nous le verrons ultérieurement.

ANTIGENES	REACTIONS IMMUNITAIRES
bactéries, virus	hypersensibilité retardée
levures, protozoaires, parasites	résistance cellulaire acquise
protéines + adjuvant complet	hypersensibilité retardée
protéines sans adjuvant	hypersensibilité retardée à basophiles (réaction de Jones Mott)
haptène + protéine autologue	dermite de contact
antigène de transplantation	rejet des allogreffes, réaction du greffon contre l'hôte
antigènes tumoraux	resistance aux tumeurs, rejet des tumeurs
antigènes tissulaires	certaines maladies auto-immunes expérimentales

Tableau n° 4

Différents types de réactions cellulaires
en fonction des antiqènes

(In Bach J.F. Immunologie, Flammarion Sciences Médecine, 1979, 342)



II.4.2. Induction de l'hypersensibilité retardée

De nombreux antigènes bactériens peuvent induire une réaction d'H.R. Le plus connu est l'antigène protéinique de *M. tuberculosis*, mais on peut avoir une réaction d'H.R. avec *C. parvum*, *brucella abortus*, les antigènes protéiques du pneumocoque, les virus herpétiques et varioliques, les *Candida albicans*, Blastomycose... et bien entendu *M. leprae* (TURK, 1974) (81).

Les injections d'antigène doivent être faites par voie intradermique, d'autres voies peuvent conduire à une synthèse d'anticorps et non à une H.R. On peut, par exemple provoquer une réaction dite de Jones Mott (DVORAK et al., 1970) (17), ou une réaction d'H.R. à basophile de faible intensité, pouvant être transmise par les lymphocytes et le sérum, avec des polynucléaires basophiles dans l'infiltrat cellulaire (50 à 70 %). Cette réaction transitoire peut être obtenue en 24 heures mais disparaît généralement en 1 à 4 semaines en même temps que le taux d'anticorps s'élève. La valeur et la signification de cette réaction sont peu connues mais peuvent être en rapport avec la nature de l'agent utilisé, et pourrait traduire une "déviation" de la réponse d'H.R.

Certains antigènes de faible poids moléculaire (< 1000), fortement électrophiles et capables de former des liaisons covalentes avec les groupements aminés ou sulfhydriles des protéines présentes dans le revêtement cutané, peuvent provoquer une réaction d'H.R. par contact cutané ; les plus couramment utilisés en expérimentation sont le Dinitrofluorobenzène (D.N.F.B.) et le

Dinitrochlorobenzène (D.N.C.B.) (CATALONA et al., 1972) (12 bis).

Les antigènes de transplantation et les antigènes tumoraux peuvent également induire une réaction d'H.R.

II.4.3. Mécanismes cellulaires de l'hypersensibilité retardée

Les cellules T jouent un rôle primordial dans la réaction d'H.R., mais la participation des cellules B, si elle est plus douteuse, n'en est pas exclue, car les cellules B sont capables de produire des médiateurs solubles ou lymphokines.

Les lymphocytes T se sensibilisent à l'antigène soit dans le tissu périphérique, soit dans la zone exposée à l'antigène.

Ces lymphocytes T sensibilisés ne répondent donc spécifiquement qu'à l'antigène sensibilisant, certains deviendront des cellules à "vie longue" circulant et gardant des années la mémoire de cette sensibilisation.

Lors d'une ré-exposition à l'antigène, les cellules T sensibilisées se transforment en cellules lymphoblastiques et rentrent en phase proliférative. Ces lymphocytes ré-exposés produisent alors de nombreux médiateurs solubles ou lymphokines qui sont libérés au site de déposition de l'antigène, commandant et régularisant l'H.R. en "appelant" et activant les macrophages et en les immobilisant au site de déposition de l'antigène. Par ailleurs, ces lymphocytes T sensibilisés ou non peuvent agir directement en exerçant une activité "Killer" sur les cellules

portant des antigènes spécifiques : c'est le phénomène de lymphotoxicité. Une autre fonction importante des cellules T est la régulation de la réponse immunitaire par les sous populations T helper et T suppresseur rencontrées dans les fractions T ayant un récepteur pour les Ig M (T_{μ}) ou pour les Ig G (T_{γ}).

Si les lymphocytes jouent un rôle central dans l'H.R., ils ne peuvent cependant agir seuls. Les macrophages sont indispensables à la réaction d'H.R. D'une façon générale, les réactions d'H.R. et d'immunité à médiation humorale ne sont pas cloisonnées les unes par rapport aux autres. En effet, lorsque, pour un antigène, se produit une réaction d'H.R., une réaction à médiation humorale se produit également, mais le mécanisme de défense vis-à-vis de cet antigène se fait, pour l'essentiel, par le mécanisme de défense lié à l'H.R. (FELDMANN et al., 1976) (24).

II.4.3.1. Notions d'antigènes thymo-dépendants et thymo-indépendants

Un antigène est dit thymo-dépendant lorsque la formation d'anticorps vis-à-vis de cet antigène nécessite la présence de cellules T. Un antigène thymo-indépendant ne nécessitera pas la collaboration des cellules T pour la production d'anticorps. Cependant, pour les antigènes thymo-indépendants, la production d'anticorps peut être modulée par la fraction suppressive des cellules T (T_{γ}) (FELDMANN et al., 1972) (23).

Pour les antigènes thymo-dépendants, outre les lymphocytes T, les macrophages sont indispensables à la production

d'anticorps par les cellules B. Les antigènes qui induisent une réponse à médiation cellulaire sont en général des antigènes thymo-dépendants.

II.4.3.2. Régulation génétique de la réponse immunitaire

Chez la souris, les réponses immunitaires à médiation humorale ou à médiation cellulaire sont sous le contrôle des gènes Ir (KATZ et al., 1975) (44). Ces gènes Ir sont associés au complexe majeur d'histocompatibilité (HAUGHTON et al., 1976) (31) mais, il existe également d'autres locus non associés au complexe majeur d'histocompatibilité (C.M.H.) connus par leur pouvoir à modifier la réponse immunitaire (KATZ et al., 1975) (44). Il existe un grand nombre de gènes Ir contrôlant les réponses immunitaires. Un gène Ir n'est pas spécifique d'un antigène ou de la production d'un anticorps, mais contrôle et réagit vis-à-vis d'antigènes différents, il contrôle la synthèse d'anticorps très hétérogènes (SHREFFLER et al., 1975) (73).

Chez la souris, les gènes Ir s'exprimant par leurs antigènes Ia au niveau des lymphocytes T, des macrophages et peut-être au niveau des lymphocytes B, sont en majorité liés aux gènes codant le C.M.H. et liés au locus H₂ qui contrôle également d'autres réactions immunologiques comme le montre la figure n° 3 page 38.

		REGION H ₂					
		K	Ir-1A	Ir-1B	I-C	S	D
FONCTIONS PRINCIPALES							
Antigènes de transplantation		■	■	■			■
Détection sérologique des antigènes H ₂		■					■
Antigènes cibles LMC		■					■
Protéines Ss : niveau dans C		▣	■	■			
Réponses immunes		■	■	■	■		■
R.L.M., stimulation							
G.V.H.R.			■	▣	■		

Figure n° 3

Carte du complexe H₂ montrant la localisation probable des gènes contrôlant les fonctions mentionnées ci-dessus

Les zones hachurées indiquent que la localisation n'est pas certaine.

C = complément

R.L.M. = réaction lymphocytaire mixte

L.M.C. = lymphotoxicité à médiation cellulaire

G.V.H.R. = réaction greffe-hôte

(Shreffler D.C., David C.S., In Basic & Clinical Immunology

Lange Medical Ed. 1978,163)



Chez l'homme, les données sur les gènes Ir liés au système H.L.A. sont beaucoup moins connus que chez la souris mais, le modèle animal, pour la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène, est superposable (KATZ, 1977) (41).

II.4.3.3. Mécanismes génétiques de la réaction immunitaire

Les gènes Ir coderaient les antigènes Ia pour les macrophages et les lymphocytes T (MILLER et al., 1976) (52). L'antigène Ia inter-agirait alors avec les antigènes thymo-dépendants de façon à ce que les lymphocytes T helper se différencient et reconnaissent spécifiquement les deux composants (l'antigène introduit et l'antigène Ia) présents à la surface des macrophages (FELDMANN et al., 1972) (23), (KATZ, 1972) (40). Si les antigènes Ia présents à la surface des macrophages sont incapables de réagir avec les antigènes introduits, la population de T helper ne se développera pas. Si l'antigène introduit a déclenché une réponse anticorps pour ces fractions thymo-indépendantes, il se développera une prolifération de T suppressive (ASHERSON et al., 1976) (2) qui supprimera par la suite et la réaction d'H.R. et, dans une certaine mesure, la réaction à médiation humorale (TADA et al., 1976) (80).

II.4.3.4. Interaction cellulaire

Les macrophages interviennent dans la présentation de l'antigène aux cellules T et/ou B et la coopération B-T (FELDMANN et al., 1972) (23).

Pour la production des anticorps, il semble que le macrophage présente aux lymphocytes B un antigène préalablement traité ou modifié par digestion enzymatique, il faut ajouter que cette fonction du macrophage est proportionnelle à la thymo-dépendance de l'antigène, en effet, des macrophages thymo-indépendants peuvent induire une réaction à médiation humorale en l'absence de macrophages.

Pour l'immunité à médiation cellulaire, les mécanismes semblent être les mêmes que pour la production d'anticorps, ajoutons que les macrophages peuvent également avoir une activité cytotoxique non spécifique après avoir été "armés" par certains lymphokines.

La nécessité d'un contact entre lymphocytes et macrophages et les restrictions génétiques exposées ci-dessus conditionnent ces mécanismes.

Pour la coopération B-T dans le cas des antigènes thymo-dépendants, le macrophage est nécessaire ainsi que les lymphocytes T (voir figure n° 3 page 41 bis)

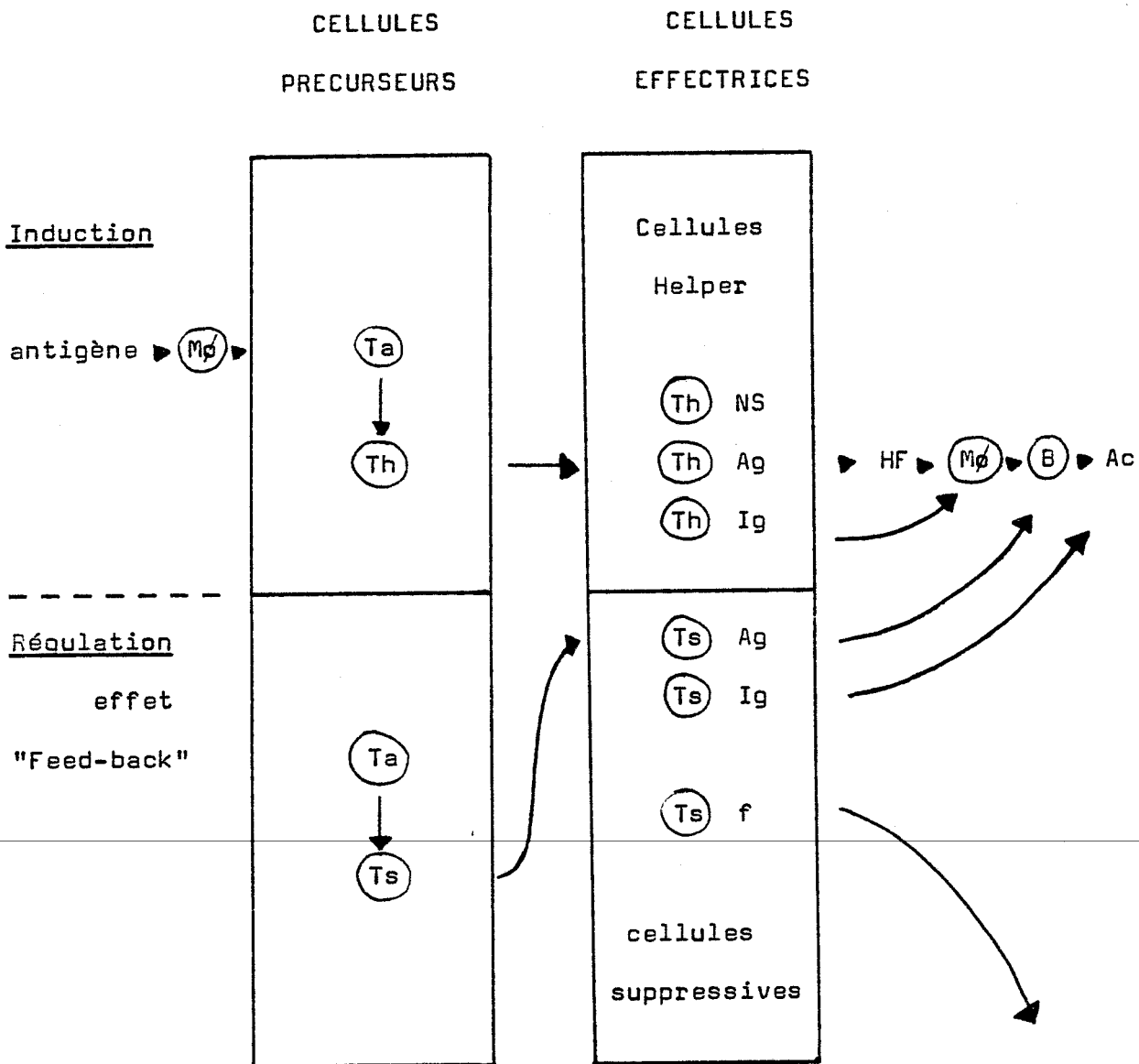
Les macrophages pourraient agir par l'intermédiaire de "monokines" (DIENER et al., 1977) (16) (portant des antigènes Ia ou activant les antigènes Ia ?) parmi lesquels :

- le macrophage non spécifique factor (M.N.S.F.)
- le genetically related factor(G.R.F.)

