

50376
1987
207

50376
1987
207

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année 1987

N° d'ordre : 156



Nouveau Régime

présentée à l'université de Lille I

pour l'obtention du titre de

Docteur en Biologie et Physiologie Animales

par

Thérèse THOREL

MANIPULATION DES MECANISMES DE DEFENSE ANTI-PARASITAIRES ET
DES FONCTIONS EFFECTRICES DES PHAGOCYTES MONONUCLEES ET DES
PLAQUETTES SANGUINES PAR DES IMMUNOMODULANTS EXOGENES.

Présentée le 28 septembre 1987 devant la Commission d'examen

JURY

Président	:	A. DHAINAUT
Rapporteurs	:	A. CAPRON
		M. PORCHET
Examineur	:	M. JOSEPH
Membre extérieur	:	P. BRAQUET

Cette thèse est dédiée à :

Christian,

qui m'a guidée dans le choix de mes études.

Julien,

mon père,

tous mes amis,

modeste témoignage de ma vive affection et de ma profonde reconnaissance.

Ce travail, entrepris

dans le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité mixte INSERM U 167-CNRS 624
Institut Pasteur de Lille
Directeur : Professeur A. Capron

est consacré à divers modulateurs exogènes provenant des
Laboratoires pharmaceutiques suivants :

Fisons : Loughborough (G.B.)

Fournier : Dijon

Delalande : Paris

Mérieux : Lyon.

A Monsieur le Professeur A. Capron,

J'éprouve une grande fierté et suis très honorée d'avoir été accueillie dans votre laboratoire reconnu mondialement.

C'est pour moi l'occasion de vous exprimer ma profonde gratitude et de vous remercier pour votre enseignement, votre compétence professionnelle et votre sens du contact humain qui ont toujours soulevé mon admiration.

Je souhaiterais que cette thèse soit pour vous un témoignage de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus vifs.

A Monsieur M. Joseph,

Votre soutien indéfectible et vos grandes qualités scientifiques et humaines ont permis la réalisation de ce travail.

Je vous remercie sincèrement de m'avoir guidée dans mes recherches, et pour les services que vous m'avez rendus.

Acceptez l'expression de ma profonde amitié.

A Monsieur M. Porchet,

qui spontanément m'a fait confiance, vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir juger cette thèse, qu'il me soit permis de vous exprimer ma très respectueuse considération.

A toute l'équipe du CIBP, en particulier :

Monsieur A.B. Tonnel,

grâce à vous j'ai pu travailler sur des prélèvements humains. Je suis très heureuse de pouvoir vous exprimer toute ma gratitude pour votre confiance.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Madame F. Darcy,

pour la précieuse collaboration dans les travaux menés sur la toxoplasmose.

Monsieur J.Y. Cesbron,

pour m'avoir permis d'essayer diverses molécules dans le modèle filarien.

Messieurs M.A. Ouassi et D. Afchain,

pour m'avoir permis de tester certaines drogues dans le modèle T.cruzi.

MERCI.

Pour toutes les personnes du laboratoire qui, de près ou de loin, m'ont aidée de leurs mains et de leur savoir, et plus particulièrement M. Han Vorng.

MERCI.

Liste des publications

M. Joseph, A. Capron, T. THOREL, H. Vorng, M. Pascal. (1985).

Immunomodulation of human or rat macrophages and platelets by LF1695 *in vivo* and *in vitro*.

Int.J. Immunopharmac. 7 (3) : 316 (abstract).

M. Damonville, C. Auriault, T. THOREL, C. Verwaerde, A. Pierce, G. Strecker, A. Capron. (1986).

Induction of a protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of Schistosomulum-Released Products : immunochemical properties of the antigens.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 79 : 320-328.

M. Joseph, A. Capron, T. THOREL, A. B. Tonnel (1986).

Nedocromil sodium inhibits IgE-dependent activation of rat macrophages and platelets as measured by schistosome killing, chemiluminescence and enzyme release.

Eur.J. Respir. Dis. 69 (147) : 220-222.

T. THOREL, M. Joseph, A. B. Tonnel, A. Capron (1987).

In vitro modulation by nedocromil sodium of IgE-mediated activation of mononuclear phagocytes and platelets from rat and from man.

Annual meeting of european academy of Allergology and clinical immunology. Palma de Mallorca avril 1987.

T. THOREL, M. Joseph, A. B. Tonnel, A. Capron. (1987).

Inhibition by nedocromil sodium of IgE-Mediated activation of mononuclear phagocytes and platelets from rat and man *in vitro*.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 83 (1) : 19.

Abstract and Poster (Genève avril 1987).

T.THOREL, M.Joseph, H.Vorng, A.Capron.(1987).

The regulation of the IgE-dependent anti-parasite functions of rat macrophages and platelets by nedocromil sodium.

Int.Archs.Allergy appl. Immun.

(sous presse).

T.THOREL, M.Joseph, A.Tsicopoulos, A.B.Tonnel, A.Capron. (1987).

Inhibition by nedocromil sodium of IgE-Mediated activation of human mononuclear phagocytes and platelets in Allergy.

Int. Archs. Allergy appl. Immun.

(sous presse).

M.Joseph, C.H.Marquette, T.THOREL, H.Vorng, A.B.Tonnel, A.Capron (1987).

Comparative effect of nedocromil sodium and sodium cromoglycate on the abnormal response to aspirin of platelets from aspirin-sensitive asthmatics.

6 th Congress of the european society of pneumology (SEP) Amsterdam; Free University , 31 st August-5 th September 1987.

Eds: J.Stam, J.Siebelink, R.Vanderschueren and J.Wagenaar.

Abstract n°55 p 21-22. Societas Europaeae Pneumologica.

A.Tsicopoulos, P.Lassalle, M.Joseph, A.B.Tonnel, T.THOREL, J.P.Dessaint, A.Capron (1987).

Effect of disodium cromoglycate on inflammatory cells bearing the Fc epsilon receptor type II (Fc ϵ RII).

International Journal of Immunopharmacology (Soumis).

RESUME

L'interaction complexe entre les parasites et leurs hôtes a retardé le développement de procédés efficaces d'immunoprévention et d'immunothérapie dans les maladies parasitaires. Par conséquent, dans de telles infections, il est urgent et crucial de tester des modificateurs de la réponse biologique. Une meilleure connaissance de l'interaction hôte-parasite et des mécanismes immunologiques dans différentes helminthiases, spécialement la schistosomiase et la filariose, ainsi que dans des protozooses a permis d'étudier des substances immunostimulantes.

Les résultats de cette thèse concernent trois immunomodulants LF 1695 (Fournier, Dijon), Pind-Avi (Delalande, Paris), et Imuthiol (Mérieux, Lyon). Le LF 1695 stimule des mécanismes de défense de rats infectés par *Schistosoma mansoni* et potentialise certains paramètres métaboliques, mesurés *in vitro*, des macrophages et des plaquettes. Le PA 485 induit une protection chez le mastomys infecté par *Brugia malayi*, et chez des souris infectées par *Toxoplasma gondii*. Enfin l'Imuthiol a un effet favorable et significatif sur la survie de souris infectées par *Trypanosoma cruzi*. Les mécanismes de défense contre les helminthes, principalement basés sur l'activation dépendant de l'IgE des cellules inflammatoires, ont ouvert de nouvelles perspectives sur les processus immunopathologiques des allergies et pseudo-allergies. Dans ce domaine, l'effet modulateur d'une nouvelle substance anti-asthmatique, le nédocromil de sodium, a été testé sur des phagocytes mononucléés et des plaquettes. Ce composé inhibe à la fois l'activation IgE-dépendante de ces cellules, et la réponse anormale à l'aspirine des plaquettes de sujets présentant un asthme à l'aspirine.

Ces résultats constituent l'une des premières approches de manipulation des processus immunitaires dans les infections parasitaires, et suggèrent une possibilité de moduler ou de prévenir certaines affections allergiques.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Parallèlement au développement des connaissances immunologiques, l'industrie pharmaceutique s'est attachée à produire des molécules susceptibles de soutenir, renforcer ou rétablir des fonctions immunes insuffisantes ou défaillantes. Cette immunopharmacologie a soit copié ou synthétisé des médiateurs naturels du système immunitaire au fur et à mesure de leur découverte, soit agi de manière artificielle sur les partenaires cellulaires ou humoraux de la réponse immune. Ces recherches ont obtenu des succès réels non seulement dans le cadre de la synthèse des anticorps - si l'on résume par un tel effet les conséquences de l'addition d'adjuvants aux composés vaccinaux - mais également dans un certain nombre d'affections virales, bactériennes ou même tumorales. Ces résultats positifs ont été relativement aisés à obtenir tant qu'il était question de stimuler de façon unilatérale soit la réponse humorale soit la réponse cellulaire, et dans la mesure où seule l'une ou l'autre de ces réponses était impliquée dans la destruction du pathogène. Un certain nombre d'acquis de cette immunopharmacologie seront présentés dans la dernière partie des généralités de cette thèse.

La stimulation du système immunitaire dans les affections parasitaires, en revanche, a confronté dès l'origine les industriels à une difficulté majeure liée à la nature des relations entre les parasites et leurs hôtes. En effet, ces relations sont basées sur une longue évolution commune qui a abouti à une certaine coexistence des deux types d'organismes en dépit de l'existence, ou de l'acquisition, de mécanismes de défense de l'hôte à l'encontre du parasite agresseur. En fait les recherches menées ces dernières décennies dans le domaine de l'immunité anti-parasitaire ont mis en évidence, en particulier dans le cas des helminthiases, "l'invention" de moyens d'échappement très originaux et efficaces qui les mettent à l'abri, principalement au stade adulte, des mécanismes immuns qu'ils ont eux mêmes suscités. Le second élément révélé par ces relations hôtes-parasites est que, si ces mécanismes immunitaires ont une activité certaine, ils s'exercent d'une part contre les formes jeunes du parasite, et surtout, au vu de la taille des organismes qu'il s'agit d'éliminer, nécessitent la participation mixte de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire, dans des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). On comprend dès lors que l'immunopharmacologie des maladies parasitaires se soit trouvée dans une situation nouvelle, comparée aux infections déclenchées par les autres microorganismes, et qu'elle demande, pour être pleinement efficace, une connaissance précise des mécanismes

immunitaires mis en jeu. Ceci explique en grande partie le retard manifesté par cette branche dans le domaine de la thérapeutique ou même de la prévention de ces affections.

D'où le souci exprimé par un certain nombre de Sociétés pharmaceutiques de confier à des équipes fortement impliquées dans l'immunologie des parasitoses, l'étude des potentialités de diverses molécules produites par leurs laboratoires de recherche, et de les appliquer aux essais thérapeutiques ou prophylactiques menés *in vivo* dans les infections expérimentales chez l'animal, et *in vitro* sur les mécanismes immunitaires déjà identifiés. Dans ce contexte, notre travail de thèse rend compte des observations réalisées avec trois modificateurs de la réponse biologique (LF 1695, Pind-Avi et Imuthiol), fonctionnant comme stimulants des défenses immunitaires vis-à-vis d'helminthiases (schistosomiase et filariose) et de protozooses (trypanosomiase sud-américaine et toxoplasmose).

Par ailleurs, comme les mécanismes immunitaires découverts dans les helminthiases ont débouché sur l'implication de nouvelles cellules (macrophages, éosinophiles et plaquettes) dans l'interaction avec les immunoglobulines E, liant ces cellules aux processus allergiques, nous avons été amenés à nous intéresser également à l'effet d'un immunomodulant (nédocromil de sodium) dans les réactions d'hypersensibilité et les intolérances pseudo-allergiques, aspect qui constituera le dernier élément de nos résultats.

Dans une première partie nous allons apporter une synthèse de nos connaissances sur les mécanismes de défense vis-à-vis des infections parasitaires concernées par notre travail, avec un accent particulier sur la réponse IgE, étant donné que ces mécanismes, font essentiellement appel à l'interaction entre des IgE et des cellules non mastocytaires, et qu'une telle interaction a des répercussions dans des pathologies non parasitaires comme l'allergie et les réactions inflammatoires.

Cette interaction IgE/cellules aboutissant à une activation, marquée par la génération de médiateurs cellulaires, la seconde partie des généralités s'attachera d'une part aux messagers intercellulaires et aux médiateurs de la réaction immune et inflammatoire, et d'autre part aux relations, directes ou indirectes, de diverses cellules, essentiellement les macrophages et les plaquettes .

Enfin, la troisième partie des généralités sera consacrée aux possibilités de modulation des étapes d'activation cellulaire ainsi rapportés - application principale des agents exogènes d' immunomodulation - ainsi qu'aux caractéristiques de ces immunomodulants .