- Le lymphocyte activating factor (L.A.F.)

Le macrophage peut également acquérir des propriétés suppressives dans les réactions immunitaires probablement par la sécrétion d'une monokine suppressive (sur l'antigène Ia ?).

Le problème est en fait très complexe, et l'interaction cellulaire est probablement aussi médiée par l'intermédiaire de facteurs libérés par les lymphocytes : les facteurs helper (H.F.) et les facteurs suppresseurs (S.F.) portés respectivement par les lymphocytes T helper et T suppresseurs (FELDMANN et al., 1979) (22). De plus, les populations T helper et T suppressives ne sont pas homogènes. Il existerait plusieurs classes de cellules helper avec une population non spécifique, une ou deux populations spécifiques de l'antigène et partageant des structures communes entre antigène Ia et immunoglobulines des cellules B (FELDMANN et al., 1979) (22), (JANEWAY et al., 1979) (35). De même pour les cellules suppressives, il existerait une population suppressive non spécifique de l'antigène et des populations spécifiques de l'antigène partageant des structures communes entre antigène Ia et immunoglobulines des cellules B (FELDMANN et al., 1979) (22).



Mφ = macrophage

Ta = lymphocyte T activé

Th = lymphocyte helper

NS = non spécifique

Ag = antigène

HF = facteur helper

Ac = anticorps

Ig = immunoglobuline

Ts = lymphocyte T suppresseur

Tsf = lymphocyte T suppresseur

agissant par effet "feed-back"

Schéma de la coopération T-B dans la réponse immune

Figure n° 4

II.4.3.5. Rôle des lymphocytes

Les cellules T sont indispensables à la réaction d'H.R. mais doivent, pour agir, coopérer avec d'autres cellules. Des tests de transformation lymphoblastique (T.T.L.) pratiqués avec uniquement des lymphocytes purifiés ne montrent pas de réponses prolifératives.

II.4.3.6. Rôle des macrophages

Lorsque l'on supprime les macrophages d'une culture en vue d'un T.T.L., ici également, il ne se produit pas de réponse proliférative. L'interaction entre les cellules T et les macrophages représente donc une étape indispensable pour l'accomplissement de la réaction d'H.R. Cette réaction s'effectue en deux temps :

- un temps indépendant de l'antigène avec agglutination des lymphocytes autour des macrophages, les lymphocytes B sécrétants d'anticorps et/ou les lymphocytes T participent à cette agglutination, cette réaction demande un métabolisme des macrophages intégral et la présence d'ions Ca^{++} , elle est inhibée par trypsination des macrophages (CALDERON et al., 1975) (10).

- un temps spécifique sous la dépendance de l'antigène, seuls les lymphocytes T sont agglutinés : cette réaction est irréversible, nécessite l'intégralité des métabolismes du macrophage et s'effectue sous le contrôle des antigènes d'histocompatibilité. Les monocytes ne se transforment pas, ne prolifèrent pas, mais

jouent un rôle essentiel dans la présentation de l'antigène aux cellules T (UNANU, 1972) (82).

Par ailleurs, par l'intermédiaire des lymphokines, ces macrophages jouent un rôle régulateur dans la réponse d'H.R.

II.4.4. Expression de l'hypersensibilité retardée "in vitro"

II.4.4.1. Test de transformation lymphoblastique (T.I.L.)

La mise en culture de lymphocytes d'un sujet sain sensibilisé par un antigène avec cet antigène provoque une transformation des cellules lymphoïdes en cellules blastiques qui prolifèrent. Cette transformation blastique et cette prolifération peuvent être appréciées soit par coloration de May-Grunwald Giemsa (M.G.G.), soit par mesure de l'incorporation de thymidine marquée au tritium (^3H Thy). Au contraire du T.T.L. pratiqué avec des mitogènes (Concanavaline A, phytohemmagglutinine), la transformation blastique avec un antigène n'est obtenue que si le sujet a été préalablement sensibilisé par cet antigène. Mais cependant, ce test n'est pas spécifique de l'H.R., en effet les lymphocytes des sujets atteints d'allergie de type immédiat (à médiation humorale) se transforment et prolifèrent "in vitro" au contact de l'allergène (STROBER et al., 1975) (77).

II.4.4.2. Cytotoxicité à médiation cellulaire

Dans ces phénomènes, plusieurs mécanismes peuvent

exister :

- l'action directe des T lymphocytes,
- l'action cytotoxique d'anticorps en présence de cellules K ou de macrophages,
- la libération par les lymphocytes de facteurs cytotoxiques vis-à-vis de cellules cibles (lymphotoxines) ou de substances provoquant l'activation des macrophages vis-à-vis des cellules cibles adjacentes,
- et le système d'interféron stimulant la production de cellules K vis-à-vis de cellules tumorales.

Le mécanisme essentiel demeure la cytotoxicité exercée par les cellules T : la lyse cellulaire est obtenue par un contact direct entre le récepteur spécifique des T cytotoxiques et l'antigène présent à la surface de la cellule cible. Cette lyse s'effectue en l'absence d'anticorps et de complément, nécessite la coopération macrophage-T et obéit au phénomène de restriction syngénique : les cellules se différenciant en cellules T cytotoxiques ne répondent aux antigènes conventionnels que lorsque ces derniers se trouvent associés à des antigènes codés par le C.M.H. (vis-à-vis d'antigènes d'histocompatibilité mineur - virus ou haptènes - présents à la surface des cellules nucléées, il faut, pour avoir un effet cytotoxique, que ces antigènes soient liés à des produits des gènes H-2D ou H-2K). On ignore si les déterminants antigéniques

doivent être associés à la cellule cible ou au macrophage, ou seulement présents sous forme libre. Il existe donc entre ce mécanisme et la réponse proliférative une différence importante, en effet dans la réponse proliférative, l'interaction macrophage-T s'effectue par l'intermédiaire de la région I du C.M.H. (BACH, 1979) (4).

II.4.4.3. Test de duplication virale

La duplication virale (polio, rougeole...) nécessite la présence de T lymphocytes activés par un antigène ou mitogène. On peut alors compter le nombre de cellules T actives en provoquant la lyse cellulaire de cellules sensibles à l'effet cytopathogène du virus. Le macrophage est indispensable dans cette réaction : des cellules ganglionnaires de cobaye sensibilisés par le B.C.G. sont lysées par la présence de tuberculine, cet effet cesse si on supprime les macrophages (ou plutôt les cellules adhérentes qui sont en fait des macrophages activés). Cette réaction est proportionnelle au carré du nombre de lymphocytes présents. Ce test nécessite donc la coopération T-macrophages.

II.4.4.4. Test d'inhibition de la migration des macrophages

Des cellules péritonéales d'un animal (cobaye) sensibilisé à la tuberculine recueillies trois jours après injection d'adjuvant de Freud sont capables de migrer en 16 à 24 heures sur le fond d'une chambre de migration sauf si l'antigène est présent dans la chambre de migration. Cette technique s'applique

également aux macrophages sanguins avec lesquels cet test peut être réalisé (DAVID et al., 1972) (14). Cette inhibition de la migration est sous la dépendance du macrophage inhibiting factor (M.I.F.) (REMOLD, 1974) (66) produit et libéré par les lymphocytes sensibilisés en présence d'antigènes. La réaction est empêchée par la chaleur, altérée par le temps et les enzymes protéolytiques.

Le M.I.F. n'est pas un anticorps, il est cytophile, il rend les macrophages plus adhérents au verre, il accroît leurs capacités phagocytaires, et il les rend plus actifs (augmentation de la lactate déhydrogenase (L.D.H.), de la glycuronidase et du G.M.P. cyclique).

Si, chez le cobaye, l'inhibition de la migration des macrophages et son rapport avec les réactions d'H.R. sont bien établis, chez l'homme, les conclusions ne peuvent être aussi formelles : si un antigène est responsable de l'inhibition de la migration de cellules de malade, alors que la migration est normale en présence de donneurs sains, on ne peut que conclure à l'existence d'un état de sensibilisation sans préjuger de son mécanisme immunologique (ROCKLIN, 1974) (69).

II.4.5. Produits d'activation des lymphocytes et médiateurs humoraux de l'hypersensibilité retardée, aspects biologiques

Les produits d'activation et de médiation, ou lymphokines (REMOLD, 1972) (65), sont indiqués sur le tableau n° 5 page 48 et suivantes.

Les substances responsables de ces effets ne sont pas des immunoglobulines pour la plus part : la précipitation par le sulfate d'ammonium ne fait pas disparaître l'activité biologique du surnageant et, leur injection provoque une réaction d'H.R. plus rapide, ce qui donne à penser qu'elles sont effectivement libérées par les lymphocytes activés au contact de l'antigène "in vivo".

CELLULE-CIBLE	FACTEUR	EFFET OBSERVE
Macrophage	MIF : "Macrophage inhibiting factor"	Inhibition de la migration des macrophages " <u>in vitro</u> ". Modification de la membrane.
	MAF : "Macrophage agglutinating factor"	Agglutination des macrophages en suspension.
	MSF : "Macrophage spreading inhibitory factor"	Inhibe l'étalement des macrophages sur la surface d'un hématimère.
	CF : "Chemotic factor"	Provoque la migration des macrophages ou des monocytes à travers les pores d'une membrane.
	MAF : "Macrophage activating factor"	Augmente la consommation d'oxygène, la biosynthèse des lipides et la glycolyse. Stimule la lyse intracellulaire des bactéries phagocytées et la lyse des cellules allogéniques.
	* "Macrophage arming factor"	Induit ou augmente l'effet cytotoxique des macrophages vis-à-vis des cellules tumorales.

CELLULE-CIBLE	FACTEUR	EFFET OBSERVE
Macrophage (suite)	Anticorps cytophiles	Confèrent une certaine spécificité antigénique à la phagocytose (et à d'autres fonctions du macrophage ?).
	MMF : "Macrophage mitogenic factor"	Provoque l'incorporation de thymidine marquée et la multiplication des macrophages.
	Facteurs suppresseurs	Inhibe le transfert d'HR, se fixe sur les macrophages, supprime l'inhibition de migration des macrophages.
Lymphocytes	MF : "Mitogénic factor" ou	Provoquent la transformation lymphoblastique et la division des lymphocytes (B) normaux.
	BF : "Blastogenic factor"	
	TF : "Transfert factor" ou "Transfert factor like mediator"	Rend les lymphocytes de sujets non immuns capables de réagir spécifiquement au contact de l'antigène.



CELLULE-CIBLE	FACTEUR	EFFET OBSERVE
Lymphocytes (suite)	Facteurs "helper" ou supresseurs	Spécifiques ou non de l'antigène, associés ou non aux antigènes codés par le complexe majeur d'histocom- patibilité.
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES	LIF : "Leucocyte Inhibitory factor" NIF : "Neutrophil inhibitory factor"	Inhibent la migration des poly- nucléaires neutrophiles.
	CF : "Chemotactic factor"	Accélère le passage des polynu- cléaires neutrophiles à travers les pores d'une membrane.
POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES	ECF : "Eosinophil chemotactic factor"	Attire les éosinophiles. Agit seul ou en présence de com- plexes antigène-anticorps.
	"Eosinophil promo- ting factor"	Augmente la migration des éosino- philes en gel d'agarose.
LIGNEES CELLULAIRES	LT : Lymphotoxine	Effet cytotoxique sur certaines lignées cellulaires (surtout les cellules L).

CELLULES-CIBLE

FACTEUR

EFFET OBSERVE

- 51 -

LIGNEES

CELLULAIRES

(suite)

PIF : "Prolifération

inhibitory

factor"

CPIF : "Cloning

inhibitory

factor"

Inhibent la prolifération cellulaire et la formation de clones (cellules Hela).

IF : "Interféron"

Diminue l'effet cytopathogène des virus sur les cellules en culture.

CELLULES

HEMATOPOIETIQUES

CSF : "Colony

stimulating

factor"

Stimule la différenciation des cellules souches médullaires en cellules myéloïdes ou monocytaires.

OSTEOCLASTES

DAF : "Ostéoclast

activating

factor"

Augmente l'activité ostéoclastique mesurée par libération du ⁴⁵Ca à partir d'os d'embryon "in vitro".

EFFETS "in vivo"

SRF : "Skin

reactive

factor"

Augmente la perméabilité capillaire mesurée par la diffusion extra-vasculaire d'albumine marquée. Favorise une réaction inflammatoire dans la peau de cobaye avec infiltration par des cellules mononucléées.

CELLULE-CIBLE	FACTEUR	EFFET OBSERVE
EFFETS " <u>in vivo</u> " (suite)	LNAF : "Lymph node activating factor"	Augmente le poids du ganglion lymphatique, augmente le nombre de cellules dans les zones thymo-indépendantes.
	MIF (?)	Diminue le taux des monocytes circulants.

* Le "macrophage arming factor" a été aussi appelé "specific macrophage arming factor" (SMAF), par référence à une éventuelle spécificité pour l'antigène. On le distingue du "macrophage activating factor", dont l'action n'est pas spécifique de l'antigène.

** Ce terme est mal choisi car il risque de prêter à confusion avec le facteur de transfert dialysable, facteur extrait des lymphocytes d'un sujet sensibilisé. Le "transfer factor-like mediator" est libéré par les lymphocytes sensibilisés lors d'un contact avec l'antigène spécifique.

Tableau n° 5

Effets biologiques des produits d'activation des lymphocytes

(In Bach J.F., Immunologie, Flammarion Médecine Science Ed, 1979,
362, 363)

II.4.6. Suppression de l'hypersensibilité retardée

Il existe plusieurs phénomènes bloquant la réaction d'H.R., nous ne ferons que les citer ici en développant par la suite leur mécanisme en rapport avec leur implication dans la maladie de Hansen. Il s'agit :

- des phénomènes de tolérance,
 - des phénomènes de déviation immune,
 - des phénomènes de suppression,
 - des phénomènes de désensibilisation,
-
- et des traitements immunosuppresseurs et anti-inflammatoires.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1. CHOIX DES MALADES

Toutes les manipulations ont été faites sur le sang de dix sujets porteurs de forme LL polaire de maladie de Hansen traités par les sulfones depuis 1 à 4 ans (moyenne = 2,5 ans) et n'ayant jamais présenté de complications. Les témoins ont été choisis parmi dix sujets sains présentant une réaction de Mitsuda positive. (voir tableau n° 6 ci-dessous)

	SUJETS LEPROMATEUX POLAIRE	SUJETS SAINS
REACTION DE MITSUDA	-	+
D.N.C.B., D.N.F.B.	-	+
TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE AVEC L'ANTIGENE <u>M. leprae</u>	diminution de la prolifération	augmentation de la prolifération
TEST DU M.I.F. seuil de positivité \leq 0,75	$>$ 0,75	$<$ 0,50

Tableau n° 6

Critères de sélection des sujets

Les malades atteints de forme LI de maladie de Hansen, ont montré également, tant "in vivo" que "in vitro" une absence de réaction de type IV : le test de Mitsuda, qui consiste en l'injection d'antigène extrait de M. leprae de provenance humaine ou de tatou, ne provoque pas de réaction cutanée de type H.R. La méthode consiste à injecter, par voie intradermique, 100 µl de lépromine contenant 3×10^5 bacilles pour 100 µl. La réaction précoce (dite de Fernandez) est lue à la 48^e heure, et la réaction tardive (dite de Mitsuda) est lue au 21^e jour. La réaction précoce correspond, lorsqu'elle existe, du point de vue histologique, à une réaction inflammatoire de type banal. La réaction tardive de Mitsuda montre en revanche un infiltrat cellulaire typique d'immunité à médiation cellulaire.

Il est intéressant de compléter cet examen par des tests non spécifiques d'exploration de l'immunité à médiation cellulaire. Les substances les plus utilisées sont le Dinitrochlorobenzène (D.N.C.B.) et le Dinitrofluorobenzène (D.N.F.B.). Chez les sujets atteints de forme lépromateuse polaire choisis pour ce travail, les différents tests cutanés aux antigènes et aux D.N.C.B. et D.N.F.B. étaient négatifs, chez les sujets témoins, ces tests étaient positifs.

Nous avons également sélectionné nos malades en fonction des résultats de tests "in vitro" avec l'étude du M.I.F. : les cellules sanguines sont prélevées stérilement, par ponction veineuse, sur tubes héparinés et aussitôt diluées au demi dans une solution saline à 0,85 %. Le tube est mis à 37° C pendant une heure en

atmosphère humide (98 % d'humidité) dont le taux de CO₂ est ajusté à 5 % et, après sédimentation, on recueille stérilement la couche supérieure riche en polynucléaires et cellules mononuclées en évitant de ramener des globules rouges. Les éléments blancs sont alors lavés trois fois en H.B.S.S. et ajustés à 3×10^4 éléments par mm³ en milieu 199 contenant 10 % de sérum de poulain. Des tubes à hématocrite sont alors remplis, bouchés à une extrémité, centrifugés et mis en culture (après section à la lime du tube capillaire à la zone supérieure cellulaire) dans des planolets contenant 0,5 ml de milieu 199 gélosés à 0,5 % et additionné de 10 % de sérum de poulain plus le mitogène ou l'antigène (P.H.A. ou M. leprae) aux doses suivantes : P.H.A. 5ug par ml et M. leprae 10^5 bacilles par culture. Ces doses ont été déterminées comme donnant l'inhibition optimale chez des sujets sains à Mitsuda positif. L'incubation se fait à 37° C en atmosphère humide (98 % d'humidité) dont le taux de CO₂ est ajusté à 5 % pendant 20 heures.

Dans notre laboratoire, le seuil de positivité, déterminé par planimétrie, est de 0,75. On le calcule en divisant le diamètre de migration des cellules de la culture contenant l'antigène ou le mitogène par le diamètre de migration des cellules sans antigène ou mitogène. Chez les sujets atteints de forme lépromateuse polaire, ce seuil a toujours été ~~supérieur~~ ^{supérieur} à 0,750.

Nous avons étudié ensuite le test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) dont nous donnons ci-après la méthodologie complète, cette méthode ayant été utilisée tout au long de nos travaux. Pour la sélection des malades, le T.T.L. n'a jamais été

augmenté de façon significative autant avec le mitogène qu'avec les antigènes.

III.2. METHODOLOGIE DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE (T.T.L.)

III.2.1. Préparation des cellules monoclées

Nous avons pratiqué l' étude du T.T.L. de la façon suivante : le sang veineux est recueilli par ponction sur héparinate de lithium dans des tubes stériles, et aussitôt dilué au demi soit avec une solution de Hanks stérile (H.B.S.S.) (Gibco, Hounslow, G.B.) soit avec une solution salée stérile à 0,85 %.

Les cellules mononuclées sont alors isolées par centrifugation sur gradient Ficoll-Hypaque (lymphoprep) (Nyegaard, Oslo, Norvège) suivant la méthodologie de Böyum (BOYUM, 1968) (9) : 12 ml de sang dilué sont précautionneusement déposés, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, à la surface de 6 ml de lymphoprep et centrifugés pendant 40 minutes à 20° C à 400 X g (g mesuré à l'interface gradient - sang).

La couche riche en cellules mononuclées est recueillie à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, diluée avec 5 volumes de H.B.S.S. stérile (Gibco, Hounslow, G.B.), et centrifugée à 400 X g pendant 20 minutes à 20° C. Deux autres lavages sont ensuite effectués dans les mêmes conditions.

On pratique ensuite une numération cellulaire et un

test de viabilité par l'exclusion au bleu Trypan (Gibco, Hounslow, G.B.) à 0,4 % en solution saline à 0,85 % : 100 μ l de suspension cellulaire sont incubés au bain-marie à 37° C pendant 5 minutes avec 0,5 ml de solution de bleu Trypan. On compte alors, en cellules de Malassez, le nombre de cellules "prenant" le colorant et qui sont les cellules non-viables.

On pratique alors une numération des monocytes par la méthode des peroxydases : une goutte de suspension cellulaire est étalée sur une lame propre et dégraissée et, après séchage à l'air, fixée pendant une minute dans une solution contenant 10 ml de formol neutre à 37 % et 90 ml d'éthanol absolu. Après lavage de 30 secondes de la lame (les deux faces), celle-ci est plongée pendant 1 minute dans une solution de pH 6,00 \pm 0,05 contenant les réactifs suivants mis dans l'ordre :

- 100 ml d'éthanol à 30 %,
- 300 mg de benzidine dihydrochloride (Sigma, Saint Louis, Mo, U.S.A., cat. n° B 3383),
- 1 g d'acétate de sodium, 3 H₂O (Merck-France),
- 1,5 ml d'eau oxygénée à 3 volumes préparée extemporanément,
- et 200 mg de safranin O (R.A.L.-France).

Après lavage et séchage, le nombre de cellules peroxydase positive, c'est-à-dire de cellules contenant de discrets granules sombres dans leur cytoplasme, est compté au microscope au grossissement X 1 000 et exprimé en pourcentage par rapport à l'ensemble des cellules. Les cellules peroxydase positive (P +) sont considérées comme des monocytes, quoique cette activité peroxydasique ne soit pas un critère absolu de l'identification des monocytes (PREUD'HOMME et al., 1974) (62), la méthode de choix étant la réaction de l'activité estérasique non spécifique (SCHMALZL et al., 1968) (70). Cependant, la pratique de ces méthodes, par nous et d'autres (SHANNON et al., 1977) (72), n'a pas montré de différences significatives entre l'activité estérasique et l'activité peroxydasique, donc, pour des raisons de commodité technique, nous utilisons la méthode des peroxydases.

On ajuste ensuite le nombre de lymphocytes vivants pour obtenir 2×10^5 cellules par culture en milieu R.P.M.I. 1640 (Gibco, Hounslow, G.B.) contenant, par culture, 20 % de sérum de veau foetal (S.V.F.) (Gibco, Hounslow, G.B.) délipidé par centrifugation (400 X g pendant une heure), inactivé pendant 30 minutes à 56° C, adsorbé par contact pendant une heure à 4° C avec un même volume d'érythrocytes de mouton à 10 % d'hématocrite, puis pendant une heure à 37° C avec un nouveau volume d'érythrocytes de mouton à 10 % d'hématocrite et stérilisé par filtration sur millipore 0,22 μ . (Millipore, Paris, France)

III.2.2. Cultures et stimulation par le mitogène ou les antigènes

Les cultures se font sur micro-plaques (Falcon, Oxhard, U.S.A.), puis on ajoute soit le mitogène Con. A (E.Y. lab., Ca, U.S.A.) à la concentration de 3 µg par culture, soit 10⁷ M.leprae de tatou par culture, soit 25 µg d'antigène Dharmendra par culture, fraction purifiée de M. leprae de tatou, contenant 1,30 mg de protéines par ml (déterminée par la méthode de Lowry), ces doses de mitogène et d'antigènes ont été déterminées expérimentalement comme étant celles donnant, dans nos conditions expérimentales, la réponse optimale du T.T.L. avec des cellules de sujet sain présentant une réaction de Mitsuda positive.

Les techniques d'incubation sont les suivantes :

- 3 jours pour les cultures avec mitogène seul,
- 6 jours pour les cultures avec l'un ou l'autre des antigènes seul,
- 6 jours pour la technique des co-cultures dont les trois premiers jours avec l'un ou l'autre des antigènes puis, ajouté au troisième jour, le mitogène.

Chaque cupule contenant par ailleurs 50 U.I. de pénicilline par ml et 50 µg de streptomycine par ml. L'incubation se fait à 37° C, en atmosphère humide (98 % d'humidité) enrichie de 5 % de CO₂.

Le matin du 3^o ou 6^o jour, une micro curie de ³H thymidine (activité spécifique 1,9 C_p / mM) (C.E.A., Gif-sur-Yvette, France) est ajoutée et 6 heures après, les cultures sont recueillies sur filtre à l'aide d'un micro-mash (Dynatech, England) et chaque rondelle (découpée à l'emporte-pièce) mise dans un flacon à scintillation contenant 5 ml de bioscint (I.C.N., U.S.A.). L'incorporation de ³H thymidine est comptée à l'aide d'un compteur (Beckman, ou I.C.N.).

Les résultats sont exprimés en désintégration par minute (D.P.M.) après correction de Quenching à partir de courbes étalonnées faites avec des échantillons d'activité connue.

Les cultures se font toujours en quatre exemplaires minimum : trois pour la mesure de l'incorporation de ³H thymidine et une minimum pour le contrôle "de visu" du T.T.L. Nous avons parfois fait des cultures en nombre plus important en fonction des études que nous avons pratiqué par la suite.

III.3. ETUDE DES POPULATIONS T PRESENTANT UN RECEPTEUR POUR LES Ig M (T_μ) OU LES Ig G (T_γ)

Si nous reprenons les T.T.L. des malades atteints de forme lépromateuse polaire, nous pouvons énumérer, grâce à leur récepteur spécifique, les T lymphocytes présentant un récepteur pour les Ig M, les T lymphocytes présentant un récepteur pour les Ig G (T_μ et T_γ) et les T lymphocytes (MOMETTA et al., 1977) (53). (voir figure n^o5 page 62).