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

ADCC	antibody-dependent cell cytotoxicity Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
FcεRII	Récepteur de type II pour les IgE
DI	déficit immunitaire
BP	<i>Bordetella pertussis</i>
LPR	pertussigène
ACF	adjuvant complet de Freund
CRP	protéine C réactive
PAF	platelet activating factor
PG	prostaglandines
AA	acide arachidonique
MDP	muramyl dipeptide
LPS	lipopolysaccharide
Con A	concanavaline A
LF 1695	modulant des laboratoires Fournier à Dijon
PA 485	Pind-Avi (Delalande)
DTC	Imuthiol (Mérieux)
DSCG	Cromoglycate de sodium

G E N E R A L I T E S

A) MECANISMES DE DEFENSE ANTI-PARASITAIRES ET INTERVENTION DES IGE DANS CERTAINS MODELES.

I MECANISMES ANTI-PARASITAIRES.

Le parasitisme implique une adaptation étroite du parasite à son hôte. La survie des parasites, et donc la persistance de l'infection parasitaire, suppose la relative inefficacité de la réponse immunitaire de l'hôte. De fait, beaucoup d'infections évoluent vers le mode chronique avec une charge parasitaire modérée, sans risque vital immédiat pour l'hôte (à l'exception du paludisme). L'adaptation du parasite à son hôte immunocompétent aboutit à l'établissement d'un équilibre où les mécanismes potentiels de l'immunité protectrice sont contre-balancés par divers mécanismes de survie par lesquels les parasites échappent aux conséquences de la réponse immunitaire qu'ils ont induite. Ainsi s'établit un réseau complexe de réactions antagonistes où le parasite est responsable d'une véritable immunomodulation des étapes d'induction ou des stades effecteurs de la réponse immunitaire.

Les parasites diffèrent par leur taille, leur potentiel multiplicatif, leur localisation dans l'organisme infecté, leur adaptation à l'organisme parasité... A tous ces paramètres, qui influent grandement sur l'intensité de la stimulation

antigénique et sur l'efficacité potentielle des mécanismes effecteurs de l'immunité, s'ajoutent encore de notables variations suivant l'espèce ou la race animale parasitée, qui rendent très délicate l'extrapolation aux infections humaines d'observations faites dans les modèles expérimentaux. Il est cependant possible de schématiser l'immunité anti-parasitaire selon trois grandes catégories :

-L'absence apparente d'immunité acquise:

C'est le cas particulier des trypanosomiasés africaines ou américaines (*T. cruzi*) et autres affections par nématodes, où aucune évidence de résistance acquise n'est décelable, le parasitisme persistant pendant de très longues périodes parfois durant la vie entière de l'individu.

-L'immunité stérilisante (type II):

Dans ce cas, elle s'accompagne d'une guérison clinique, d'une élimination complète du parasite et d'une résistance acquise de longue durée à la réinfection .

-L'immunité non stérilisante (type I):

Entre ces deux extrêmes, le cas le plus fréquent est celui où la réponse immunitaire entraîne une résistance acquise à la réinfection conduisant au maintien du parasitisme en dessous d'un seuil contrôlé. Ce type de réponse est caractéristique de

nombreuses helminthiases et est connu, dans le cas de la bilharziose, sous le nom d'immunité concomitante. Au cours de la schistosomiase expérimentale tout semble se passer comme si l'adulte suscitait une réponse immune à laquelle seules les jeunes larves seraient sensibles .

Cependant, bien que l'adulte semble être un des stimuli majeurs de la réponse anti-schistosome, il faut signaler un certain nombre de travaux qui soulignent l'intérêt des antigènes d'origine larvaire dans l'induction des mécanismes protecteurs . (Smithers et Terry 1969) (Capron A. 1975).

Caractéristiques de la réponse immunitaire

La schistosomiase:

Les schistosomes sont des vers parasites de l'homme et de certains animaux domestiques et sauvages (rongeurs, singes) des régions tropicales et subtropicales. Leurs diverses espèces touchent près de 350 millions d'individus dans le monde et sont responsables des bilharzioses urinaires (*Schistosoma haematobium*), intestinales (*Schistosoma mansoni*) ou intestinales

et pulmonaires (*Schistosoma japonicum*), selon l'espèce et le lieu de fixation des vers adultes, mâles et femelles, dans le système veineux des sujets atteints. La larve aquatique du parasite (la cercaire) sort du mollusque où elle s'est développée par milliers d'exemplaires .

L'infection a lieu lorsque la cercaire traverse la peau de l'homme au cours d'un bain dans une eau contaminée. Le jeune parasite (le schistosomule) migre dans l'organisme et va coloniser (en ce qui concerne *S. mansoni*) les veines hépatiques et intestinales, où, adulte, il peut vivre plusieurs années. Les femelles pondent des oeufs qui sont à l'origine des troubles pathologiques occasionnés à l'hôte.

En effet, si, au début de l'infestation, la plupart des oeufs sont éliminés par l'intestin et assurent la continuité du cycle grâce au miracidium qui peut infecter un nouveau mollusque, à un certain stade de l'infection la plupart des oeufs restent bloqués dans l'organisme du sujet parasité où ils provoquent une réaction inflammatoire et des abcès, surtout au niveau du foie et de la rate qui deviennent extrêmement volumineux .

Les sujets parasités et qui vivent en zone d'endémie voient se développer, au cours des années un état de protection à

l'égard des larves qui tentent de les surinfecter. Tout se passe comme si les adultes, s'arrangeaient pour l'empêcher de mourir d'une surcharge de vers. Les malades acquièrent donc bel et bien, une immunité, qui ne se développe malheureusement qu'à la suite des premières infections. Cette immunité acquise se manifeste contre la forme larvaire précoce du parasite, c'est à dire dans les premières heures qui suivent une nouvelle pénétration de larves dans la peau. En effet après quatre jours, le schistosomule acquiert des antigènes identiques à ceux de son hôte, qui semblent le protéger des mécanismes immunitaires de l'organisme infecté.

C'est probablement là l'une des explications de la longue survie des vers adultes malgré l'immunité qu'ils suscitent. Outre ce camouflage, le parasite utilise d'autres mécanismes d'échappement qui le mettent à l'abri des réactions de défense dressées contre lui, ce qui explique aussi la longue survie des schistosomes adultes dans l'hôte qui les héberge. De plus la présence d'anticorps bloquants - de classe IgM chez l'homme (Khalife J. 1986) - empêche en partie l'expression de l'immunité chez l'hôte parasité .

a) Immunité humorale

Il a été montré que des sérums humains, ainsi que des sérums de rats et de singes rhésus, peuvent avoir un caractère léthal pour les schistosomules en présence de complément frais de cobaye (Clegg et Smithers 1977; Capron A 1974, 1977). Les anticorps impliqués ont été identifiés comme étant des IgG. La signification biologique de ces anticorps cytotoxiques reste toutefois à préciser. En effet, la nécessité d'une source de complément hétérologue, alors que plusieurs exemples montrent l'inefficacité du mécanisme en présence d'un sérum homologue, est une des principales objections apportées à ces résultats. Par ailleurs, le maintien d'un taux élevé d'anticorps léthaux d'isotype IgG dans les sérums ne représente pas le seul mécanisme immunitaire développé par l'hôte pour se protéger des schistosomes. En effet, des quantités importantes de sérum contenant les anticorps léthaux sont nécessaires pour transférer la protection. En outre, des tests de neutralisation, dans lesquels les parasites sont préincubés dans du sérum immun avant l'inoculation expérimentale, ont révélé l'existence d'anticorps protecteurs dans la schistosomiase et certaines autres infections parasitaires.

b) Immunité à médiation cellulaire

* La Bilharziose

De nombreux arguments montrent clairement la thymo-dépendance de la réponse anti-schistosome, en particulier les études sur des rats génétiquement athymiques par Capron M. (1983), et Phillips S.M. (1983).

Cependant, alors que les schistosomules acquièrent au contact de l'hôte des antigènes d'histocompatibilité (des produits K/I ou I du CMH de la souris) (Sher A. 1978), et que des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) alloréactifs de phénotype $\text{Lyt1}^{-}, 2\ 3^{+}$ adhèrent spécifiquement aux parasites, il a été montré que les CTL ne participent pas aux mécanismes d'élimination des parasites (Butterworth 1979) .

Des cellules T stimulées par la PHA pourraient exercer une activité cytotoxique vis-à-vis des schistosomules, mais cette observation n'a pas été confirmée. Les mécanismes essentiels de l'immunité à médiation cellulaire apparaissent être l'hypersensibilité à médiation cellulaire et l'activation du potentiel cytolytique des macrophages .

L'activation non spécifique des macrophages (par BCG ou *C. parvum*) les rend capables de tuer les schistosomules *in vitro*. Dans l'infection expérimentale de la souris, l'activité tumoricide des macrophages est augmentée ainsi que leur activité

cytotoxique vis-à-vis des schistosomules (James 1982). Ceux-ci peuvent également être détruits *in vitro* par des macrophages normaux activés par les surnageants de cultures lymphocytaires stimulées par des mitogènes ou ceux de clones T. En fait, ces mécanismes d'activation du potentiel cytolytique des macrophages ont principalement été identifiés dans des infections par protozoaires.

***La toxoplasmose**

Les infections à Toxoplasme atteignent l'homme et de nombreux vertébrés à sang chaud dans le monde entier, à l'exception peut être des régions polaires, mais leurs fréquences varient considérablement d'un pays à l'autre.

Cette maladie revêt deux aspects particulièrement importants:

- l'aspect humain dû à la toxoplasmose congénitale ou dans les DI par la transmission d'une infection primaire de la mère au fœtus.
- un aspect vétérinaire provoqué également par la toxoplasmose congénitale qui atteint des animaux domestiques tels que le porc et le mouton. La parasitose est alors responsable d'avortements, de mortinatalité et d'une forte mortalité entraînant des pertes économiques considérables.

En raison, de ces répercussions médicales et vétérinaires, l'OMS a conseillé un certain nombre de thèmes de recherches sur la toxoplasmose.

L'immunité à support cellulaire chez l'animal et l'homme constitue l'un de ces thèmes, (Darcy F. 1987). Cela n'a pas été notre but essentiel, qui est l'apanage d'une autre équipe au laboratoire, toutefois nous avons utilisé deux modulateurs exogènes dans ce modèle : le PA 485 et le DTC.

L'exposé sera précédé d'un rappel sur la toxoplasmose et de l'immunité dans cette parasitose.

La forme végétative du toxoplasme a été découverte en 1908 par Nicolle et Manceau, chez un rongeur sauvage particulièrement sensible : le gondi (*Ctenodactylus gondii*). Ce trophozoïte a 5 à 8 micromètres de long sur 2 à 5 de large, avec une extrémité effilée (conoïde). Cette forme est celle que l'on obtient par des souches virulentes. Pour les souches avirulentes, la forme commune est le kyste.

La forme kystique viscérale, est un vrai kyste de 15 à 100 micromètres de diamètre, sphérique qui va se loger dans le cerveau et les lobes oculaires de l'hôte définitif. Il persiste très longtemps dans les tissus infestés de façon chronique.

C'est en 1965 que Hutchinson montra que des formes infectieuses pouvaient être transmises par les oeufs d'un

ascaris du chat (*Toxocara cati*). Puis Jacobs (1967) constatait que les selles de chat non parasitées par cet ascaris pouvaient être infectieuses. Ceci eût pour conséquence la découverte des ookystes et du cycle évolutif.

Les ookystes sont éliminés dans les selles de chat, ils sont presque sphériques et ne contiennent qu'une masse granuleuse. Après sporulation dans le milieu extérieur, ils sont ovoïdes et mesurent de 9 à 11 micromètres sur 11 à 14 micromètres. Limités par une membrane externe résistante, ils contiennent 2 sporocystes ovoïdes à l'intérieur desquels se différencient 4 sporozoïtes.

Le cycle est complexe : il peut en effet, exister un cycle direct où le chat, hôte définitif est le seul concerné, et un cycle indirect où divers mammifères jouent le rôle d'hôtes intermédiaires.

a) Le cycle direct est celui d'une coccidie classique, le chat est l'hôte définitif. deux modes de multiplication se déroulent dans l'intestin :

- une multiplication asexuée ou schizogonie assurant la dissémination du parasite dans le tube digestif.
- une multiplication sexuée ou gamogonie à microgamétocytes mâles et femelles donnant naissance à un oocyste.