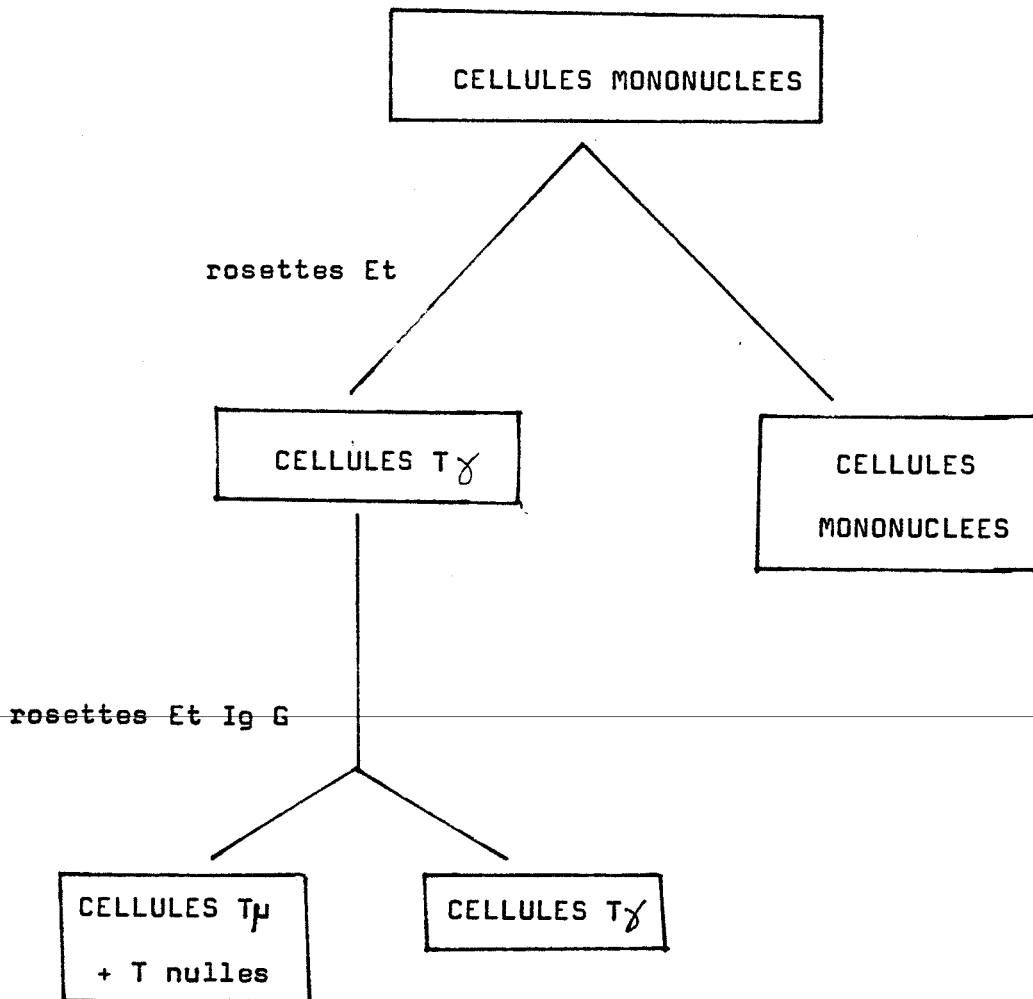


Schéma de l'isolation des cellules T suppressives

Figure n° 5



III.3.1. Principe

Les cellules T possèdent la propriété de former des rosettes avec les érythrocytes de mouton et, dans les populations T, les cellules T γ possèdent un récepteur pour le fragment Fc des Ig G. En utilisant ces propriétés, nous allons donc procéder à un appauvrissement en cellules T γ en deux temps : premièrement, appauvrissement en cellules T et deuxièmement appauvrissement en cellules T γ . Cet appauvrissement doit être fait dans cet ordre : en effet, d'autres cellules que les cellules T expriment un récepteur pour la fraction Fc des Ig G, en particulier les cellules K. Pour l'appauvrissement en cellules T, nous utilisons la technique des rosettes décrite ci-dessous.

III.3.2. Réactifs et matériel

III.3.2.1. Erythrocytes de mouton trypsines

La trypsination des érythrocytes de mouton supprime leur récepteur pour les lymphocytes T tout en gardant intact les sites antigéniques nécessaires pour réagir avec les anticorps (WEINER et al., 1973) (83). Cette trypsination évite la contamination par les cellules T μ lors de l'appauvrissement en cellules T γ et la contamination des cellules T lors de la numération des cellules B. Les érythrocytes de mouton, recueillies en tube stérile sur bille de verre, sont lavées trois fois en eau physiologique stérile à 0,85 %. On prépare les hématies en procédant à une défibrination par agitation. Après chaque lavage on procède

à une centrifugation à 300 X g. L'hématocrite (Ht) est ajusté à 5 %. On ajoute une solution de trypsine (Sigma, Saint Louis, Mo, U.S.A., cat. n° 8128) à 0,2 % dans du R.P.M.I. 1640 préalablement refroidi à volumes égaux avec les érythrocytes de mouton à 5 % d'Ht. On incube 60 minutes au bain-marie à 37° C. On ajoute alors 1 ml d'une solution inhibitrice de trypsine (Sigma, Saint Louis, Mo, U.S.A., cat. n° T 9128) à 10 mg/ml dans du R.P.M.I. 1640. Après mélange, on centrifuge à 300 X g, on élimine le surnageant et on procède à 3 lavages en R.P.M.I. 1640 refroidi avec centrifugation à 300 X g entre chaque lavage. On ajuste alors l'hématocrite à 5 % avec du R.P.M.I. 1640 et on étiquette ces érythrocytes Et.

III.3.2.2. Erythrocytes de mouton couplés avec Ig G 7S

Le couplage des érythrocytes de mouton avec les Ig G 7S anti-érythrocytes de mouton se fait de la façon suivante :

On détermine, par la méthode de Lowry, la concentration en protides d'Ig G 7S de lapin hautement purifiées (Cappel lab., Pa, U.S.A.) anti-érythrocytes de mouton et on ajuste cette concentration à 0,04 - 0,06 mg / 5 ml. Cette dose de protéines est la dose optimale qui, dans nos conditions expérimentales, induit le pourcentage maximum de rosettes. On mélange alors à volume égal Et à 5 % d'Ht et Ig G 7S anti-érythrocytes de mouton de façon à avoir une concentration finale de 0,02 - 0,03 mg d'Ig G 7S pour 5 ml de Et dont l'hématocrite est de 2,5 %. On incube 45 minutes au bain-marie à 37° C sous agitation constante puis, on centrifuge

300 X g et on procède à 3 lavages avec du R.P.M.I. 1640 refroidi en pratiquant une centrifugation à 300 X g entre chaque lavage. Après le dernier lavage, on fait une dernière centrifugation à 1 000 X g et on remet en suspension le culot dans le même volume qu'au départ de R.P.M.I. 1640 additionné de 20 % de S.V.F. délipidé, adsorbé et décomplémenté, on étiquette Et A (Ig G). La conservation est d'environ trois jours à + 4° C.

Remarque : la solution d'Ig G doit être ajoutée goutte à goutte sous agitation constante et énergique (Vortex).

III.3.2.3. Réactifs divers

- Erythrocytes de mouton lavés trois fois en eau physiologique stérile à 0,85 % puis ajustés à 5 % d'hématocrite avec du R.P.M.I. 1640.

- Tampon ammonium : le tampon ammonium, destiné à la lyse des érythrocytes est préparé en mélangeant 8,29 g de $\text{NH}_4 \text{Cl}$, 1 g de KH CO_3 , 0,372 g de EDTA dans un volume de 1 000 ml d' $\text{H}_2 \text{O}$. Le pH final est de $7,4 \pm 0,05$. On stérilisé ensuite par filtration sur millipore 0,22 μ .

- Sérum de veau foetal (S.V.F.) délipidé, adsorbé et inactivé par la chaleur.

- Solution de bleu Trypan à 0,4 %.

- Réactifs pour la révélation des peroxydases.

III.3.3. Méthodologie

III.3.3.1. Isolément des lymphocytes T

Le sang est recueilli stérilement sur tube hépariné et l'isolement des éléments mononuclés sur gradient de lymphoprep est faite comme décrit précédemment (III.2.). On fait la numération en cellules de Malassez et la formule après coloration de May-Grunwald Giemsa. On détermine la viabilité par le test d'exclusion au bleu Trypan, et on compte le pourcentage de monocytes par la méthode des peroxydases déjà décrite. On ajuste à 4×10^6 lymphocytes viables par ml dans du R.P.M.I. 1640 additionné de 20 % de S.V.F.

Ensuite, on procède à l'isolement des cellules T par la méthode des rosettes. On ajoute à volumes égaux des érythrocytes de mouton (lavés trois fois avec du H.B.S.S. et dont l'hématocrite est ajusté à 5 %) et la suspension cellulaire, puis après centrifugation à 200 X g pendant 10 minutes, on incube au bain-marie à 37° C pendant 30 minutes et on met le tube à + 4° C pendant 60 minutes. Une nouvelle incubation de 10 minutes à la température du laboratoire est alors faite. On remet précautionneusement le culot en suspension et on pratique une numération des rosettes en cellules de Malassez. On dépose le plus doucement possible une goutte de cette suspension sur une lame dégraissée et on laisse sécher à l'air libre pour faire la révélation des peroxydases par

la méthode décrite précédemment. Le nombre de cellules peroxydase positive (P+), peroxydase négative (P-), peroxydase positive ayant formé des rosettes de 4 érythrocytes minimum (P + R) et des cellules peroxydase négative ayant formé des rosettes (P - R) est alors compté. Cette énumération se fait sur 300 cellules minimum.

Le pourcentage de cellules T par rapport aux autres cellules lymphoïdes sera :

$$\% T = 100 \times \frac{(P - R)}{(P - R) + P-}$$

Remarque : Deux autres méthodes pour les rosettes T ont été utilisées. Elles consistaient à traiter les érythrocytes de mouton avec une solution d' amino-2-éthylthiourinium-bromure-bromhydrate (A.E.T.) ou avec une solution de neuramidase, mais, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas noté de différences significatives dans la participation des cellules peroxydase positive dans les rosettes. Ce pourcentage est toujours resté inférieur à 0,5 % et, pour des questions de commodité technique, nous avons utilisé la méthode utilisant simplement des érythrocytes de mouton.

III.3.3.2. Isolément des cellules T présentant un récepteur pour le Fc des Ig G (T_γ)

L'isolement des cellules T_γ se fait de la manière suivante : on met sur gradient de lymphoprep la suspension contenant

les cellules ayant fait des rosettes avec E et on centrifuge à 400 X g pendant 40 minutes à 20° C (à l'interface) puis, on recueille la fraction au fond du tube à centrifuger (fraction T) et la fraction faisant couche dans le gradient (cellules non T). On refait, sur la fraction du fond du tube, un nouveau passage sur gradient de lymphoprep dans les mêmes conditions que ci-dessus. On mélange ensuite les deux fractions T et les deux fractions non T, on lave trois fois dans du R.P.M.I. 1640 ou du H.B.S.S. Avec la fraction ayant formé des rosettes (fraction T) on centrifuge à 200 X g pendant 5 minutes, puis on remet en suspension dans 10 à 20 ml de tampon ammonium refroidi à + 4° C pour lyser les érythrocytes de mouton. Cette lyse d'effectue en faisant une première incubation de 60 minutes à + 4° C après avoir centrifuger à 200 X g pendant 5 minutes (lyse effectuée sur le culot cellulaire) puis, on remplace le tampon par 5 ml de tampon ammonim refroidi à + 4° C. On refait une incubation pendant 5 minutes à la température du laboratoire après avoir remis précautionneusement le culot en suspension.

On fait les tests de viabilité, la numération en cellules de Malassez et le test des peroxydases. On ajuste alors à 1×10^6 lymphocytes vivants par ml dans du R.P.M.I. 1640 additionné de 20 % de S.V.F. et on ajoute à volume égal Et A (Ig G). Après 15 minutes d'incubation à la température du laboratoire, on centrifuge à 200 X g pendant 5 minutes avant de procéder à une ré-incubation (en culot) pendant 5 minutes à la température du laboratoire. On remet en suspension le plus doucement possible et, on dépose précautionneusement l'ensemble des cellules sur un gradient

de lymphoprep que l'on centrifuge à 400 X g pendant 40 minutes à 20° C. Les cellules formant rosettes se trouvent au fond du tube et sont recueillies.

Les cellules formant couche dans le gradient sont des cellules T dont les rosettes ont été lysées par le tampon ammonium, et qui n'expriment pas de récepteur pour le fragment Fc des Ig G. On refait alors un gradient avec les cellules ayant formé des rosettes que l'on centrifuge comme indiqué ci-dessus, puis on réunit les cellules mononuclées n'ayant pas fait de rosettes et les cellules ayant formé des rosettes. Avec la fraction rosette, on fait une numération, un test de viabilité et la réaction des peroxydases. Le pourcentage de $T\gamma$ par rapport aux cellules T est alors calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de } T\gamma = 100 \times \frac{(P - R)}{(P - R) + P-}$$

Le pourcentage des cellules $T\mu$ se détermine en soustrayant du pourcentage de T le pourcentage de $T\gamma$.

$$\% \text{ de } T\mu = \% \text{ de } T - \% \text{ de } T\gamma$$

Remarque : Pour arriver à un appauvrissement maximum, il est nécessaire de répéter une seconde fois l'isolement des cellules T et l'isolement des cellules $T\gamma$ sur les cellules qui n'ont pas fait de rosettes. Pour la réussite de ces techniques, la vitesse d'exécution est indispensable, en effet, la perte cellulaire sera d'autant plus minime que le délai d'exécution sera

plus bref.

On mélange ensuite les fractions cellules non T et les fractions cellules appauvries en cellules T γ (fraction T μ helper) puis on met en culture dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe précédent (III.2.).

Remarque : Par cette technique, la fraction T μ est en fait un mélange de cellules T μ et T nulles (les cellules T nulles étant des cellules formant des rosettes E mais n'ayant pas de récepteur pour les Fc des Ig G ou des Ig M).

III.4. METHODOLOGIE UTILISEE POUR L'APPAUVRISSEMENT EN MACROPHAGES

III.4.1. Principe

Les macrophages actifs ont la propriété d'adhérer sur boîte de Pétri en plastique ou en verre. Cet appauvrissement se fait en deux temps : en effet, un simple appauvrissement en deux heures est insuffisant et, des macrophages actifs n'adhèrent pas à la boîte de Pétri. Un deuxième appauvrissement est donc nécessaire pour les supprimer efficacement. Le problème de cette manipulation est de ne pas activer accidentellement tous les macrophages de façon à pouvoir garder, pour les cultures ultérieures, un pourcentage de cellules de 3 à 5 % car, en dessous de 3 %, le test de transformation lymphoblastique ne peut avoir lieu. Les manipulations se font en l'absence d'antibiotique avec une concentration minimum de 20 % de S.V.F. pour éviter cette activation accidentelle. La

vitesse d'exécution de la manipulation est très importante et les résultats seront d'autant meilleurs que le délai d'exécution sera bref. (voir figure n° 6 ci-dessous)

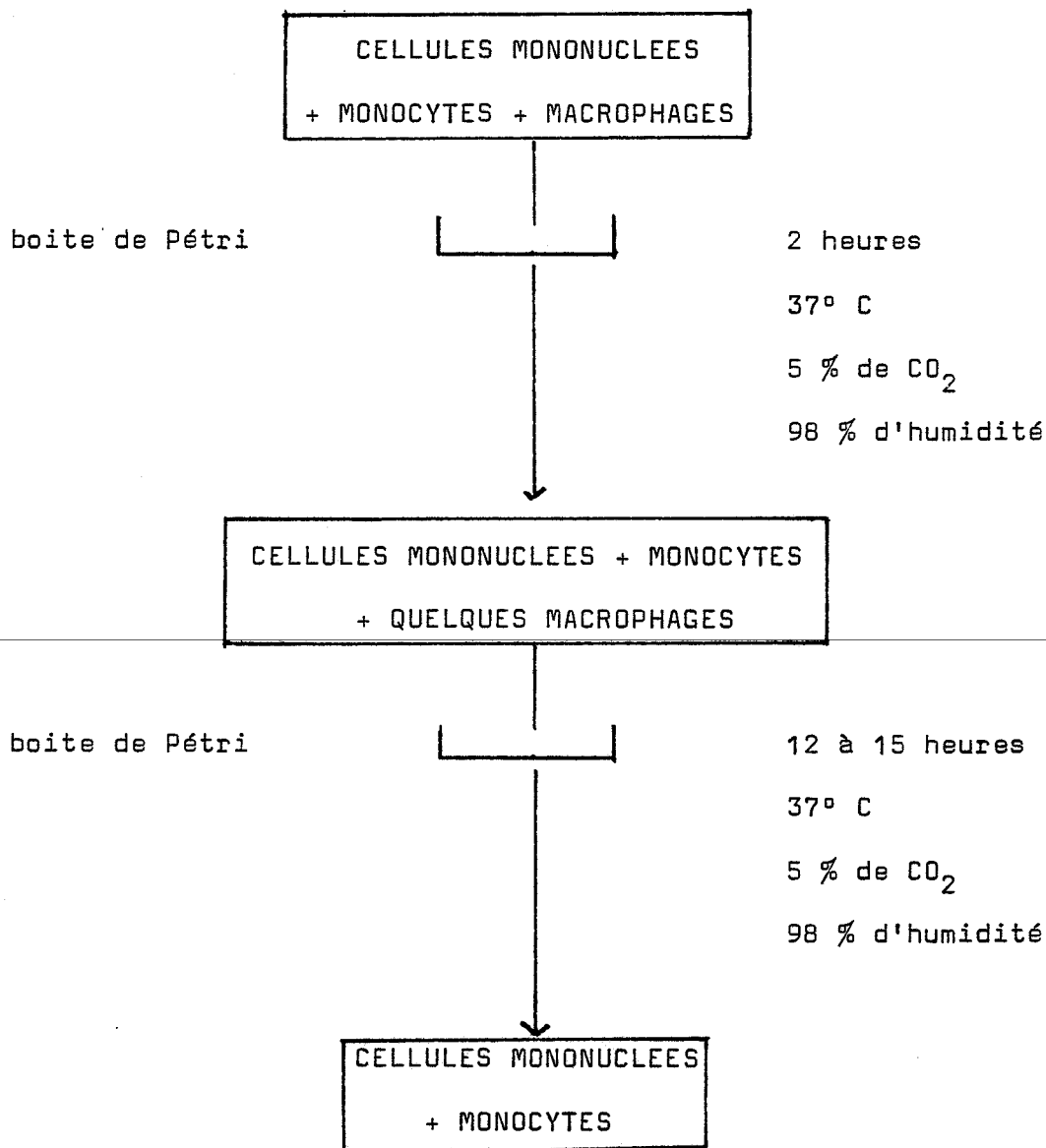


Figure n° 6

Isolation des macrophages

III.4.2. Méthodologie

L'isolement des cellules mononuclées se fait comme décrit ci-dessus. On fait la numération, la formule, le test des peroxydases et la viabilité.

On ajuste la suspension cellulaire à 2×10^5 lymphocytes vivants par ml dans du R.P.M.I. 1640 additionné de 20 % de S.V.F. et les cellules sont mises en boîte de Pétri stériles (Falcon, Oxhard, Ca, U.S.A.) pendant 2 heures à 37° C avec 5 % de CO₂ et 98 % d'humidité. On recueille ensuite les cellules non-adhérentes par lavage avec du R.P.M.I. 1640 porté préalablement à 37° C et contenant 20 % de S.V.F. et on ajuste leur concentration à 2×10^5 cellules par ml. Une nouvelle incubation est alors faite pendant 12 à 15 heures dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. On recueille les cellules non-adhérentes avec du R.P.M.I. 1640 contenant 20 % de S.V.F. porté à 37° C. Après lavage, on vérifie que le nombre de cellules monocytaires soit supérieur à 3 %. On fait alors les cultures pour le T.T.L. dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (III.2.).

Les cellules ayant adhéré aux boîtes de Pétri sont à 98,2 % \pm 0,6 % des cellules peroxydase positive. Dans nos conditions expérimentales, nous estimons que le pourcentage de cellules non monocytaires ayant adhéré est négligeable.

III.5. METHODOLOGIE POUR L'ETUDE ET L'IDENTIFICATION DES CELLULES B

La numération des B lymphocytes se fait par la méthode du récepteur C₃ d des Ig M de SHANNON et HASTINGS (1977) (72).

0,5 ml d'érythrocytes de mouton trypsinés (Et) à 2,5 % d'Ht en R.P.M.I. 1640 sont incubés avec 0,5 ml d'Ig M de lapin anti-érythrocyte de mouton (Cappel lab., Pa, U.S.A.). La concentration de protides (méthode de Lowry) de la solution mère d'Ig M est de 1,5 mg de protéines par ml. Cette solution est diluée au 1/75 avant l'emploi. Cette dose est déterminée de façon expérimentale comme étant celle qui donne le pourcentage maximum de rosettes. L'incubation se fait au bain-marie à 37° C pendant 30 minutes puis, après lavage en R.P.M.I. 1640, on remet les érythrocytes de mouton sensibilisés en suspension dans 1 ml de R.P.M.I. 1640 et ajoute alors 50 ul de sérum de souris déficient en C₅ (Jackson lab., Me, U.S.A.) adsorbé préalablement avec des érythrocytes de mouton à 10 % d'Ht pendant 1 heure à + 4° C et ensuite 1 heure à 37° C. On étiquette Et A (Ig M) C₅ def. On garde cette préparation à + 4° C (conservation 24 heures).

Les rosettes se font en incubant 100 µl de cellules contenant 2 X 10⁶ lymphocytes viables dans du R.P.M.I. 1640 et 100 µl d'Et A (Ig M) C₅ def au bain-marie à 37° C et, après centrifugation à 200 X g pendant 5 minutes, on remplacera 100 µl de surnageant par 50 µl de sérum AB adsorbé (Gibco, Hounslow, G.B.). Le nombre de cellules ayant formé des rosettes est compté après révélation de l'activité peroxydasique.

On fait un témoin avec des érythrocytes de mouton trysinés (Et) auxquels on ajoute seulement les sérums de souris déficient en C₅ (Et C₅ def) dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, les 0,5 ml d'Ig M étant remplacés par 0,5 ml de R.P.M.I. 1640.

Le pourcentage des cellules B par rapport aux autres lymphocytes est alors calculé de la manière suivante :

$$\% B = 100 \times \frac{(P - R) A}{(P - R) A + (P -)} - \frac{(P - R) B}{(P - R) B + (P -)}$$

A = tube contenant Et A (Ig M) C₅ def

B = tube contenant Et C₅ def

III.6. MISE EN EVIDENCE D'UNE AUTRE POPULATION CELLULAIRE

Lorsque nous énumérons les populations T, B et les macrophages, il reste un certain nombre de cellules qui ne présentent pas les caractéristiques de ces éléments. Ces "autres cellules" sont énumérées de la manière suivante :

$$\text{"autres cellules"} = 100 \% - (\% \text{ de } M\phi + \% \text{ de } T\mu + \% \text{ de } T\gamma + \% \text{ de } B)$$

III.6.1. Etude morphologique

L'étude de la morphologie est faite au microscope au grossissement X 1 000 (Leitz, Wetzlar, Germany).

III.6.2. Identification par l'étude des récepteurs des cellules B et des propriétés des macrophages

Cette technique se fait à l'aide d'immunoglobuline fragment anti F (ab)'₂ d'Ig G humaine et de particules de latex (SHANNON et al., 1977) (72). Après trois lavages, les "autres cellules" restantes sont ajustées à 10⁶ cellules vivantes pour 2 ml d'H.B.S.S. contenant 20 % de S.V.F., et sont incubées pendant 45 minutes au bain-marie à 37° C avec 5 µl de solution à 2 X 10⁹ particules de latex par ml (Sigma, Mo, U.S.A.) et après centrifugation à 300 X g pendant 5 minutes, on procède à une ré-incubation, sans remettre le culot en suspension, pendant 15 minutes au bain-marie à 37° C. On pratique alors 3 lavages avec du H.B.S.S. additionné de 5 % de S.V.F. et on remet en suspension dans 2 ml de H.B.S.S. et 5 % de S.V.F. On incube alors 100 µl de suspension cellulaire ainsi traitée pendant 30 minutes à 37° C avec 50 µl de sérum anti F (ab)'₂ d'Ig G fluorescent (Institut Behring, Paris, France), puis on centrifuge à 100 X g pendant 5 minutes. Après 3 lavages avec du H.B.S.S. additionné de 5 % de S.V.F., on remet en suspension dans 50 µl de H.B.S.S. contenant 5 % de S.V.F. et on fait un étalement sur lame pour IF (Bio-Mérieux, Marcy l'étoile, France). Le montage s'effectue à la glycérine tamponée et seules les cellules ne phagocytant pas les particules de latex ou n'ayant pas de particules de latex à leur surface et étant fluorescentes ont été reconnues comme lymphocytes B ; les cellules phagocytaires contenant des particules de latex intracytoplasmiques ou fixées à leur surface étant considérées comme macrophages.

Nous avons également pratiqué un test des peroxydases comme décrit au chapitre III, paragraphe III.2.1. Pour éviter des erreurs de technique liées à une "saturation" des récepteurs des cellules B, la technique de fluorescence et d'ingestion des particules de latex a été refaite après trypsination des "autres cellules" (mêmes réactifs, même technique et même dose que pour la trypsination des érythrocytes de mouton, mais le nombre de cellules est de 10^5 cellules par ml).

(Voir figure n°7 page 77)

III.6.3. Identification par l'étude des récepteurs des lymphocytes

T et T γ

- Pour les lymphocytes T, par la méthode des rosettes E décrite chapitre III, paragraphe III.3.3.1.

- Pour les lymphocytes T γ , par la méthode des rosettes Et A Ig G (7S) décrite chapitre III, paragraphe III.3.3.2. que nous avons fait directement sur la population "d'autres cellules".

(Voir figure n° 7 page 77)

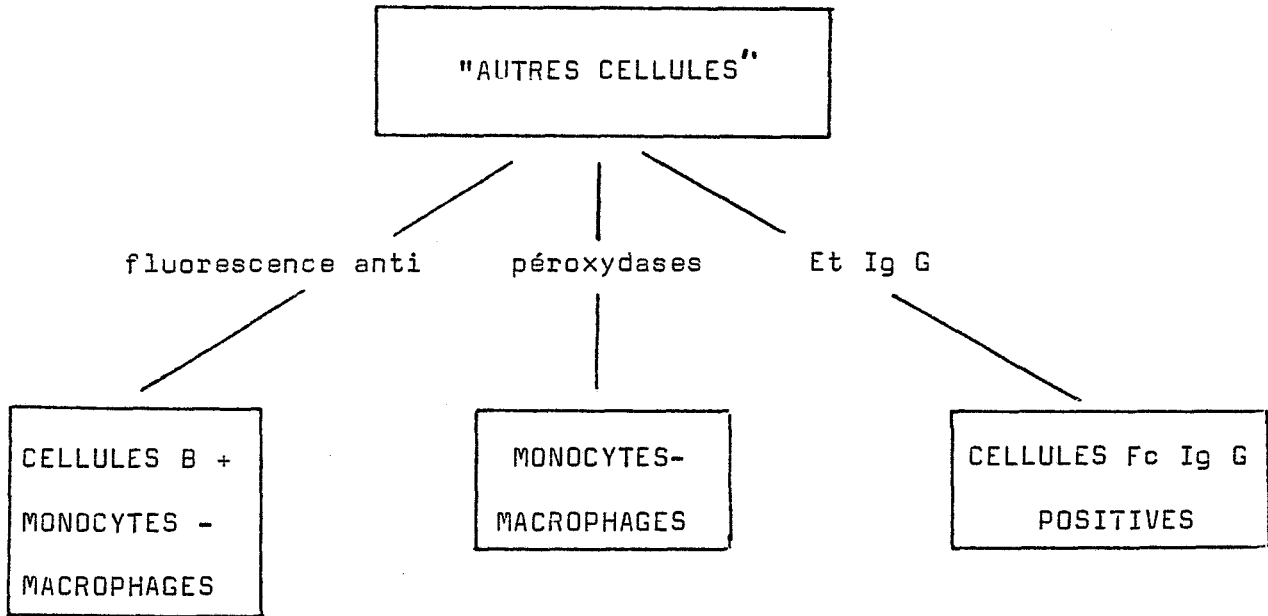


Figure n° 7

Schéma de l'identification des populations des "autres cellules"