Sur le sol la maturation des oocystes ou sporogonie s'effectue avec une rapidité qui est fonction de la température. Les 8 sporozoïtes sont alors infectieux pendant plusieurs mois. .

b) Le cycle indirect comprend un ou plusieurs hôtes intermédiaires qui sont des vertébrés homéothermes. Chez l'hôte intermédiaire le mode de contamination est variable, soit par l'ingestion d'oocystes mûrs, soit par ingestion de kystes viscéraux ou accessoirement de trophozoïtes par transmission congénitale essentiellement.

Il n'y a pas de phase coccidienne intestinale mais une multiplication des trophozoïtes dans les cellules du système réticulo-endothélial, selon le processus d'endogénie ; sorte de schizogonie souvent binaire mais qui peut être multiple. Le parasite va se disséminer dans l'organisme par parasitémie.

Si la souche est virulente, elle va entraîner la mort de l'animal ; si elle est avirulente il y aura formation de kystes dans le cerveau et les lobes oculaires.

On connaît la différence des souches de toxoplasmes, les unes comme la souche virulente RH de Sabin, tuent très rapidement les animaux, les autres comme la souche chronique de Beverley provoquent seulement la formation de kystes tissulaires.

Ces deux souches ont été utilisées au cours de nos expériences.

On sait également par l'observation clinique que l'âge est un facteur important, puisque le foetus est plus particulièrement atteint.

Les facteurs humoraux sont présents dès le 4^{ième} jour de l'infection. Ces anticorps détruits par le 2-mercapto-éthanol sont des IgM. (Staib F. 1966).

Les IgG qui sont, elles, résistantes à cet agent, apparaissent ensuite.

Dans la toxoplasmose, la résistance peut être transférée passivement par des cellules lymphoïdes de donneurs immuns (Frenkel 1969). Des macrophages, activés par les lymphocytes d'un animal infecté stimulés par l'antigène de *T. gondii*, deviennent capables d'inhiber la croissance intracellulaire des toxoplasmes. Cette résistance apparaît maximale si les macrophages de donneurs immuns sont cocultivés avec des cellules T sensibilisées en présence de l'antigène de toxoplasme, aussi bien dans les modèles expérimentaux qu'avec des cellules humaines .

Dans cette affection également, l'immunité à médiation cellulaire semble intriquée avec des mécanismes dépendant d'anticorps. Des toxoplasmes opsonisés avec des sérums immuns sont en effet détruits en absence de complément par les

macrophages normaux, après leur pénétration dans la cellule. Les toxoplasmes exposés aux anticorps deviennent incapables de s'opposer à la fusion phagosome-lysosome, mais, en revanche, stimulent le métabolisme oxydatif des macrophages. Ces résultats ont pu être reproduits à l'aide d'anticorps monoclonaux (Dubremetz J.F. 1985).

*La maladie de Chagas

Trypanosoma cruzi, agent de la maladie de Chagas est un protozoaire flagellé de la famille des *Trypanomastidae* ordre des *Kinétoplastidae*, classe des *Zoomastigophorea*.

D'après la classification de Hoare (1964) qui divise les trypanosomes en *Stercoraria* et en *Salivaria* selon des critères de transmission, *T.cruzi* fait partie du groupe *Stercoraria*. Cette classification a été confirmée par des études immunostructurales d'Afchain (1976). A l'heure actuelle, les études de souches de *T.cruzi* révèlent de nombreuses variations au sein du taxon *T.cruzi* selon des critères morphologiques, biologiques, sérologiques et biochimiques.

Classement des souches selon des caractéristiques morphologiques et biologiques:

Selon la morphologie des trypomastigotes sanguicoles de l'hôte, Brener (1973) décrit deux types principaux à savoir :

- la forme fine qui présente un noyau allongé, un kinétoplaste subterminal et un flagelle libre et long (souche Y),
- la forme trapue : noyau en position postérieure, kinétoplaste terminal et cytoplasme fortement vacuolisé (souche CL).

En fonction de l'évolution de la parasitémie, Brener démontre que selon les souches de *T.cruzi*, la distribution de ces différentes formes au cours de l'infection diffère. Par exemple pour la souche Y, les formes fines prédominent du début à la fin de l'infection.

Par contre pour la souche CL, les formes fines prédominent aux premiers jours de l'infection mais elles sont progressivement remplacées par les formes trapues qui arrivent à constituer 90 % de la population parasitaire. Les formes trapues sont moins infectantes que les formes fines, mais semblent mieux adaptées à réaliser le cycle évolutif chez le vecteur.

La souche Y présente chez l'animal infecté, une affinité particulière pour les macrophages de la rate, du foie et de la moëlle osseuse, alors que la souche CL infecte préférentiellement le tissu musculaire.

Classement des souches selon des critères sérologiques:

Certains auteurs mettent en évidence, selon les souches, des différences de sensibilité à la réponse immune de l'hôte vertébré. Celles-ci peuvent indiquer l'existence d'une hétérogénéité antigénique entre les différentes souches. Mais aucune preuve directe n'a été rapportée.

Classement des souches selon des critères biochimiques:

L'analyse comparative, sur différentes souches de *T.cruzi*, de la mobilité électrophorétique des isoenzymes, confirme l'hétérogénéité intraspécifique de cet ensemble de parasites.

Les travaux de Miles (1980) au Brésil ont permis l'identification de trois groupes majeurs de zymodèmes de *T.cruzi*.

Souche Tehuantepec

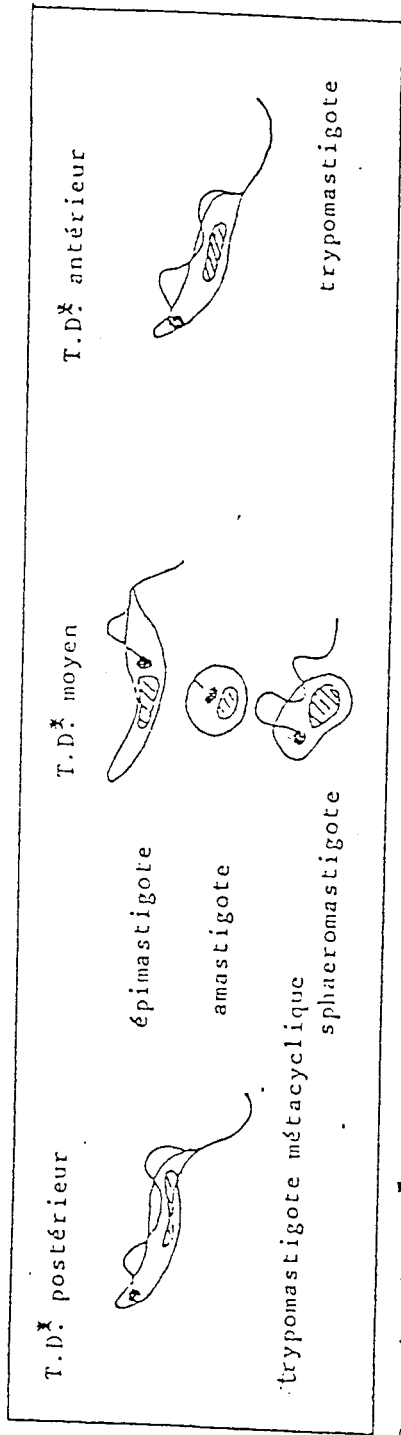
Elle a été isolée en 1938 par Brumpt E. à partir du vecteur *Triatoma sp.*, trouvé infecté naturellement dans la région de Tehuantepec au Mexique.

Cette souche est en relation étroite avec le zymodème 1 bolivien.

Souche Tulahuen

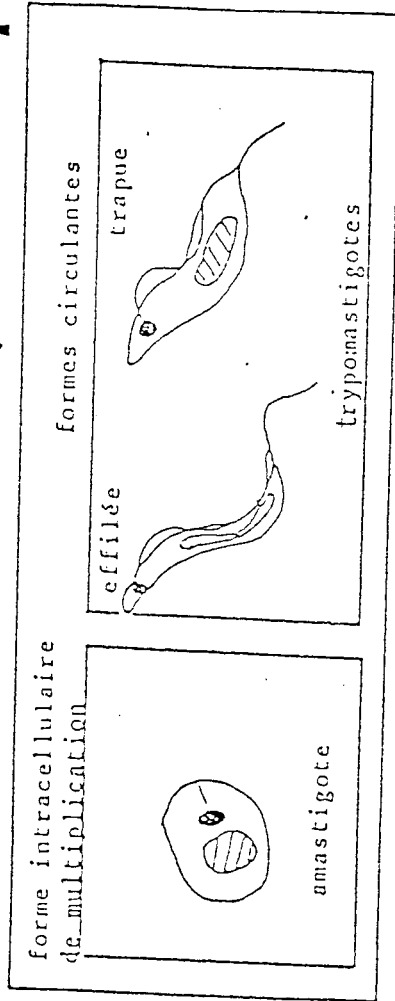
Cette souche a été isolée en 1945 à partir de *Triatoma infestans* à Tulahuen, (Chili). Elle a été démontrée identique isomatiquement au zymodème 2 de Bolivie. (Tibayrenc 1983).

Cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi*



Contamination
par les fèces
de l'insecte

Piqûre de
l'insecte et
ingestion des formes
trypomastigotes



Insecte vecteur

Reduviidae

Hôte définitif

Mammifère

x Tube digestif

Cycle évolutif:

Il se partage entre un insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un mammifère (hôte définitif : l'homme et la plupart des mammifères domestiques et sauvages). Au cours de celui ci, le parasite se rencontre sous différentes formes (voir schéma).

Cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire:

Le vecteur

La maladie de Chagas est transmise par un insecte domestique hématophage : un réduvidé (*Triatomidae*) dont il existe une centaine d'espèces en Amérique Latine.

Cycle évolutif

Chez le vecteur, la transmission s'effectue lors de la piqûre, par régurgitation du sang de l'hôte infecté. Les trypomastigotes sanguicoles atteignent le tube digestif moyen de l'insecte où ils se transforment en épimastigotes et amastigotes, formes de multiplication non infectantes.

Mode de transmission

Lors de la piqûre nocturne ou directement au niveau des muqueuses l'insecte défèque et les formes trypomastigotes métacycliques, contenues dans les fécès sont transmises à l'hôte

définitif par contamination.

Du fait de leur médiocre qualité, les matériaux de construction de la plupart des habitations rurales et des bidonvilles de la périphérie des grandes villes d'Amérique Latine constituent un abri idéal pour la prolifération et le développement des vecteurs. L'environnement péridomestique (poulaillers, clapiers... proches ou à l'intérieur des habitations), entretient également la transmission.

Cycle évolutif chez l'hôte définitif:

Cycle évolutif

Chez l'hôte définitif, le parasite circule dans le sang périphérique sous la forme trypomastigote sanguicole. Directement exposée aux mécanismes effecteurs de la réponse immune, elle va pénétrer dans certaines cellules et notamment dans les cellules musculaires pour s'y transformer en forme amastigote. Les amastigotes, formes intra-cellulaires du parasite, vont se multiplier puis se différencier en formes trypomastigotes, qui seront libérées à nouveau dans le sang périphérique après rupture des cellules infectées.