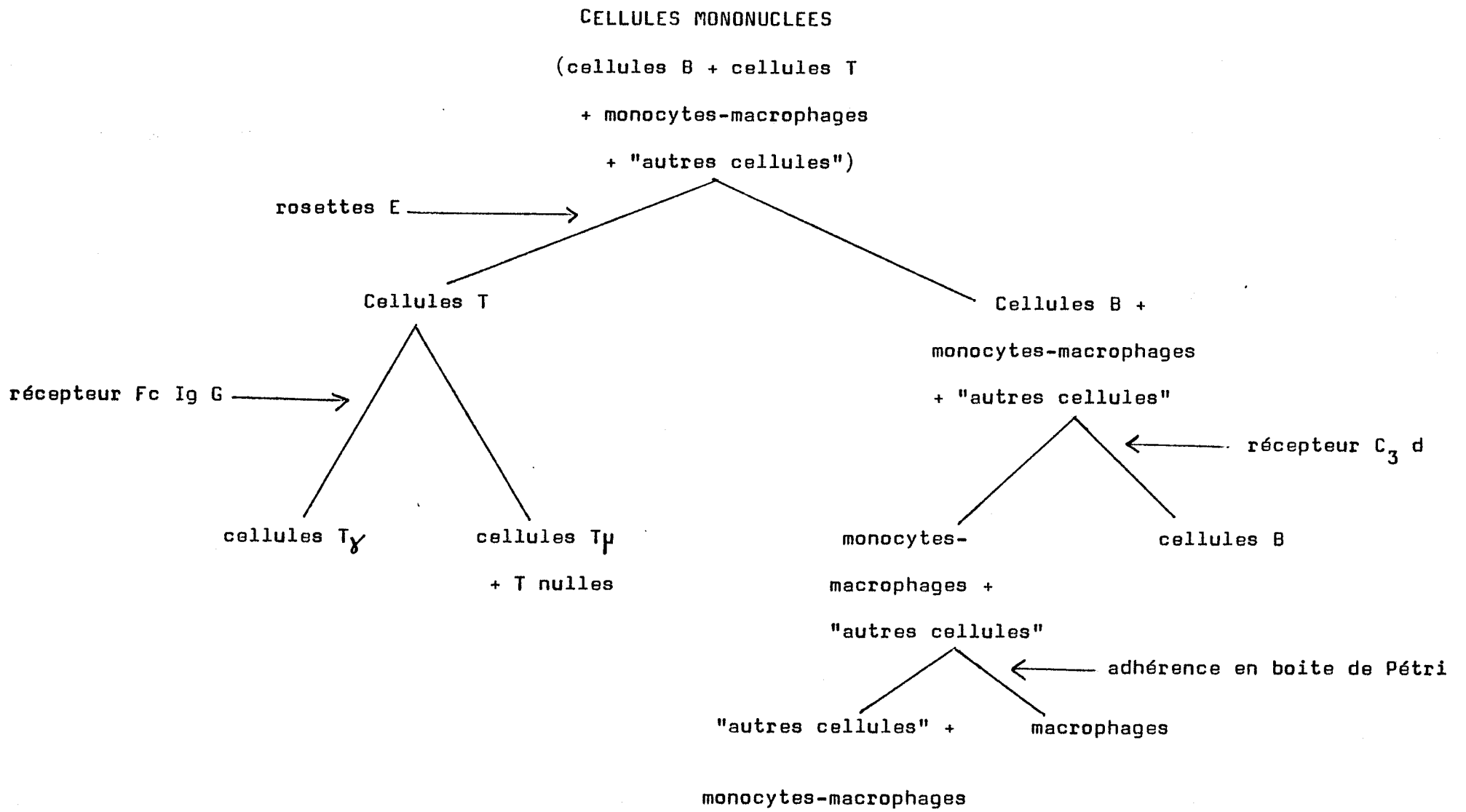


Figure n° 8

Schéma récapitulatif des techniques utilisées



CHAPITRE IV : RESULTATS

IV.1. RESULTATS AVANT L'APPAUVRISSEMENT EN CELLULES T PRESENTANT
UN RECEPTEUR Fc Ig G

Dans le tableau n° 7 page 80, nous notons une prolifération significative lorsque les cellules non appauvries en T sont stimulées par le mitogène.

Il faut noter que les cellules soumises à la stimulation d'un des antigènes montrent une diminution significative de la réponse proliférative par rapport aux cellules soumises à la stimulation du mitogène seul.

	DPM \pm SD	p
cultures non appauvries contrôle	860 \pm 95	-
cultures non appauvries + Con. A	14385 \pm 3840	<p>< 0,005</p> <p>< 0,02</p>
cultures non appauvries + Con. A + Dharmendra	8840 \pm 2520	
cultures non appauvries + Con. A + <u>M. leprae</u>	9312 \pm 2940	

Tableau n° 7

Résultats du test de transformation lymphoblastique pratiqué chez les sujets lépromateux polaire avec l'ensemble des cellules mononuclées

Toutes les co-cultures sont faites en 6 jours, avec un nombre de malades N = 10.

Les résultats sont exprimés en désintégration par minute plus ou moins la déviation standard (DPM \pm SD).

Les écarts p sont considérés significatifs si p < 0,05 (Test de Student).



IV.2. CONSEQUENCES DE L'APPAUVRISSMENT EN T γ SUR LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Le tableau n° 8 page 82 indique une prolifération significative lorsque les cellules appauvries en T γ sont stimulées soit par la Con. A + M. leprae ou son antigène purifié Dharmendra soit par la Con. A.

Contrairement au tableau n° 7 page 80, où la prolifération est significativement diminuée avec le mélange Con. A et l'un ou l'autre des antigènes, la prolifération est significativement élevée lorsque les cellules sont stimulées avec le mélange antigène mitogène par rapport à la stimulation par le mitogène seul.

	DPM \pm SD	p
cultures appauvries en T γ contrôle	1020 \pm 102	-
cultures appauvries en T γ + Con. A	21620 \pm 2640	
cultures appauvries en T γ + Con. A + Dharmendra	29021 \pm 2112	
cultures appauvries en T γ + Con. A + <u>M. leprae</u>	28980 \pm 2124	

Tableau n° 8

Résultats du test de transformation lymphoblastique pratiqué chez les
sujets lépromateux polaire avec l'ensemble des
cellules mononuclées appauvries en cellules T γ

Toutes les co-cultures sont faites en 6 jours, avec un nombre de malades N = 10.

Les résultats sont exprimés en désintégration par minute plus ou moins la déviation standard (DPM \pm SD).

Les écarts p sont considérés significatifs si p < 0,05 (test de Student).



IV.3. CONSEQUENCES DE L'APPAUVRISSMENT EN MACROPHAGES ACTIFS SUR LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Nous notons sur le tableau n° 9 page 84, une prolifération lorsque, après appauvrissement en macrophages actifs, les cellules sont stimulées par la Con. A ou par la Con. A + les Ag. ~~antigènes~~. Là aussi, et contrairement au tableau n° 7 page 80, où la prolifération est significativement diminuée avec le mélange Con. A et l'un ou l'autre des antigènes, la prolifération est significativement plus élevée avec le mélange Con. A et l'un ou l'autre des antigènes.

Le nombre de D.P.M. est moins élevé lorsque l'on appauvrit les cultures en macrophages actifs car, leur pourcentage influe considérablement sur la prolifération lymphoïde (NELSON, 1978) (58), (WING et al., 1978) (84).

	DPM \pm SD	p
cultures appauvries en macrophages, contrôle	680 \pm 130	-
cultures appauvries en macrophages + Con. A	3912 \pm 920	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $< 0,005$ </div> $< 0,005$
cultures appauvries en macrophages + Con. A + Dharmendra	7712 \pm 1286	
cultures appauvries en macrophages + Con. A + <u>M. leprae</u>	6620 \pm 1140	

Tableau n° 9

Résultats du test de transformation lymphoblastique pratiqué chez les sujets lépromateux polaire avec l'ensemble des cellules mononuclées appauvries en macrophages actifs

Toutes les co-cultures sont faites en 6 jours, avec un nombre de malades N = 10.

Les résultats sont exprimés en désintégration par minute plus ou moins déviation standard (DPM \pm SD).

Les écarts p sont significatifs si p < 0,05 (test de Student).



IV.4. VARIATION DES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES APRES
APPAUVRISEMENT EN MACROPHAGES OU EN T γ

Sur le tableau n° 10 page 86, nous avons indiqué les pourcentages des différents types cellulaires que nous avons identifié : T μ + T nulles, T γ , B, macrophages et "autres cellules".

Nous observons, après appauvrissement en T γ ou en macrophage, une augmentation significative du pourcentage de ces "autres cellules". Notons cependant que cette augmentation est beaucoup plus significative ($p < 0,005$) lorsque l'on appauvrit la culture en macrophage que lorsque l'on appauvrit la culture en T γ ($p < 0,01$).

Nous observons également, après appauvrissement en macrophage, une augmentation non significative ($p < 0,5$) du pourcentage des cellules T γ après culture alors qu'après appauvrissement en T γ , le pourcentage passe de 0,01 % avant culture à $15,1 \pm 2,3$ % après culture, soit une augmentation très significative ($p < 0,005$). Ce qui indique une reconstitution rapide de la population T γ après appauvrissement, que nous n'observons pas lors de l'appauvrissement en macrophage.

CELLULES MONONUCLEES	CELLULES B	CELLULES T μ T nulles	CELLULES T γ	MONOCYTES- MACROPHAGES	"AUTRES CELLULES"	p
avant appauvrissement et avant culture	39,7 \pm 8,3%	8,3 \pm 3,1%	31,2 \pm 8,1%	24,5 \pm 5,8%	1,1 \pm 1 %	
après appauvrissement en T γ et avant culture	47,4 \pm 9,1%	12,4 \pm 4,7%	0,01 %	27,3 \pm 6,2%	1,8 \pm 1,4%	< 0,10
après appauvrissement en T γ et après culture	52,1 \pm 12,4%	14,6 \pm 8,5%	15,1 \pm 2,3%	26,7 \pm 7,2%	3,8 \pm 2,8%	
après appauvrissement en M ϕ et avant culture	46 \pm 6,1%	15,2 \pm 5,4%	35,7 \pm 6,8%	4,1 \pm 1,2%	1,4 \pm 1,2%	< 0,005
après appauvrissement en M ϕ et après culture	48,1 \pm 9,1%	18,4 \pm 6,1%	39,9 \pm 7,1%	3,9 \pm 2,1%	8,6 \pm 3,4%	

Tableau n° 10
Pourcentage des différents types cellulaires avant et après culture
suivant l'appauvrissement en cellules T γ ou M ϕ

Le nombre de malades est N = 10

Les pourcentages sont exprimés en moyenne plus ou moins déviation standard

p est significatif si p < 0,05



IV.5. IDENTIFICATION DE LA POPULATION "D'AUTRES CELLULES"

Lorsque nous avons pratiqué l'identification de ces cellules avant et après culture, par la coloration des peroxydases ou par l'ingestion des particules de latex, nous avons noté que 3,8 % à 5,4 % (moyenne = 5,1 %) de cellules présentent les caractéristiques de monocytes macrophages.

Par contre, l'étude en fluorescence n'a pas révélé de cellules de type B, et l'étude des rosettes n'a pas révélé de cellules de type T. La coloration de May-Grunwald Giemsa montre une majorité de cellules (92 %) d'aspect lymphoïde, 3 à 5 % de cellules d'aspect monocytoïde et 3 à 5 % d'éléments non identifiés. La technique révélant un récepteur Fc pour les Ig G (chapitre III, paragraphe III.3.3.2.) a montré un pourcentage élevé de cellules formant des rosettes Et Ig G (55,3 %) avant culture. Ces cellules ne montraient pas par ailleurs, une réaction positive avec le test des peroxydases.

Lorsque ces différents tests d'identification ont été faits après culture, les différents pourcentages ont varié comme indiqué sur le tableau n° 11 page 89. On note une augmentation significative du pourcentage des cellules exprimant un récepteur pour le Fc des Ig G. La prolifération des "autres cellules" est donc significativement augmenté (voir chapitre IV, paragraphe IV.3.) et, le pourcentage de cellules exprimant un récepteur pour le Fc des Ig G l'est également.

Il existe un certain nombre de cellules exprimant un récepteur pour le Fc des Ig G : cellules T présentant une faible avidité pour les érythrocytes de mouton, cellules nulles et cellules Killer (CORDIER et al., 1976) (13) , (HORWITZ et al., 1977) (34 bis) (KAPLAN et al., 1978) (38 bis), (PERLMANN et al., 1975) (61 bis) et (SHAW et al., 1979) (72 bis) la preuve de la nature K d'une cellule repose cependant sur la mise en évidence des phénomènes d'A.D.C.C. qu'elle induit.

Dans ce travail, faute de matériel et de réactifs, nous n'avons pu étudier les phénomènes d'A.D.C.C.

Nous discuterons au chapitre V de l'éventuelle appartenance des cellules présentant un récepteur pour le Fc des Ig G présentes dans "l'autre population" aux cellules K.