Mode de contamination

Il peut se faire par :

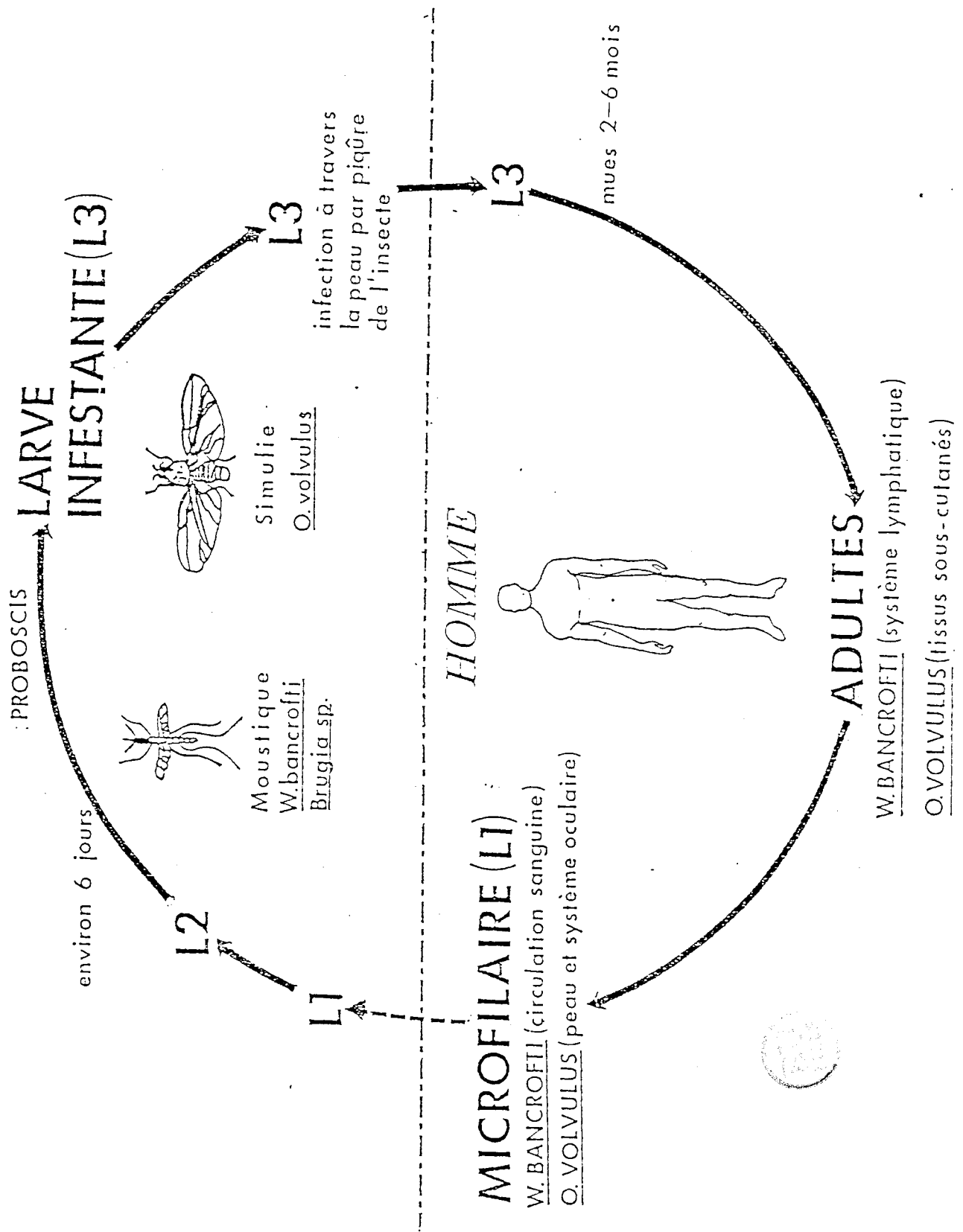
- les fécès de l'insecte vecteur contenant les formes trypomastigotes métacycliques. celles ci pénètrent la peau, les muqueuses buccales, nasales ou conjonctivales.
- passage du parasite à travers le placenta.
- transfusion sanguine ; cette transmission de la maladie constitue un véritable fardeau en matière de santé publique dans les zones urbaines : les chiffres concernant le Brésil montrent qu'au moins 20 % des donneurs de sang sont parasités. Aussi cette source de contamination n'est pas négligeable.

Les macrophages, activés spécifiquement ou non, sont capables de détruire la forme infectieuse de *T. cruzi*, notamment en s'opposant à la sortie des trypomastigotes hors du phagolysosome. Si les anticorps opsonisants augmentent l'ingestion du parasite, les macrophages normaux sont capables de le détruire. Cependant, chez la souris, en cas d'infection aiguë (mais non chronique) l'immunité est transférable par le sérum .

***Les Filarioses**

Elles sont très répandues dans les régions tropicales. On estime à 300 millions le nombre de personnes atteintes. Ces parasites provoquent toute une série de manifestations cliniques attribuées à la réponse immune de l'hôte.

Les filarioses sont causées par des nématodes de la famille des *Filaroïdea*. Les filaires adultes vivent dans les tissus ou les cavités d'un hôte vertébré. Les femelles matures produisent des embryons ou microfilaires (L1) qui se trouvent dans la circulation sanguine ou au niveau de la peau. La transmission se fait par l'intermédiaire d'un vecteur arthropode hématophage qui ingère la microfilaire lors de son repas sanguin. Les microfilaires passent dans la cavité générale de ce vecteur où elles subissent deux mues pour devenir des larves infestantes L3. Lorsque le vecteur se nourrit du sang d'un hôte vertébré ces larves matures, situées dans les pièces buccales lui sont transmises. Dans l'hôte approprié les larves infestantes se développent en filaires adultes dont le cycle général évolutif est montré dans le schéma ci-après.



Dans 5 filaires humaines dont *Brugia malayi*, les microfilaires (1^{er} stade larvaire L1) apparaissent dans la circulation. Les vers adultes vivent dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques. Il existe peu d'informations sur la voie de migration de la larve infestante L3 et du 4^{ème} stade larvaire chez l'homme. Probablement plusieurs stades du cycle sont présents en même temps chez les individus qui habitent dans les zones endémiques. Il se peut que des microfilaires soient présentes dans d'autres organes (poumons, foie, rate, reins) surtout en cas d'infections sévères. (Grove 1981). Chez quelques espèces filariennes, on observe une fluctuation dans le nombre des microfilaires présentes dans la circulation selon un rythme prévisible sur une période de 24 h. Ce phénomène est connu sous le nom de périodicité circadienne (Anderson 1976). Les facteurs responsables de cette périodicité sont probablement physiologiques. Le relâchement de l'hôte pendant son sommeil serait responsable de la migration microfilarienne à la périphérie pendant la nuit, mais cette explication ne serait pas

applicable dans le cas des filarioses ne présentant pas de périodicité. Il a été avancé comme explication la possibilité d'une réponse des microfilaires à l'O₂ ou au CO₂, d'autres auteurs suggèrent qu'une adaptation de la microfilaire a lieu suivant les heures auxquelles le vecteur prend son repas sanguin.

Les filarioses sont des maladies chroniques qui ne mettent que rarement la vie du malade en danger, cependant *B. malayi* par exemple est redoutable dans la mesure où elle entraîne des lésions oculaires conduisant à la cécité, quant aux filarioses lymphatiques elles peuvent présenter dans certains cas des manifestations cliniques extrêmes d'éléphantiasis.

Plusieurs travaux ont été effectués dans le domaine de la filariose expérimentale des rongeurs. La découverte d'une remarquable susceptibilité des mérions à l'infection par *B. malayi* (Ash 1970-1973) a permis l'obtention de filaires humaines vivantes au laboratoire.

D'autre part, des rats et des souris dépourvus de thymus (génétiquement athymiques) sont susceptibles aux infections par les filaires, ce qui souligne l'importance des cellules T dans l'immunité contre les larve L3. De plus on observe une absence de microfilarémie ou de vers adultes associés à la présence d'IgE: ceci suggère la possibilité d'un rôle protecteur des IgE et l'intervention des lymphocytes T.

Des larves L3 cultivées en présence d'immun sérum meurent

sans changer de stade. L'immun sérum devient inefficace après chauffage à 56°C pendant 30 min, indiquant que les anticorps impliqués dirigés contre la larve infestante seraient de type IgM ou IgE (Haque 1982). D'autre part, la destruction des larves L3 de *D.viteae* par des éosinophiles et des macrophages est dépendante du complément (Haque 1982).

D'autres travaux montrent la destruction de la larve L3 de *B. malayi* *in vitro*, faisant intervenir des éosinophiles, des neutrophiles, et des IgG. (Mackenzie 1981). Différents auteurs ont observé une corrélation entre la disparition de la microfilarémie et l'apparition d'anticorps, aussi bien dans le cas des filarioses humaines qu'expérimentales.

Cycle expérimental de *B. malayi* :

le maintien au laboratoire de filaires *B. malayi* a été mis au point par Ash (1973).

L'hôte intermédiaire est le moustique *Aedes togoi* et l'hôte définitif est le rongeur *Mastomys natalensis* remplaçant l'homme, hôte définitif naturel. Au laboratoire, le cycle a été adapté aussi chez le rongeur *Meriones unguiculatus*, mais étant donné que chez ces animaux, les adultes ainsi que les microfilaires se logent dans la cavité péritonéale, ils sont surtout utilisés pour l'obtention de matériel parasitaire. Chez l'hôte définitif (*Mastomys*), les adultes se logent dans les voies lymphatiques.

L'élevage des moustiques se fait dans une pièce où l'humidité est maintenue constante. Les moustiques sont infestés en piquant le dos rasé des mastomys présentant une microfilariémie de 60-70 microfilaires/10 μ l de sang. La microfilariémie reste élevée pendant environ 400 jours.

Environ 3 jours après le repas sanguin des moustiques, les femelles pondent des oeufs qui donneront de nouveaux vecteurs. Les microfilaires ingérées par les moustiques lors de l'infestation, se transforment en larves infestantes L3 10 jours plus tard. A ce moment, les moustiques infestés sont placés dans une chambre froide à 4°C afin de les endormir, lavés dans l'alcool à 70 % puis dans du Hanks Wallace PS, ensuite écrasés et filtrés dans ce milieu, les larves L3 sont ainsi récupérées.

Les parasites sont comptés sous loupe binoculaire, 90 à 100 larves L3 sont injectées par voie sous cutanée à des mastomys. Environ 100 jours après l'infestation, les femelles deviennent matures, puis au bout de 3 mois la microfilariémie est observée dans la circulation sanguine, les microfilaires sont récupérées en saignant l'animal au niveau du sinus rétro-orbitaire, puis numérotées sur cellule de Nageote.

c) Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

Les mécanismes effecteurs vis-à-vis des helminthes sont essentiellement le fait de réactions de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Les réactions d'ADCC ont été mises en évidence dans de nombreux modèles, mais c'est dans la schistosomiase humaine ou expérimentale qu'elles ont été le mieux étudiées. Les réactions d'ADCC anti-parasitaire tirent leur originalité d'une part de la nature des cellules effectrices où les classiques cellules K ne semblent guère participer, mais où au contraire interviennent des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, éosinophiles neutrophiles ou plaquettes), d'autre part de la nature des anticorps armant la plupart de ces cellules effectrices, qui dans plusieurs modèles (schistosomes, filaires) sont paradoxalement des anticorps anaphylactiques .

1) Cytotoxicité IgE dépendante par des phagocytes mononucléés

Une cytotoxicité dépendante de monocytes ou de macrophages a été identifiée dans certaines filarioses ainsi que dans la schistosomiase. Des macrophages normaux, incubés avec du sérum de rat immun vis-à-vis des schistosomes, adhèrent fortement et

tuent *in vitro* les schistosomules de *S. mansoni* (Capron A. 1975, Joseph M. 1977).

La mise en évidence de la thermolabilité du facteur sérique, ainsi que l'adsorption sélective des IgE des sérums ont permis de montrer la coopération des macrophages avec des IgE spécifiques des schistosomes (Dessaint J.P. 1979). Différentes expériences d'inhibition ont permis d'écarter la participation d'autres isotypes comme les IgG ou les IgM. Ce mécanisme fait donc intervenir :

- La fixation des IgE à la membrane des macrophages, dans un récepteur spécifique pour cet isotype (Spiegelberg 1978) .
- Une activation du métabolisme cellulaire après contact avec les antigènes cibles .

En effet, c'est le contact des IgE, sous forme agrégée ou complexée à leur antigène, qui stimule les mécanismes cytotoxiques des phagocytes vis-à-vis des schistosomes . Bien que d'abord décrit chez le rat, ce mécanisme a pu être confirmé chez l'homme (Joseph M. 1978) .

2) Cytotoxicité des éosinophiles dépendante des Anticorps anaphylactiques:

Butterworth (1979) avait préalablement montré que des éosinophiles humains peuvent être cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules en présence d'anticorps spécifiques d'isotype non précisé et ceci en l'absence d'une source de complément .

Dans notre laboratoire, M. Capron (Capron M., Bazin H.1981) a mis en évidence des mécanismes de cytotoxicité par les éosinophiles chez le rat en identifiant une coopération avec les anticorps de classe IgG2a et IgE. Néanmoins, une coopération des éosinophiles avec les mastocytes est essentielle. En effet, bien que les mastocytes en eux mêmes soient incapables de tuer les larves, ils jouent le rôle de cellules accessoires dans la mesure où leurs produits de dégranulation exercent un effet stimulant sur les éosinophiles cytotoxiques. Parmi ces produits de dégranulation, les tétrapeptides à activité chimiotactique pour l'éosinophile (ECF-A) (Capron M. Capron A. 1981) semblent jouer un rôle important. Deux signaux sont donc nécessaires pour déclencher l'activation de la cellule :

- l'un par les produits de dégranulation mastocytaire stimulant l'expression des récepteurs membranaires ;
- l'autre, résultant de l'activation de la cellule lors de son interaction avec les anticorps anaphylactiques, via leurs récepteurs spécifiques.

3 Cytotoxicité IgE dépendante des plaquettes

Lorsque des plaquettes sont prélevées entre le 40^{ème} et 60^{ème} jour de l'infection du rat, elles sont capables de tuer des schistosomules *in vitro* alors que des plaquettes prélevées chez des rats sains ne sont pas cytotoxiques. D'autre part lorsque les plaquettes saines sont incubées avec des sérums prélevés à des animaux à la même période d'infection, elles deviennent cytotoxiques.

Le facteur humoral impliqué dans ce processus est thermolabile et retenu sur immunoabsorbant anti-IgE alors qu'il ne l'est pas sur anti-IgG. Ce qui indique, comme dans le cas des macrophages et des éosinophiles, que les plaquettes sanguines sont activées par un mécanisme dépendant des IgE, spécifiques d'antigènes cibles présents à la surface des schistosomules (Joseph M. 1983).

Cette observation a pu être reproduite dans un modèle humain puisqu'un sérum de patient bilharzien stimule des plaquettes d'un donneur sain et les rend cytotoxiques pour les schistosomules .

L'utilisation d'un anticorps monoclonal de rat, de classe IgE, spécifique de *S. mansoni* a permis de confirmer ces observations. En effet lorsque des plaquettes de rats sains sont

incubées avec cet anticorps, elles deviennent cytotoxiques pour la jeune larve de schistosome (Verwaerde C. 1987). Cet ensemble d'observations a permis de montrer pour la première fois à partir d'un modèle parasitaire :

- le rôle important que peuvent jouer les plaquettes sanguines dans la réponse immunitaire;
- la présence d'un récepteur pour les IgE sur leur membranes (Joseph M. 1986).

Récemment, l'activité cytotoxique IgE dépendante de plaquettes a été identifiée dans la filariose humaine et expérimentale. (Haque A. Joseph M. 1980).

4 Cytotoxicité anticorps dépendante par des neutrophiles

Quelques observations *in vitro* indiquent que les neutrophiles en présence d'anticorps et souvent de complément peuvent tuer des cibles parasitaires. Si dans la schistosomiase, leur participation semble modeste, dans certaines filarioses, les neutrophiles peuvent jouer un rôle effecteur. On signalera que dans ce cas ce sont des IgG qui semblent intervenir.

Ces mécanismes d'ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) constituent donc un apport majeur des mécanismes de défense vis-à-vis du parasite. Les cellules effectrices : macrophages, éosinophiles, plaquettes sanguines ont en commun un récepteur pour l'IgE : $Fc_{\epsilon}RII$ (Capron A. 1986). Cette deuxième classe de récepteur est différente du $Fc_{\epsilon}RI$ des mastocytes et des basophiles (Metzger 1983). Nous savons qu'au cours de la bilharziose il y a une augmentation très nette des IgE (en effet les IgE spécifiques peuvent atteindre 177 KIU/l à 1000 KIU/l) (Dessaint J.P. 1975). Sur le lymphocyte, le récepteur de type II apparaît comme un élément intervenant dans la régulation de la synthèse des IgE (Metzger 1986).

Que sait-on de la synthèse des IgE et de sa régulation ?

II LES IMMUNOGLOBULINES E (IgE)

1 Rôle de l'IgE et de son récepteur ($Fc_{\epsilon}RII$) dans la cytotoxicité

L'identification des réactions d'ADCC ont conduit à la démonstration, sur la surface de sous populations de monocytes

ou de macrophages, d'éosinophiles et de plaquettes, d'un récepteur pour les IgE d'une affinité de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M^{-1} selon la forme moléculaire du ligand (Dessaint J.P., 1979, Anderson C.L. 1981). Ce récepteur se combine à l'IgE avec une affinité moindre que celle du récepteur des mastocytes et basophiles, mais son affinité augmente si l'IgE est agrégée ou complexée ($K_a = 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ avec des dimères d'IgE pour les macrophages de rat) .

Un anti-sérum contre ce récepteur prévient la fixation de l'IgE aux cellules effectrices et inhibe significativement la cytotoxicité IgE-dépendante .

Chez le macrophage, la fixation de l'IgE complexée active la cellule par un mécanisme dépendant du calcium et du GMPc, les dimères d'IgE représentant un degré minimal d'agrégation nécessaire à la délivrance du signal d'activation. Cette activation macrophagique entraîne la sécrétion d'enzymes lysosomiales, de protéases neutres, d'ions superoxydes et de métabolites de l'acide arachidonique dont le leucotriène C4 et le PAF-acether. Si cette libération de médiateurs laisse supposer qu'une interaction IgE/ macrophage puisse jouer un rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate en dehors des modèles parasitaires, par contre la nature des facteurs macrophagiques impliqués dans la destruction des cibles parasitaires est encore mal connue . Au niveau ultra structural, on observe une perforation de la surface du parasite par les

macrophages, ainsi que des images de phagocytose du matériel parasitaire .

L'analyse de la cytotoxicité par les éosinophiles montre qu'elle procède par étapes successives où les effecteurs adhèrent réversiblement puis irréversiblement à la surface des parasites. Si cette adhérence peut être observée avec d'autres ligands, telle la Con A, les anticorps spécifiques sont indispensables pour l'étape finale où l'éosinophile dégranule et lyse le parasite. De nombreux médiateurs ont été incriminés dans cette cytotoxicité : protéine des granules (protéine basique majeure ou MBP, protéine cationiques ou ECP), ions superoxydes, peroxydase spécifique (EPO)... sans identification formelle d'un médiateur unique responsable de l'activité lytique. On notera, que dans certains systèmes, outre les anticorps, des facteurs du complément peuvent intervenir. Il existe une sélectivité des sécrétions IgE différente de celle des IgG.

Les anticorps dirigés contre le récepteur de type II sont des anticorps anaphylactiques. Un anticorps monoclonal nommé BB10 dirigé contre ce récepteur inhibe à la fois la cytotoxicité des éosinophiles hypodenses et des plaquettes sanguines. La structure du récepteur de l'éosinophile possède une identité antigénique avec celle des récepteurs du macrophage et de la plaquette dans la mesure où une analyse en SDS page révèle deux bandes majeures à 50 et 23 Kd. Des résultats en

immunoprécipitation et western blot montre que la molécule de 23 Kd est spécifique de l'anticorps monoclonal BB10. (Capron M.1986)

Le rôle des glycoprotéines membranaires de la plaquette mérite d'être souligné. Il a été montré que des plaquettes de patients thrombasthéniques auxquels il manque partiellement le complexe IIb/IIIa (type II), ou il manque totalement (type I), sont alors partiellement ou totalement incapables de se lier à l'IgE et n'ont plus de propriétés cytotoxiques (Ameisen J.C. 1986).

L'hypothèse d'une association stérique entre le complexe IIb/IIIa et le récepteur IgE indiquerait la possibilité pour les glycoprotéines IIb/IIIa d'agir comme switch à l'activation plaquettaire ou à sa déactivation; mais cela fait encore l'objet de recherches.

Le rôle du $Fc\gamma RII$ à la surface de ces cellules a été interprété comme un élément intervenant à la fois dans la synthèse d'IgE et dans la régulation de cette réponse IgE (Massicot 1986, Capron M. 1986). Il existe toute une série d'IgE-Binding factors, qui modulent la synthèse des IgE, l'expression des $Fc\gamma R$, et par là même l'activation cellulaire passant par le récepteur.

Comment s'établissent chez l'hôte, pour se protéger des parasites, la synthèse et le maintien d'un taux élevé de ces anticorps anaphylactiques dans les sérums ?

2 Biosynthèse des IgE et leur régulation

Les cellules B qui donneront des plasmocytes à IgE proviennent de la différenciation de cellules qui à l'origine ont des IgM de membrane . Si on injecte des anti- μ à un rat, on supprime la réponse IgE (Urban , Ishizaka 1977). Les cellules expriment ensuite simultanément des IgM et des IgD de membrane. Puis elles perdent les IgM et les IgD et deviennent des cellules B ϵ capables de se différencier pour synthétiser des IgE . Cette transformation est dépendante de cellules T amplificatrices ou helpers (Th) et, est contrôlée par des cellules T suppressives (Ts). La régulation de la réponse IgE est pour une part sous la dépendance des lymphocytes T ; c'est la différenciation des lymphocytes B μ en lymphocytes B.

En revanche, la différenciation des lymphocytes B μ en lymphocytes B ϵ est elle thymoindépendante.

Régulation de la différenciation des lymphocytes B μ en lymphocytes B μ ϵ

Ce sont les Lymphocytes B portant des IgE de membrane qui synthétisent un facteur indispensable : l'IgE-B cell generating factor (facteur augmentant le nombre de lymphocytes B portant des IgE de membrane à partir de cellules B μ δ) (Urban J.F. 1978). Il a été montré qu'un anti δ ou un anti ϵ sont aussi capables d'induire la synthèse d'IgE BCGF. Ceci est thymoindépendant.

Régulation de la différenciation des lymphocytes B μ ϵ en cellules B sécrétant des IgE

La différenciation des lymphocytes B μ ϵ en lymphocytes B synthétisant les IgE est sous la dépendance de Lymphocytes Th et Ts. On distingue 3 niveaux de contrôle cellulaire dans la réponse IgE :

- Des cellules T non spécifiques de l'antigène, préexistantes à l'immunisation, inhibent spécifiquement la réponse IgE. Elles sont en partie responsables du caractère mauvais répondeur de certaines souches.
- des cellules Th et Ts stimulées directement ou indirectement

par l'antigène. Ces cellules ont été mises en évidence par les travaux de Katz (1980).

- des cellules Th et Ts sélectives de l'IgE, Stimulées par l'antigène et spécifique de l'antigène. L'existence de telles cellules a été montrée par Tada (1981).

Facteurs solubles mis en évidence par Ishizaka :

Des cellules de ganglions mésentériques de rats infectés par *Nippostrongylus brasiliensis*, mises en culture, sécrètent deux facteurs capables de se lier aux IgE : les IgE - Binding Factor (IgE-BF) dont la nature varie avec la quantité de Con A ajoutée au milieu. Si on ajoute 10 µg de Con A on obtient un facteur capable de potentialiser une réponse IgE : l'IgE potentiating factor (IgE PF), au contraire avec 1 µg de Con A, on obtient un facteur qui inhibe la synthèse d'IgE : l'IgE suppressive factor (IgE-SF). Dans les 2 cas la présence d'IgE dans la culture est indispensable (Yodoi J. Ishizaka K. 1980) (Hirashima M. 1980).

Propriétés et origine de l'IgE potentiating factor :

C'est une molécule de 10 à 15 Kd. Elle se lie spécifiquement aux lymphocytes portant des IgM et IgE de

membrane (lymphocytes B μ ζ) et amorce leur différenciation en lymphocytes B. Ce facteur n'a pas d'affinité pour les autres lymphocytes B. Il se lie aux lectines, principalement à la Con. A, à la lectine de lentille (LM). Ce facteur se lie à l'IgE par une partie protéique et la partie carbohydrate est nécessaire pour son activité. En utilisant la tunicamycine avec 10 μ g de Con A et de l'IgE, on obtient un IgE-BF qui inhibe la réponse IgE. Ceci indique que la N- glycosylation des IgE-BF est indispensable, pendant leur biosynthèse pour leur activité potentiatrice. C'est une protéine O et N-glycosylée et la présence de ces deux oligosaccharides est indispensable à son activité biologique (Yodoi J. 1982).

Ce facteur est sécrété par un lymphocyte W3/25⁺ (marqueur des lymphocytes Th chez le rat) portant un récepteur pour les IgE : Fc ζ R⁺. Sa production se ferait par la libération du Fc ζ R (Yodoi J 1980). Ceci a été confirmé en utilisant un anticorps polyclonal anti-IgE-BF qui reconnaît aussi l'IgE-SF, et les Fc ζ R des lymphocytes B et des lymphocytes T (Huff T.F. 1984). Si on fait agir l'anti-IgE-BF on a une induction de la synthèse d'IgE-BF montrant bien que le signal d'activation du lymphocyte passe par le récepteur.

Propriétés et origine de l'IgE-suppressive Factor

Ses propriétés vis-à-vis des Lymphocytes B sont les mêmes que celles de l'IgE-BF. Il est composé de glycoprotéines renfermant des structures O-oligosaccharidiques (Suemura M. 1980). Il possède une forte affinité pour l'agglutinine d'arachide (PNA) dont le ligand caractéristique est de type B gal(1-3)~~2~~ gal Nac (Yodoi J. 1981). Il n'a pas d'affinité pour la LM. Sa structure est modifiée par la tunicamycine, par contre ni son affinité pour la PNA, ni son activité biologique ne sont modifiées, si on ajoute une substance augmentant la glycosylation; le GEF (glycosylation enhancing factor), on obtient de l'IgE potentiating factor .