	CELLULES B	CELLULES T	MONOCYTES- MACROPHAGES	"AUTRES CELLULES" :NON IDENTIFIÉS	CELLULES Fc Ig G POSITIVES	P
avant appauvrissement en T _H ou macrophage et avant culture	< 0,1 %	< 0,1 %	5,1 ± 1,2 %	42 ± 4,3%	55,3 ± 6 %	
après appauvrissement en T _H , après culture	idem	idem	3,8 ± 1,4 %	27,4 ± 5,1%	60,2 ± 4,2 %	< 0,10
après appauvrissement en macrophages, après culture	idem	idem	3,7 ± 1,6 %	17,2 ± 4,3%	72,1 ± 6 %	< 0,005

Tableau n° 11

Pourcentage des différentes cellules composant la population "d'autres cellules"

Les résultats sont exprimés en pourcentage plus ou moins déviation standard, avec un nombre de sujets lépromateux polaire N = 10.

Les écarts p sont considérés significatifs si p < 0,05 (test de Student)

CHAPITRE V : DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent deux choses :

- un effet suppresseur lié aux macrophages,
- un effet suppresseur lié à la fraction T γ .

FELDMANN et al. (1979) (22) (1979) (23), TADA et al. (1976) (80), BONA et al. (1979) (18) et récemment LIEW et al. (1980) (48 bis) ont expliqués les mécanismes de suppression de l'H.R. L'effet suppresseur lié aux cellules T nous paraît superposable à ces mécanismes :

- à un premier niveau de réponse, les antigènes de M. leprae sont présentés aux cellules B et aux macrophages mais en l'absence de cellules T (voir chapitre I, paragraphe I.4.).

- En l'absence de cellules T, nous pensons que le macrophage n'est pas correctement "armé" pour détruire M. leprae. Il joue cependant son rôle de cellule phagocytaire, et détruit néanmoins une petite partie des bacilles M. leprae : des coupes pratiquées au niveau de lésions lépromateuses chez des malades non traités montre, à l'intérieur des cellules phagocytaires, un grand nombre de bacille dont certains sont en voie de destruction (aspect granuleux) ou détruits (aspect en poussière). Le macrophage va ensuite présenter aux cellules B des molécules antigéniques

"simplifiées" et, en l'absence de cellules T, les cellules B ne pourront reconnaître que des molécules de structure thymo-indépendante. Il y aura donc sécrétion d'anticorps spécifiques de ces fractions, anticorps non spécifiques de M. leprae intact, en particulier des antigènes de surface (RIDLEY, 1973) (68) mais simplement de quelques constituants antigéniques.

- La synthèse de ces anticorps, les doses d'antigène introduites et la vitesse de dégradation des antigènes par le macrophage vont entraîner la prolifération d'une population T suppressive avec différentes sous populations spécifiques ou non des anticorps synthétisés et peut-être la production d'une population à vie longue, circulante et capable d'activer des clones suppressifs. (LIEW et al. , 1980) (48 b).

- Ces populations suppressives seraient entretenues par les doses d'antigène introduites au niveau des cellules T suppressives et par les doses d'anticorps synthétisés.

Nous supposons que c'est à ce niveau qu'intervient le macrophage : non "armé" par les cellules T, il dégrade les antigènes de M. leprae et présente donc et des antigènes thymo-indépendants et des antigènes thymo-dépendants et des bacilles non détruits.

On peut penser que les antigènes thymo-dépendants, thymo-indépendants et les M. leprae non dégradés présentent des idiotypes communs et, que certains idiotypes sont également communs aux anticorps synthétisés et donc entretiennent la production

de cellules T suppressives.

Nous pensons également que M. leprae, de par sa nature même, modifie les propriétés des macrophages, les rendent inefficients à présenter aux cellules T non seulement M. leprae mais également d'autres antigènes thymo-dépendants. Chez les lépromateux, non seulement la réaction d'H.R. vis-à-vis de M. leprae est supprimée, mais également la réaction d'H.R. vis-à-vis d'autres antigènes.

(Les résultats préliminaires obtenus par HASTINGS et SHANNON (1980, non publié) ont montrés que, lorsque les macrophages de sujets lépromateux polaires sont ajoutés à des cellules lymphoïdes de sujets sains, ils exercent un effet supprimeur se traduisant par une diminution de la réponse proliférative lors du T.T.L., cet effet supprimeur est annulé lorsque les macrophages sont préalablement traités par choc de pH ou par trypsination). Il n'y aura pas d'inter-action avec les cellules T (lorsque celle-ci "découvrirent" l'antigène). Il en résultera :

- la non-coopération T-macrophage (non-présentation de l'antigène par les cellules T lorsqu'ils découvrent M. leprae), donc la non-production de T helper spécifiques de M. leprae, la non-coopération B-T nécessaire à la production d'anticorps dirigés contre les fractions thymo-dépendantes de l'antigène.

- la persistance dans l'organisme de structures antigéniques stimulant une production de cellules T suppressives.

Dans nos expérimentations, nous avons observé que, lorsque nous appauvrissions les cultures en cellules $T\gamma$, la réponse proliférative augmentait. Nous pensons que cette augmentation n'est pas d'ue à une restauration de la réponse immunitaire, car nous constatons une augmentation du pourcentage des cellules $T\gamma$ après culture (qui pourrait cependant n'être dû qu'au pourcentage de macrophages présents dans les cultures) et l'augmentation du pourcentage de cellules portant un récepteur pour le Fc des Ig G dans la population "d'autres cellules" n'est pas significative ($p < 0,10$).

Mais, si nous appauvrissions les cultures en macrophage, nous n'observons pas une augmentation du pourcentage de cellules T suppressives après culture et nous notons une augmentation très significative du pourcentage des "autres cellules" ($p < 0,005$) et, au sein de cette population, la fraction Fc des Ig G est significativement augmentée ($p < 0,005$).

Nous expliquons ces résultats par la normalisation de la réponse immunitaire : en appauvrissant les cultures en macrophages actifs, nous pensons que nous diminuons la production de cellules T suppressives. Cette diminution permettrait alors :

- la coopération des cellules T avec les monocytes macrophages restants,

- et la coopération T-macrophage-B pour la production d'anticorps spécifiques anti M. leprae , cette spécificité se traduisant par l'augmentation des cellules présentant un récepteur

pour le Fc des Ig G, et que nous pensons être des cellules K, au sein de la population "d'autres cellules". (Pour agir et être effectrice d'A.D.C.C., une cellule K doit être en présence de cellule cible recouverte d'anticorps anti-cellule cible spécifique).

Remarques :

- Il est bien connu que l'appauvrissement d'une fraction mononucléée a pour effet d'augmenter le nombre de cellules K impliquées dans l'effet A.D.C.C. (FEKETE et al., 1979) (21) mais, si nous comparons l'augmentation de la fraction des cellules présentant un récepteur pour Fc pour les Ig G après appauvrissement en cellules T γ ou en macrophages, nous voyons que l'augmentation de ce pourcentage est significatif uniquement après appauvrissement en macrophages. De façon à éliminer les erreurs techniques, nous avons fait la numération des cellules présentant un Fc pour les Ig G chez les sujets témoins sélectionnés comme décrit dans le chapitre III, paragraphe III.1. après appauvrissement en macrophages, et nous n'avons pas noté d'augmentation significative de ces cellules ($p > 0,5$).

- L'appauvrissement en macrophages diminue considérablement la réponse proliférative des cellules T (diminution de production de monokines) et l'augmentation non significative du pourcentage de cellules T γ pourraient être dûs plus à l'appauvrissement en macrophages qu'à une restauration de la réponse immunitaire, mais le pourcentage de cellules portant un récepteur pour le Fc des Ig G dans la population "d'autres cellules" chez

les sujets lépromateux après appauvrissement en macrophages augmente de façon significative par rapport à celui des sujets sains, ce qui est en faveur du rôle suppresseur du macrophage.

- Nous ne pouvons affirmer que la population présentant un récepteur Fc des Ig G dans la population "d'autres cellules" soit une population homogène : elle peut contenir des cellules nulles ou des cellules T à faible affinité pour les érythrocytes de mouton. Des investigations comprenant l'étude des phénomènes d'A.D.C.C. et l'étude des populations à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques doivent être faites. Il faut cependant noter que si les cellules K effectrices d'A.D.C.C. semblent appartenir à une fraction monocyte non adhérente définie par les sérums anti M1 et anti Ia (M1 + Ia⁻) (BREAD et al., 1981) (5ter), cette population n'est pas homogène et ^{comprend} ~~produit~~ également des cellules formant des rosettes avec les érythrocytes de mouton et des cellules nulles (BREAD et al., 1980) (5 bis).

- Le fait d'appauvrir les cellules mononuclées en cellules T_γ peut induire une réponse proliférative uniquement par modification du rapport cellulaire et les cellules que nous avons défini comme cellules T suppressives (rosettes positives et présentant un récepteur pour le Fc des Ig G) peuvent également être une population hétérogène comprenant deux populations dont une pourrait être non T (BREAD et al., 1981) (5 ter). Cependant, cette population a montré un effet suppresseur sur la réponse proliférative étudiée par le T.T.L. lorsqu'elle est ajoutée à des cellules mononuclées de sujets sains (quoique ces expérimentations n'aient pas été faites

après traitement par des cellules $T\gamma$ de sujets sains ou des cellules $T\gamma$ de sujets lépromateux par la mitomycine).

CONCLUSION

Nous pensons que, chez les sujets lépromateux polaire, l'effet suppresseur est induit par le déclenchement d'une réaction à médiation humorale avant le déclenchement d'une réaction à médiation cellulaire, ce qui entraîne une production de cellules T suppressives par les anticorps produits. Lorsque les cellules T "découvrent" M. leprae, il ne peut se déclencher de réaction à médiation cellulaire correcte car le macrophage modifié par M. leprae ne peut pas coopérer avec les cellules T.

Nous supposons que le macrophage joue un rôle primordial dans la collaboration T-macrophage-B pour produire une réaction à médiation cellulaire et pour la production d'anticorps spécifiques anti M. leprae, anticorps qui pourraient être effecteurs d'A.D.C.C. "In vitro" l'appauvrissement des cultures en macrophages actifs, permettrait, en diminuant une grande partie de la production de cellules T suppressives, l'induction d'une défense à médiation cellulaire correcte qui elle-même permettrait l'induction d'une réponse à médiation humorale correcte permettant la production d'anticorps spécifiques anti M. leprae. Les anticorps spécifiques induiraient la prolifération de cellules que nous pensons être des cellules K, cellules effectrices des phénomènes d'A.D.C.C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- 1 - ATALLAH A.M., FOLKS T. (1979), Interferon enhanced human Natural Killer and A.D.C.C. activating. Int. Arch. Allergy, 60, 377-382
- 2 - ASHERSON G.L., ZEMBALA M., (1976), Suppressor T cells in cell mediated immunity. Brit. Med. Bulletin, 32, 158
- 3 - BACH J.F. (1979), In Immunologie Flammarion Médecine Sciences Ed., 11, 357.
- 4 - BACH J.F. (1979) In Immunologie Flammarion Médecine Sciences Ed., 13, 372-400.
- 5 - BACH J.F. (1973) Evolution of T cells and thymic serum factors in man using the rosette technique. Transpl. Rev., 16, 196.
- 5 bis - BREAD J., REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., SCHLOSSMAN S.F. (1980), J. Immunol., 124, 1943.
- 5 ter - BREAD J., REINHERZ E.L., O'BRIEN C., SCHLOSSMAN S.F. (1981) Delineation of an effector population responsible for Natural Killing and A.D.C.C. in man. Clin. Immunol. Immunopathol., 18, 145-150.
- 6 - BLOOD B.R., CHASE M.W. (1967), Transfer of delayed-type hypersensitivity. A critical review and experimental study in the Guinea Pig. Prog. Allergy, 10, 151.
- 7 - BOODINGIUS J. (1974), The occurrence of mycobacterium leprae within axons of peripheral nerves. Acts Neuropathol., 27, 257-270.
- 8 - BONA C., PAUL W.E. (1979), Cellular basis of regulation of anti TNP antibodies carrying MOPC 460 idiotype in T and B lymphocytes recognition and function. Academic Press, 45, 433-441.
- 9 - BOYUM A. (1968), Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (sup. 97) 6, 76.

- 10 - CALDERON J., UNANUE E.R. (1975) An evolution of role of macrophages in immune induction. Fed. Proc., 34, 1737.
- 11 - CANTOR H., BOYSE E.A. (1975), Functional subclasses T lymphocytes bearing different Ly antigens (I et II). J. Exp. Med., 141, 1376-1390.
- 12 - CAPRON M., CAPRON A., TORPIER G., BOUT D., DUPAS H., BAZIN A. (1977), eosinophil and mast cells en antibody dependant cell-mediated. Eur. J. Immunol.,
- 12 bis - CATALONA W.J., TAYLOR P.T., CHRETIEN P.B. (1972), Quantitative dinitrochlorobenzene contact sensitization in a normal population. Clin. Exp. Immunol., 12, 235.
- 13 - CORDIER G., SAMARUT J., BROCHIER J., REVILLARD J.P. (1976), Antibody dependant cell cytotoxicity (A.D.C.C.) characterisation of Killer cells in human lymphoid organs. Scand. J. Immunol., 5, 233-242.
- 14 - DAVID J.R., DAVID R.R. (1972), Cellular hypersensitivity and immunity, Inhibition of macrophage migration and lymphocyte mediators. Prog. Allergy. 16, 300.
- 15 - DE LANDAZURI M.D., SILVA A., ALVAREZ J., HERBERMAN R.B. (1979) Evidences that natural cytotoxicity and antibody-dependant cell cytotoxicity are mediated in humans by the same effector cell population. J. Immunol., 123, 252-258.
- 16 - DIENER E., LEE K.G. (1977), The role of macrophage and their soluble products in immune regulation. In Progress in Immunology.

- 17 - DVORAK H.F., DVORAK A.M., SIMPSON B.M., RICHERSON H.B., LESKOWITZ S., KARNOFSKY M.J. (1970), Cutaneous hypersensitivity : a light and electron microscopic description. J. Exp. Med., 132, 558.
- 18 - ELLNER J. (1978), Suppressor adherent cells in human tuberculosis. J. of Immunol., 121, 6, 2573-2579.
- 19 - EVERETT N.B., CAFFREY R.W., RIEKE W.B. (1964), Recirculation of lymphocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113, 887.
- 20 - FAUVE R.M., HELVIN B. (1971), Pouvoir bactéricides des macrophages spléniques et hépatiques dessouris envers *Listeria monocytogenèse*. Ann. Inst. Pasteur. 120, 399.
- 21 - FEKETE B., FOURNIER C., DESCAMPS B., BACH J.F. (1979) In Bach Immunologie, Flammarion Médecine sciences. 4, 83.
- 22 - FELDMANN M. et al. (1979), On the nature of specific factors and the integration of their signals by macrophages. In T and B lymphocytes: Recognition and function. Academic Press. 37, 343-360.
- 23 - FELDMANN M., NOSSAL G.J.U. (1972), Tolerance, enhancement and the regulation of interaction between T cells, B cells and macrophages. Transpl. Rev., 13, 3.
- 24 - FELDMANN M. et al., (1976), Current concepts of antibody response Heterogeneity of lymphoid cells, interactions and factors. Cold spring Harbor symp. Quat. Biol. 41, 113.
- 25 - FIORE-DONATI L., HANNA M.G. (1969), Lymphatic tissue and germinals centers in immune response. Adv. Exp. Med. Biol. Plenum Press Ed. vol. 5.
- 26 - FORD W.L., GOWANS J.L. (1969), The traffic of lymphocytes. Seminar Hemat., 6, 67.

- 27 - GREAVES M.F., OWEN J.J.T., RAFF M.C. (1973), T and B lymphocytes : origin, properties and role on immune response. Exc. Med. American. Elsevier Ed.
- 28 - GRIFFIN F.M. et al., (1975), Studies on the mechanisms of phagocytosis : 1) Requirements for circumferential attachment of particule-bound ligands to specific receptors on the macrophages. J. Exp. Med., 142, 1263.
- 29 - GOREN M.B., D'ARCY-HART P., YOUNG M.R., ARMSTRONG J.A. (1976), Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultures macrophages by sulfatides of mycobacterium tuberculosis. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 73, 2510.
- 30 - HANDWERGER B.S., GIROUX D., KAY N.E., GOOSPEED B., HATFIELD S. SCHLIDKE J.R. (1979) Human T lymphocyte-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity. In The molecular basis of immune cell function. Elsevier, North Holland. 569-571.
- 31 - HAUGHTON G., WITMORE A.C. (1976), Genetics, the immune response and autogenesis. Transplant. Rev., 28, 75.
- 32 - HERBERMAN R.B., HOLDEN H.T., WEST W.H., BONNARD G.D., SANTONI A., NUNN M.E, KAY H.D., ORTALDO J.R. (1979), Cytotoxicity against tumors by NK and K cells. In Tumor-associated antigens and their specific immune response. Academic Press. 129-150.
- 33 - HERRICK M.V., POLLACK S.B. (1978), Kinetic analysis of A.D.C.C. ; evidence for non competitive inhibition by autologue lymphoid cells J. Immunol., 121, 1348-1352.
- 34 - HILLINGER S.M., HERZIG G.P. (1978) Impaired cell mediated immunity in Hodgking's disease mediated by suppressor lymphocytes and monocytes. J. Clin. Invest., 61, 1620.

- 34 bis - HORWITZ D.A., GARRET M.A. (1977) J. Immunol., 118, 1712.
- 35 - JANEWAY C.A., WORTIS N.H. (1979), Cell-cell recognition and regulation. Workshop of ICN-UCLA Symposium. In T and B lymphocytes. Recognition and function. Academic Press. 36, 339-341.
- 36 - JANKOVIC B.D., ISAKOVIC K. (1973), Microenvironmental aspects of immunity. Adv. Exp. Med. Biol. Plenum Press Ed. vol. 29.
- 37 - JANNOSSY G., SHOHAT M., GREAVES M.F., DOURSMARSHKIN R.R. (1972) Lymphocyte activation. IV: The ultrastructural pattern of the response of mouse T and B cells to mitogenic stimulation "in vitro". Immunology, 24, 211.
- 38 - JUY D., CAVAILLON J.M., BONA C. (1976), Influence chez le lapin de l'injection d'acétate de cortisone sur la transformation blastique et la cytotoxicité à médiation cellulaire anti-corps dépendants. Ann. Immunol. (Institut Pasteur) 127 c, 187-196.
- 38 bis - KAPLAN J., CALLEWAERT D. (1978), Expression of human T lymphocytes antigens by NK cells. J. Nat. Cancer Inst. 60, 961.
- 39 - KAPLOW I.S. (1965) Blood (J. Hematol.), 25, 215.
- 40 - KATZ D.H., BENACCERAF B. (1972), The regulatory influence of activated T cells on B cells responses to antigen. Adv. Immunol. 15, 1.
- 41 - KATZ D.H. (1977), Lymphocyte differentiation, recognition and regulation. Academic Press, IV, 78-79.
- 42 - KATZ D.H. (1977), Lymphocyte differentiation, recognition and regulation. Academic Press, VII, 189-195.

- 43 - KATZ D.H. (1977), Lymphocyte differentiation, recombination and regulation. Academic Press., VIII, 247-311.
- 44- KATZ D.H., BENACERRAF B. (1975), The function and inter-relationship between T cell receptors Ir genes, and other histocompatibility gene products. Transplant. Rev., 22, 175.
- 45 - KRAHENBUHL J.L., REMINGTON J.S. (1974), The role of activated macrophages in specific and non specific cytotoxicity of tumor cells. J. Immunol., 113, 507.
- 46 - LAGRANGE PH., MACKANESS G.B., MILLER T.E. (1974), Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. J. Exp. Med., 139, 528-542.
- 47 - LE DOUARIN N.M., SOTEREAU F. (1974), Tracing of cells of avian thymus through embryonic life in interspecific chimera. Contemp. Topics immunobiology, 3, 193.
- 48 - LHOMANN-MATTHES M.L., DOMZIG W., TASKOV H. (1979), Antibody-dependant cellular cytotoxicity against tumor cells. I Cultivated bone marrow derived macrophages Kill tumor target cells. Exp. J. Immunol., 9, 261-266.
- 48 bis - LIEW F.Y., HOWARR J.G. (1980), Regulation of DTMS V : suppressor cell memory in antigen specific suppression of DTMS to sheep erythrocytes. Eur. J. Immunol., 10, 937-943.
- 49 - LUMSDEN C.E. (1964), Leprosy and schwann cell "in vivo" and "in vitro". In Leprosy in theory and practice Cocherane RG, Davey TF eds. Bristol, Wright, 221-250.
- 50 - MAC LENNAM I.C.M. (1972), Antibody in the induction and inhibition of the lymphocyte cytotoxicity. Transplant. Rev., 13, 67, 90.

- 51 - MARKENSOV J.A., MORGAN W., LOCKSIN M.D., JOACHIM C., WINFIELD J.B. (1978), Responses of fractionated cells from patients with systemic lupus erythematosus and normals to plant mitogen : evidence for a suppressor population of monocytes Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158, 5.
- 52 - MILLER J.F. et al., (1976) Role of major histocompatibility complex gene products in delayed type hypersensitivity. Rev. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 73, 2486.
- 53 - MORETTA L., WEBB S., GROSSI C.E., LYDYARD P.M., COOPIER M. (1977) Functional analysis of two human T cell subpopulation help suppression of B cell response by T cells bearing receptors for Ig G or Ig M. J. Exp. Med., 146 , 184-200.
- 54 - MOLLER G. (1972), Lymphocytes activation by mitogen. Transpl. Rev., 11.
- 55 - MOLLER G. (1965) Contact induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign iso-antigens. Sciences, 147, 873-879.
- 56 - MOLLER G. (1974) The immune response to infectious diseases. Transplant. Rev., 19,1.
- 57 - NELSON D.S. (1972) Macrophages as effectors of cell-mediated immunity. Crit. Rev. Microbiol., 1, 353.
- 58 - NELSON D.S. (1976) Immunobiology of macrophage. Academic Press.
- 59 - NELSON D.S. (1976) Macrophage and immunity. Academic Press.
- 60 - PARISH C.R. (1972) The relationship between humoral et cell-mediated immunity. Transplant. Rev., 13, 35-66.
- 61 - PARROT (DMV), DE SOUSA M. (1971) Thymus-dependant and thymus-independent populations : origin, migratory pattern and lifespan. Clin. Exp. Immunol. 8, 663.

- 61 bis - PERLMANN P., PERLMANN H., MULLER E.B.E., RHARD H.I. (1975)
J. Exp. Med., 141, 287.
- 62 - PREUD'HOMME J.L., FLANDRIN G. (1974) J. Immunol., 113, 1650.
- 63 - PREUD'HOMME J.L., SELIGMANN M. (1974) Surface immunoglobulines on human lymphoid cells. In Progress in Clinical Immunology, Gruns and Stratton eds. 121.
- 64 - HAMSHAW I.A., BRETSCHER P.A., PARISH C.R. (1976) Regulation of the immune response : I suppression of delayed-type hypersensitivity by cells from mice expressing humoral immunity.
Eur. J. Immunol. 6, 674-679.
- 65 - REMOLD H.G. (1972) Purification and characterisation of lymphocytes mediators in cellular immunity. Transpl. Rev.10, 152.
- 66 - REMOLD H.G. (1974) The interaction of MIF with macrophages and macrophage activation. In Immunology. North Holland. II vol. 3, 145.
- 67 - RIDLEY D.S., JOPLING W.H.A. (1962) A classification of leprosy for research purposes. Lepr. Rev.33, 119-128.
- 68 - RIDLEY D.S. (1973) The pathogenesis of early skin lesions in leprosy. J. Pathol. 111, 191-206.
- 69 - ROCKLIN (1974) Clinical applications of "in vitro" lymphocytes test. Prog. Clin. Immunol. 2, 21.
- 70 -SCHMALZL F., BRAUNSTEINER (1968) Klin. Wochenschr 46, 185.
- 71 - SELIGMANN M.; PREUD'HOMME J.L. (1975) Membrane receptor of lymphocytes. North Holland
- 72 - SHANNON E., HASTINGS R.C. (1977) Methods for identification of human B lymphocytes. J. Immunol. Methods. 18, 321-336.

- 72 bis - SHAW S.U.U, PICKLER J.G (1979) Fc receptors on human lymphocytes III characterization of subpopulations involved in cell-mediated lympholysis and A.D.C.C. *J. Immunol.* 122, 599.
- 73 - SHREFFIER D.C, DAVID J.S. (1975) The major histocompatibility complex , region H₂ and the I immune response genetic variation and organisation. *Adv. Immunol.*, 20, 125.
- 74 - SKINSEES O.K. (1971) *M. leprae* and its "affinity" for nerves. *Int. J. Leprosy*39, 762-765.
- 75 - STEIGBIGEL R.T., LAMBERT L.H., REMINGTON J.S. (1974) Phagocytic and bactericidal properties of human normal monocytes. *J. Clin. Invest.* 53, 131.
- 76 - STEIGBIGEL R.T., LAMBERT L.H., REMINGTON J.S. (1974) Phagocytic and bactericidal properties of human normal monocytes. *J. Clin. Invest.* 53, 131.
- 77 - STROBER S., BOBROVE A.M. (1975) Assays for T and B cells. In laboratory diagnosis of immunologic disorders. Gruns and Statton 7.
- 78 - SUNDERLAND S. (1973) The internal anatomy of nerves trunks in relation to the neural lesions of leprosy. Observations in pathology, symptomatology and treatment. *Brain Ed.*, 96, 865-888.
- 79 - SUNDERLAND S. (1978) Nerves and nerves injuries. Churchill livingstone Eds. 2nd ed. 55.
- 80 - TADA T, TANIGUCHI M., DAVID C.S. (1976) Properties of antigen specific T cell factor in the regulation of antibody response in the mouse IV. Special sub-region assignment of the gene(s) that code the suppressive T cell factor in the H₂ histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 144, 713.

- 81 - TURK J.L. (1974) Delayed hypersensitivity. In Frontiers of biology. North Holland Ed. vol. 4.
- 82 - UNANU E. (1972) The regulatory role of the macrophage. Adv. Immunol. 15, 95.
- 83 - WEINER M.S., BIANCO C., NUSSENZWEIG (1973) Blood 42, 939.
- 84 - WING E.J., REMINGTON J.S. (1978) Delayed hypersensitivity and macrophage fraction. In Basic and clinical immunology. Lange Medical Publications. 9, 107.
- 85 - ZUCKERMAN S.H., DOUGLAS S.D. (1976) The lymphocyte plasma membrane : markers, receptors and determinants. Annal. Pathol. Appletion century crofts ed. 6, 119-162.