La différence d'activité biologique entre les deux IgE-BF est due à une différence de glycosylation d'un même précurseur conditionnant également l'expression du $Fc\epsilon R$. De fait, L'IgE-PF, l'IgE-SF et les $Fc\epsilon R$ des Lymphocytes possèdent un épitope commun (Iwaka M. 1983).

Régulation de la production des IgE Binding Factors

1 le GIF (glycosylation inhibitory factor)

Si on injecte de l'adjuvant complet de Freund à un rat, une

sous population de Lymphocytes T sécrète un facteur capable d'inhiber la glycosylation des IgE-BF, ainsi que l'expression des $Fc\epsilon R$. Ce facteur se lie de façon spécifique à des anticorps monoclonaux dirigés contre la lipomoduline, un inhibiteur protéique de la phospholipase A2.

La lipomoduline ou macrocortine extraite de neutrophiles de lapins traités par des glucocorticoïdes a les mêmes effets que le GIF (Uede T. 1983). Ceci est à rapprocher des effets thérapeutiques des corticoïdes qui en plus de leurs effets anti-inflammatoires abaissent le taux des IgE chez les patients.

Le GIF est sécrété par les Lymphocytes T portant des marqueurs CD8 (marqueur des Lymphocytes Ts et des CTL, lymphocytes cytotoxiques) et qui sont $Fc\epsilon R^-$. Pour avoir une synthèse de GIF, il faut préalablement avoir une présentation de l'antigène par une cellule accessoire.

2 Le GEF (glycosylation enhancing factor)

La stimulation de Lymphocytes T spléniques de rats par du pertussigène (antigène extrait de *Bordetella pertussis*), entraîne le relargage dans le milieu d'un facteur soluble qui augmente la glycosylation des IgE-BF pendant leur biosynthèse : le GEF. C'est une enzyme kallikréine-like. En effet, la kallikréine et la bradykinine augmentent la glycosylation des IgE-BF. Comme la bradykinine augmente l'activité phospholipase

dans de nombreuses cellules, on peut penser que le GEF augmente la glycosylation par une activité phospholipasique (Iwaka M. 1983).

Le GEF est synthétisé par des cellules W3/25⁺ qui ont un récepteur pour les IgG (Iwaka M. 1983). La glycosylation est contrôlée par l'équilibre entre les facteurs antagonistes GIF et GEF. En l'absence de toute stimulation antigénique, on a la même quantité d'IgE-PF et d'IgE-SF, d'où une stabilité de la quantité des IgE produites. On attribue à la perturbation de cette homéostasie l'hyperproduction d'IgE dans l'allergie (allergic breakthrough) (Katz 1979).

Action des macrophages sur les IgE-BF

Des sérums de rats obtenus entre 8 et 18 h après une injection intrapéritonéale (I.P.) de l'acide polyinosinique polycytidylique (poly I:C) contient de l'IgE binding factor; le poly I:C est un inducteur classique de la synthèse de l'interféron.

L' INF γ de souris est capable d'induire la formation de l'IgE-BF chez des cellules de ganglions mésentériques (Yodoi J. 1981).

Action des adjuvants sur les IgE-BF

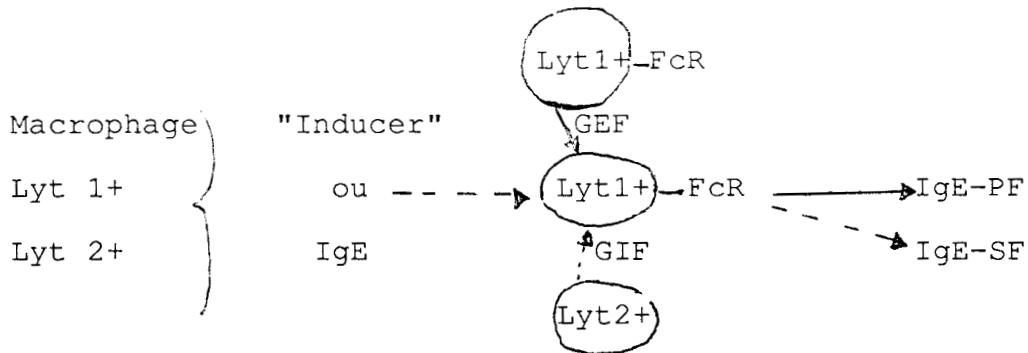
Les bons adjuvants de la réponse IgG ou de l'hypersensibilité retardée, comme l'adjuvant complet de Freund (ACF) n'ont aucun effet amplificateur sur la réponse IgE . Pour celle-ci, il faut utiliser l'hydroxyde d'alumine (Al(OH)_3) ou alun, *Bordetella pertussis* (BP) ou son dérivé le pertussigène (LPR), ou bien HgCl_2 .

En présence de BP : une sous population de Lymphocytes T péritonéaux de rats, relargue de l'IgE-PF (Hirashima M 1981).

Avec l'ACF : des Lymphocytes spléniques de rats relarguent de l'IgE-SF (Hirashima M. 1980); en fait, l'ACF active le macrophage qui va ensuite stimuler la formation d' IgE-BF. Il active simultanément le GIF (Hirashima M. 1981). Chez l'homme; les Lymphocytes T normaux qui prolifèrent en présence d'interleukine 2 (IL 2), forment des IgE potentiating factors, quand ils sont incubés avec des IgE humaines. Ces IgE-BF ont une affinité pour la Con A (Ishizaka K. 1981).

En résumé:

Par l'intermédiaire des IgE-BF, on a une modulation de la synthèse des IgE via une glycosylation soumise à une induction par l'antigène et par l'IgE elle-même .



GEF : activité protéasique

GIF : lipomoduline

(Ishizaka K.1987)

Les facteurs mis en évidence par Katz et collaborateurs

En 1979, Katz et coll. décrivaient deux facteurs protéiques agissant sur la réponse IgE :

- Le SFA (facteur supprimant l'allergie, suppressive factor of allergy) d'une MM de 30 Kd et ayant des déterminants de la $\beta 2$ microglobuline .

- L'EFA (facteur augmentant l'allergie, enhancing factor of allergy) d'une MM de 15 Kd (Katz 1979) .

Ces facteurs ne sont ni des anticorps, ni des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité et ils sont incapables de se lier aux IgE .

Le SFA et l'EFA inhibent l'induction des $Fc\epsilon R$ des lymphocytes (Katz 1984). Katz a montré dans des cultures de cellules lymphoïdes de souris en présence d'IgE, une

augmentation des cellules $\text{Fc}\epsilon\text{R}^+$ et la synthèse de molécules de plusieurs types appelées EIR (IgE induced regulant) capables de moduler l'expression des $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ sur les autres cellules lymphoïdes.

Le SFA agit aussi sur des Lymphocytes T lyt1^+ qui à leur tour vont synthétiser le SEM (Suppressive Effector Molecule) . Le SEM inhibe l'expression des $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ sur les Lymphocytes B et supprime la synthèse d'IgE à la fois dans le modèle *in vivo* chez la souris et *in vitro* chez l'homme. D'autre part l'EFA stimule des Lymphocytes T lyt2^+ , $\text{Fc}\epsilon\text{R}^+$ qui sécrète l'EEM (enhancing effector molecule) qui comme le SEM inhibe l'expression des $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ mais qui, par contre, augmente la synthèse des IgE par les Lymphocytes B en présence d'IgE .

Facteurs de Kishimoto

Chez l'homme *in vitro* la culture de lymphocytes humains périphériques avec du pokeweed mitogène (PWM) et du Cowan1 (staphylococcus aureus de souche Cowan1), conduit à une forte synthèse d'IgE, d'IgM et d'IgG. Des Lymphocytes T provenant de patients atteints de tuberculose pulmonaire et incubés avec du PPD (purified protein derivative) et de l'IgE pendant 5 jours inhibent la réponse IgE polyclonale induite par le PWM et le Cowan1 . Le facteur inhibiteur spécifique de la réponse IgE peut être absorbé sur des colonnes IgE et élué en tampon acide. On a

donc un IgE- BF à effet supprimeur sur la réponse IgE humaine (De Guchi 1983).

Les facteurs de Watanabe

Un facteur supprimeur de la réponse IgE préexistant à toute immunisation a été mis en évidence chez des souris mauvaises productrices d'IgE. Ce facteur "IgE specific suppressor" est sensible à l'irradiation, il serait sous le contrôle du CMH et en partie responsable du caractère mauvais répondeur (Watanabe 1977).

La réponse IgE est soumise à de nombreuses régulations qui ont en commun la libération de facteurs solubles non spécifiques de l'antigène et sélectifs de cette réponse. Un premier niveau est représenté par des cellules T suppressives non spécifiques et préexistantes à l'immunisation. Ces facteurs sont décrits par Katz et Watanabe et seraient à l'origine du taux faible d'IgE présent dans le sérum de sujets normaux. Un deuxième niveau est représenté par des cellules activées par et spécifiques de l'antigène libérant des facteurs sélectifs de la réponse IgE. Ce sont les facteurs décrits par Ishizaka et Kishimoto. Ces facteurs IgE spécifiques assurent un contrôle isotypique de la réponse IgE superposée au schéma classique de la coopération cellulaire par des facteurs antigènes spécifiques.

La synthèse des IgE-BF est sous la dépendance de facteurs cellulaires T (GIF, GEF, autres facteurs), ils sont donc primordiaux dans la synthèse d'IgE. Par ailleurs on peut penser, qu'ils ont un rôle immunomodulateur. En effet, Des travaux récents montrent l'existence de sous populations de lymphocytes T helper qui produisent différentes lymphokines; par exemple IL4 (BSF-1) augmente *in vitro* la production d'IgE et d'IgG1 par des cellules B de souris, activées par le lipopolysaccharide, de plus elle augmente la synthèse d'IgE *in vivo* . En conséquence ces différents facteurs, peuvent eux aussi stimuler la synthèse d'IgE et avoir un rôle éventuel dans l'immunomodulation.

B) PARTICIPATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES DANS L'ALLERGIE ET L'INFLAMMATION.

Toute une série de nouveaux concepts au cours des dernières années met en avant le rôle primordial de l'interaction IgE/ cellules inflammatoires liée aux récepteurs spécifiques de l'IgE sur ces cellules.

I CELLULES DE L'INFLAMMATION.

Dans les maladies allergiques humaines les Fc ϵ R II peuvent être activés par de l'anti-IgE ou l'allergène et jouent un rôle dans l'initiation et la modulation de la réponse pro-inflammatoire dans les maladies d'hypersensibilité telles que l'asthme allergique et les réactions systémiques d'anaphylaxie au venin d'hyménoptère par exemple. Les récepteurs pour l'IgE sont présents à moins de 20 % sur les plaquettes de sujets normaux, ce pourcentage atteint 60 % dans le cas de patients bilharziens ou filariens et 40 à 50 % chez les sujets allergiques. Cela met en évidence l'existence de sous populations plaquettaires. Jusqu'alors la structure membranaire de la plaquette mettait en avant l'existence de glycoprotéines IIb/IIIa chez les sujets normaux. Avec l'expression des récepteurs pour l'IgE, l'existence de nouvelles propriétés différentes de celles connues jusqu'alors dans l'hémostase, la question est de déterminer si l'action cytotoxique des plaquettes vis-à-vis des helminthes est due uniquement aux plaquettes IgE positives. Dans ce contexte le transfert passif de plaquettes de rat immun à *S. mansoni* à des animaux sains leur confèrent après infection par les parasites un haut degré de protection. En effet lorsqu'on injecte $1,4 \cdot 10^9$ plaquettes de rat immun en I.V. à des animaux "récepteurs" une heure avant l'infestation, ce qui représente 25 % des plaquettes

totales du rat, on observe une destruction des parasites. Mais on ne sait pas encore s'il s'agit de l'action unique des plaquettes ou du déclenchement d'autres populations cellulaires..

Le transfert de plaquettes immunes marquées à l'indium pourrait fournir des informations sur ce point. Les divers signaux qui induisent la génération de fonctions cytotoxiques des plaquettes sont principalement des médiateurs solubles capables de tuer la larve par contact direct, comme démontré par la séparation des cellules effectrices et des cibles à l'aide de filtres. (Joseph 1984).

D'autre part il a été démontré que la C-réactive protéine de plaquettes provenant de sujets allergiques, est directement stimulée dans la sécrétion de produits cytotoxiques.

Par ailleurs des plaquettes de sujets présentant un asthme à l'aspirine (plaquettes ASA) peuvent elles aussi induire des médiateurs cytocides par simple addition d'aspirine ou de drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes (Ameisen J.C. 1985, 1986) .

Ces différents signaux ne sont pas à l'origine d' un modèle unique d'émission de composés solubles toxiques. Par exemple, l'IgE/allergène ou IgE/anti-IgE stimulent la production de métabolites de l'oxygène quantifiés par chimioluminescence, alors que la CRP est inactive. De la même façon l'aspirine induit de la chimioluminescence par des plaquettes sensibles à l'aspirine (ASA). Cependant la catalase inhibe à la fois la

production de métabolites de l'oxygène et les propriétés cytotoxiques des plaquettes stimulées par l'IgE. Pour les plaquettes ASA la catalase inhibe seulement la chimioluminescence et pas la cytotoxicité. D'autres divergences entre les propriétés cytocides des plaquettes stimulées par l'IgE ou par l'aspirine concernent leur rapport avec les métabolites de l'acide arachidonique dans la voie de la lipoxgénase. En effet des inhibiteurs de cette enzyme (ETYA, NDGA, esculetin) bloquent la stimulation aspirine plaquettes ASA mais pas la cytotoxicité des plaquettes stimulées par l'IgE.

Parmi ces différents médiateurs cytotoxiques, les protéines cationiques pourraient être écartées de l'activation IgE dépendante, au moins en tant que facteur essentiel, car chez les sujets atteints de syndrome de plaquettes grises (absence de granules α contenant cette protéine), leurs plaquettes sont aussi capables de tuer des schistosomules que des plaquettes ne présentant pas ce déficit .

Tout ceci met en évidence l'implication des plaquettes dans les réactions inflammatoires immunes .

Dans ce contexte la plaquette apparaît comme une cellule sécrétoire dans l'allergie ou dans les processus inflammatoires, et nous sommes encore loin de comprendre les mécanismes intervenant dans les troubles immunopathologiques ou dans l'allergie .

L'intervention des plaquettes avec d'autres leucocytes portant un $Fc_{\gamma}RII$, comme cible des médiateurs leucocytaires tel que le PAF-acether élargit le concept de ces éléments sanguins. dans leur participation directe de situations immunologiques où l'IgE intervient. Par ailleurs, si l'on considère les plaquettes comme productrices ou effectrices de la régulation moléculaire, elles jouent alors un rôle primordial dans les helminthiases ou dans les maladies allergiques.

Les macrophages alvéolaires normaux incubés soit avec de l'IgE myelomateuse et de l'anti-IgE, ou avec du sérum de sujet atopique et de l'allergène correspondant induisent un relargage de β -glucuronidase et de protéases neutres. Ils produisent des PGE_2 , des thromboxanes A_2 , et de nombreux dérivés de la voie de la lipoxgénase. Les macrophages alvéolaires de patients asthmatiques sont capables de sécréter du PAF-acether après incubation avec de l'anti-IgE ou des allergènes spécifiques. Ils pourraient donc être source de médiateurs variés qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire durant l'asthme allergique. (Tonnel A.B. 1986).

II L'INFLAMMATION.

L'inflammation peut se définir comme "une séquence d'évènements salutaires pour lutter contre certaines agressions

de l'organisme" (Hurley 1983). A cette définition il faut garder l'idée principale d'une réponse "utile" à la restauration plus, ou moins complète des tissus lésés de l'hôte par un organisme parasitaire infestant par exemple .

La raison première du déclenchement d'une réaction inflammatoire immune ou non immune, consiste en la rupture d'équilibres physiologiques cellulaires et/ou moléculaires apportés par le pathogène. La phase d'initiation ne débute donc pas seulement avec la survenue d'un conflit entre le soi et le non soi, mais dans toutes conditions où intervient un changement extravasculaire ou intravasculaire dans les interactions normales préexistantes.

Dès l'apparition du traumatisme initial, les réactions d'activations vont se développer simultanément à un rythme explosif pendant une période brève : molécules et cellules vont passer de l'état inactif ou quiescent à l'état activé. Puis, les premières réponses immunitaires vont s'installer, et le parasite va lui même moduler ces réponses.

Nous nous intéresserons, dans cette seconde partie, aux messagers intercellulaires et aux médiateurs de la réaction, immune et inflammatoire, et d'autre part à l'interaction des macrophages et des plaquettes dans cette réaction.

Messagers chimiques et médiateurs de l'inflammation

a Facteurs de la réaction inflammatoire

L'activation de la voie classique du complément résulte de stimuli immuns et non immuns . Elle aboutit d'une part à une action cytotoxique, et d'autre part à la diffusion d'un grand nombre de fragments peptidiques qui sont pour la plupart de puissants phlogogènes. Leurs effets biologiques sont donc cruciaux dans la phase d'amplification de la réaction inflammatoire, et leur potentiel d'action si intense qu'ils impliquent l'existence de mécanismes de régulation également efficace.

L'activation de réactions inflammatoires entraîne l'apparition de molécules telles que l'histamine et le PAF-acether, issues des plaquettes et des mastocytes, des peptides actifs dérivés du complément (C2K, C3a, C4a, C5a, C3B) ou encore la kallikréine, la CRP ... Ce sont ces premières molécules qui vont être en quelques minutes à l'origine d'une amplification considérable des phénomènes inflammatoires .

Selon la nature des stimuli, on peut observer un recrutement prépondérant de tel ou tel type cellulaire; les antigènes parasitaires et les allergènes par exemple, vont induire un recrutement très riche en polynucléaires éosinophiles, macrophages, mastocytes ... selon la pathologie.

Le chimiotactisme qui correspond à la capacité des cellules de se déplacer sous l'influence de substances qui les attirent, est une propriété qui est partagée par l'ensemble des cellules de l'inflammation .

La sensibilité des cellules à des gradients de concentration est telle que des différences de 1 % entre les deux pôles cellulaires sont efficaces. Ces résultats sont en faveur de l'existence de récepteurs membranaires pour les facteurs du chimiotactisme. Par exemple l'ECF (eosinophil chemotactic factor) d'origine mastocytaire ou lymphocytaire

permet aux éosinophiles d'infiltrer les foyers inflammatoires d'étiologies parasitaires ou allergiques.

L'acide monohydroxy-icosatétranoïque (5 HETE), les leucotriènes LTB_4 , ainsi que le PAF-acether sont des facteurs chimiotactiques de faibles poids moléculaires intervenant au cours des réactions inflammatoires.

La transduction des signaux membranaires s'effectue par l'intermédiaire des facteurs chimiotactiques mais aussi par des opsonines, et va conduire à l'activation des cellules.

Chez l'homme, deux protéines de la réaction inflammatoire ne sont pas des glycoprotéines. Il s'agit de la protéine C réactive (CRP) et de la protéine sérique amyloïde A (SAA). Ces protéines ont des particularités intéressantes car d'une part, elles n'existent normalement qu'à l'état de trace dans le plasma, et présentent une cinétique très rapide de l'évolution de leur concentration plasmatique lors d'une réaction inflammatoire. Nous ne nous intéresserons qu'à la CRP dans la mesure où elle active les mécanismes effecteurs au cours de la schistosomiase.

La CRP

Outre son rôle d'opsonine bien établi, elle apparaît dès les premières heures de l'inflammation, et est capable de se

lier en présence de calcium aux phospholipides du pathogène . Ces liaisons "CRP-agent pathogène" s'accompagnent d'une transformation après laquelle le complexe admet deux destinées :

- soit, et principalement, la CRP complexée active la voie classique du complément pour finalement former un complexe ternaire "particule-CRP-C3b" qui gagne la membrane du macrophage,

- soit, le complexe binaire "particule-CRP" se fixe sur le récepteur Fc des macrophages, comme le complexe Ag/Ac, en raison des analogies structurales qui existent entre CRP et immunoglobulines .

Par ailleurs, cette molécule de l'inflammation exerce une activation des mécanismes effecteurs dans la bilharziose . En effet, Bout (1986) a montré que la cytotoxicité plaquettaire était induite par la CRP; des rats infectés par le parasite *S.mansoni*, ont une concentration de CRP dans leur sérum qui augmente après l'infestation stade poumon, et cela de façon beaucoup plus marquée qu'au moment de l'expulsion terminale des vers. Des plaquettes de rats sains, en présence de sérum de rats prélevés à la phase précoce (13 à 31 jours de l'infection) ont un pic de cytotoxicité plaquettaire aussi élevé que celles de plaquettes de rat immun. Cela corrèle avec la concentration élevée de CRP pendant cette phase précoce et implique l'action

cytocide des plaquettes grâce à la CRP, alors que des IgE rendent les plaquettes cytotoxiques au cours de la phase tardive de l'infection. D'autre part des plaquettes normales de rats ou d'hommes, traitées avec de la CRP purifiée, sont capables de tuer *in vitro* les larves de schistosomes. Les plaquettes traitées à la CRP sont en outre capables de conférer une protection significative contre la schistosomiase au cours d'expériences de transferts passifs. L'ensemble de ces résultats indique que le système qui comprend à la fois la CRP et les plaquettes participe à la résistance naturelle des rats contre l'infection par *S. mansoni*. De plus des molécules contenant de la phosphocholine ont été identifiées à la surface du schistosomule, et sont capables de se lier à la CRP.

L'interleukine 1

La réponse systémique d'une réaction inflammatoire comprend en plus de la fièvre et la douleur, une hyperleucocytose et une augmentation importante de la concentration plasmatique de certaines protéines appelées "protéines de la réaction inflammatoire".

De nombreux arguments conduisent à attribuer l'ensemble de cette réponse à une seule protéine appelée interleukine 1 (IL1) sécrétée par les macrophages activés. Cette monokine constitue

le message métabolique fondamental adressé par le foyer inflammatoire au foie, à l'hypothalamus, à la moëlle osseuse, aux lymphocytes T et aux fibroblastes. L'IL1 est une protéine dont la demi-vie est brève (de l'ordre de 10 min). Elle exerce à la fois plusieurs fonctions sur différents types de cellules. On s'aperçoit aujourd'hui que diverses activités que l'on avait attribuées à des facteurs différents relèvent en fait d'une seule et même lymphokine. Ainsi les IL1 recouvrent l'activité des facteurs LAF (lymphocyte Activating Factor), BAF (B cell Activating Factor), MP (Mitogenic protein), EP (Endogenous Pyrogen) (Congrès international d'immunologie Toronto 1986).

Inversement, plusieurs molécules différentes, mais possédant toutefois un certain niveau d'homologie, présentent la même activité, on a ainsi identifié trois IL1.

La fièvre, signal cardinal de l'inflammation, semble être le résultat de l'action de l'IL1 au niveau de récepteurs situés dans le noyau préoptique de l'hypothalamus antérieur. Présente dans le plasma l'IL1 est incapable de passer la barrière hémato-méningée : l'IL1 induirait au niveau des capillaires et des artérioles cérébraux une production de PGE_1 et de PGE_2 .

Après leur passage dans le liquide céphalorachidien, ces, prostaglandines agiraient sur les centres thermorégulateurs.

Avec le fragment C3b l'IL1 est responsable de l'hyperleucocytose accompagnant de nombreuses réactions inflammatoires. Elle agirait en libérant de la moëlle osseuse un pool de polynucléaires neutrophiles préexistants, qui par libération de lactoferrine au niveau du foyer inflammatoire, déterminerait une hyposidérémie.

L'IL1 stimule la production de la collagénase et des prostaglandines des cellules synoviales, en particulier les PGE₂.

En favorisant la prolifération fibroblastique, l'IL1 prépare la phase de restauration cellulaire.

Les fonctions immunorégulatrices de l'IL1 jouent un rôle majeur dans l'activation des lymphocytes au cours des réactions inflammatoires immunes. Ses principaux effets connus sur les lymphocytes T et B sont :

- L'induction de la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T périphériques,
- L'accroissement du nombre de lymphocytes T cytotoxiques,
- La stimulation de la libération par les lymphocytes T activés du T cell growth factor encore appelé IL2. Cette lymphokine (IL2) qui stimule à son tour les macrophages entraîne ainsi, l'autoentretien de l'activation des lymphocytes T, et l'augmentation de la production d'anticorps par les lymphocytes B (Schéma 1).

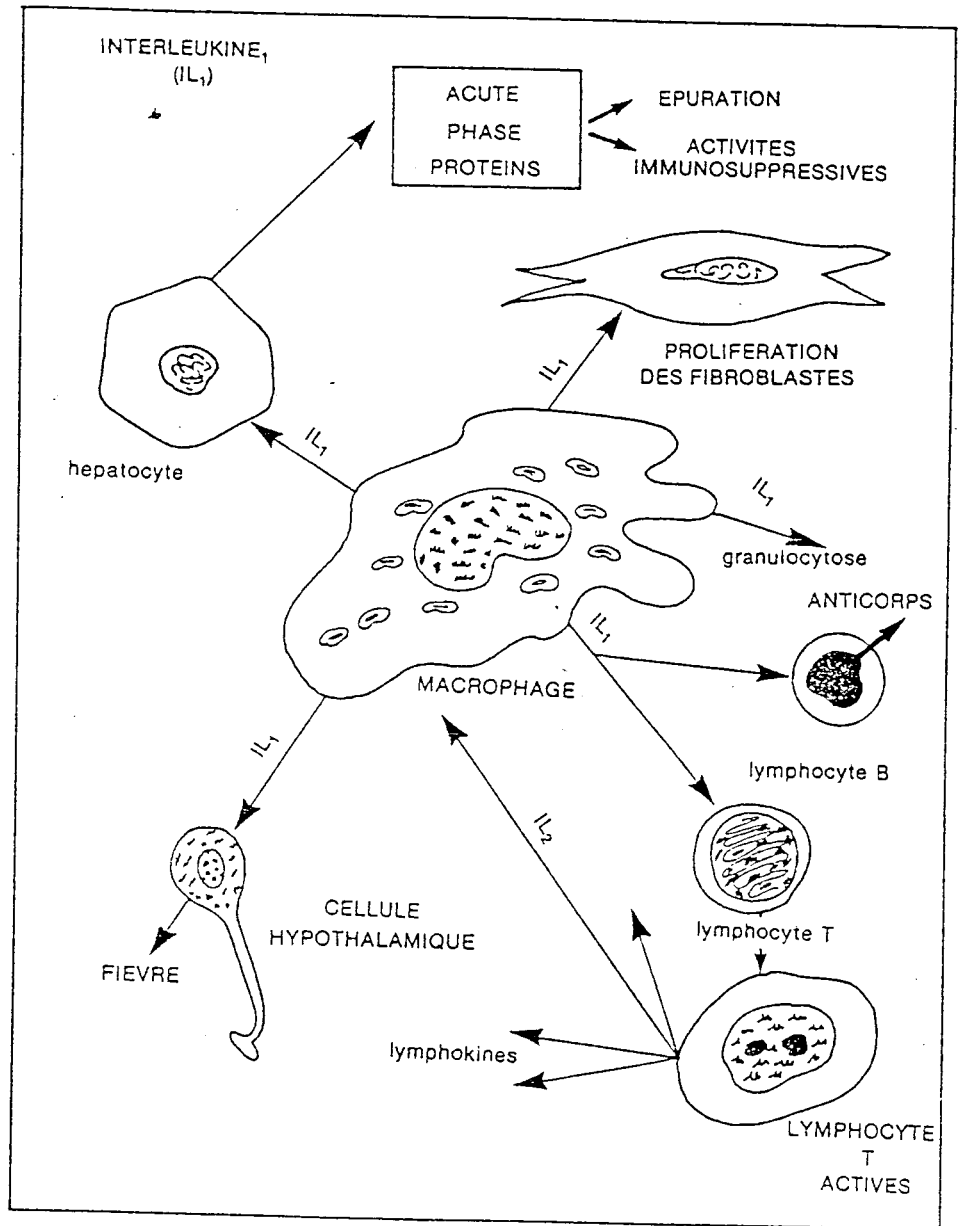


Schéma représentant l'origine cellulaire de l'IL₁ et les principales cellules cibles de cette monokine.

L'interleukine 2

L'IL2 a tout d'abord été identifié comme facteur de croissance des cellules T (TCGF pour T cell growth factor), car elle est capable de maintenir la prolifération continue des lymphocytes T activés. Très vite il est apparu que l'IL2 joue un rôle clé dans l'induction des réponses immunologiques T dépendantes. Elle a un rôle direct ou indirect sur la prolifération et la différenciation de différents types de cellules :

- elle agit comme facteur de croissance pour les cellules NK,
- elle stimule *in vitro* la prolifération et la différenciation des lymphocytes B activés par l'antigène,
- elle transforme les cellules précurseurs lymphoïdes inactives en cellules tueuses actives (LAK = lymphokine activated killer cells), capables d'induire certaines cellules tumorales,
- elle induit la production d'autres lymphokines par les lymphocytes T. L'interféron γ sécrété par les lymphocytes T exerce à son tour différentes fonctions sur différentes cellules : il active les cellules NK et les macrophages. Ces derniers se mettent à sécréter du TNF .

Au cours de la réaction inflammatoire l'IL2 agit sur les lymphocytes T qui ont acquis un récepteur pour elle (récepteur Tac ,Smith 1987), lors de leur sensibilisation par l'antigène : elle induit alors leur prolifération. Elle n'agit donc pas

directement sur les lymphocytes T helpers ou cytotoxiques.

Intervention de l'IL1 et de l'IL2 au cours de la schistosomiase

Ces lymphokines interviennent normalement dans la coopération cellulaire pour l'induction des CTL, or dans la schistosomiase il existe des cellules suppressives des CTL, appelées cellules veto qui bloquent leur activité cytolytique. (Mazingue C. 1987)

En revanche l'IL1 sécrétée par les macrophages activés va induire l'induction et la prolifération des T helpers qui produiront de l'INF γ qui stimulera l'activité TNF (Tumor Necrosis Factor) (produit également par les macrophages activés). Le TNF va activer les éosinophiles et participer à la réponse de l'organisme à l'infection parasitaire.

L'antigène est capté par les macrophages qui présentent cet antigène aux lymphocytes. Ces macrophages sécrètent alors de l'IL1.

Les lymphocytes T reconnaissent à la fois l'antigène étranger et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (de classe II) présents à la surface des macrophages et activés par l'IL1. Ils se mettent à se différencier. Certains (essentiellement les lymphocytes T

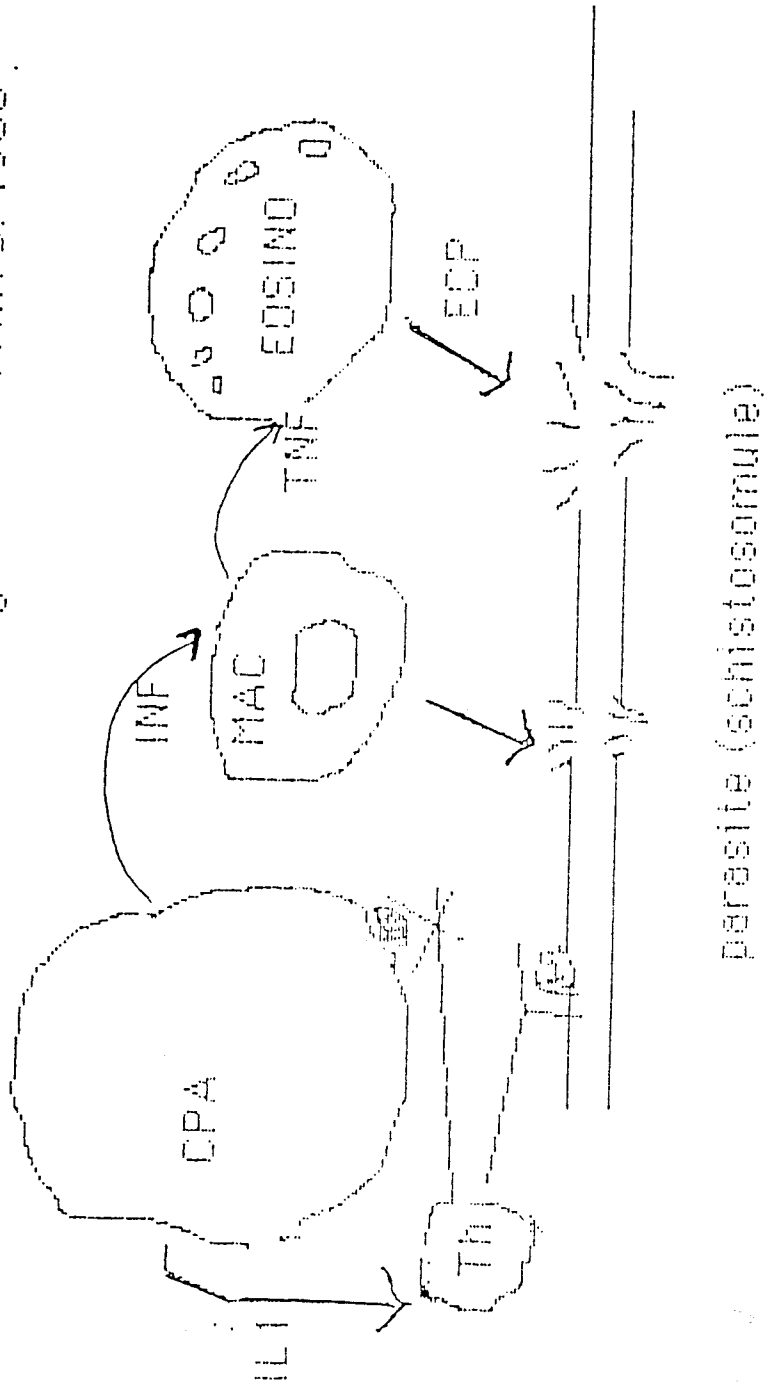
helpers) se mettent à produire de l'IL2 et à exprimer les récepteurs spécifiques de l'IL2, alors que d'autres expriment les récepteurs mais ne produisent pas d'IL2 (CTL).

La production d'IL2 entraîne la prolifération des lymphocytes T spécifiquement dirigés contre l'antigène et maintient leur état d'activation. Elle conduit également à la prolifération des lymphocytes B. Sous l'action de l'IL2, des lymphocytes T auxiliaires activés vont à leur tour sécréter d'autres lymphokines :

- des facteurs induisant la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (BCGF et BCDF)
- des facteurs actifs sur les macrophages comme le MIF ou le MAF (Macrophage Inhibiting Factor, and Activating Factor),
- de la lymphotoxine (Tumor Necrosis Factor)
- de l'interféron

Il est à remarquer que plusieurs études ont montré que le sérum contenant du TNF aurait une action anti-parasitaire et que l'administration d'IL2 pourrait corriger le déficit immunologique induit par les maladies parasitaires. La démonstration la plus frappante a été apportée dans le cas de la bilharziose, où on a pu décrire l'action en cascade des lymphokines (Schéma 2).

"Lymphokines the new super drugs" PLAYFAIR J. 1986



SCHEMA 2

Les autres lymphokines

IL3

Elle a tout d'abord été identifiée comme un facteur capable de maintenir indéfiniment en culture les cellules myéloïdes (granulocytes, macrophages) et les mastocytes d'origine murine. Puis il est apparu qu'elle est également capable de promouvoir la croissance de nombreuses lignées cellulaires, comme les cellules souches pluripotentes de la moëlle osseuse et les cellules de la lignée erythrocytaire .

L'IL3 est sécrétée par les lymphocytes T activés par l'antigène ou par un mitogène. On ignore encore si une seule sous population, ou au contraire toutes les différentes classes de lymphocytes T sont impliquées dans la production d'IL3. Le gène codant pour la synthèse de l'IL3 a été cloné (Fung M.C. 1984) et la séquence de son récepteur est à l'étude.

Une telle molécule possédant des activités variées sur les cellules et les différentes lignées hématopoïétiques suscite évidemment un grand intérêt.

Les applications thérapeutiques pourraient être nombreuses ; L'action de l'IL3 sur la prolifération des mastocytes, qui jouent un rôle clé dans l'allergie serait appréciable...On sait qu'elle agit préférentiellement sur les mastocytes muqueux et selon Stadler (Congrès de la SFI, Genève 1987), elle serait à

l'origine des précurseurs mastocytaires (MMC = mucosis mast cell).

IL4

Elle représente à la fois le BSF1 (B cell stimulating factor) et le BCDF (B cell differentiating factor).

L'IL4 induit la transition IgG ----> IgE (switch secondaire par l'IL4) (Stadler, Genève 1987).

IL5

Ou eosinophil differentiating factor (BCGF2). (Sanderson 1986).

PASL

Cette lymphokine concerne la régulation par les lymphocytes T des fonctions plaquettaires, et fait à l'heure actuelle l'objet de recherches au laboratoire (Pancré 1987).

Les interférons

Des différents types d'interférons identifiés, seul l'INF γ est à proprement parler une lymphokine/interleukine (car sécrété par les lymphocytes et modulant la réponse immunitaire).

Tous les INF possèdent une activité anti-virale et

anti-proliférative, mais ils ont des propriétés immunomodulatrices différentes. Tous augmentent l'activité TNF à la surface des cellules cibles. Ils activent les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. Par contre, seul l'INF γ inhibe le développement des parasites intracellulaire. A ce propos, il a été montré que l'INF γ est capable d'induire des macrophages contaminés par *Leishmania major*, de l'état quiescent à l'état activé, entraînant, et il est le seul à pouvoir le faire, des propriétés cytocides dans ces cellules vis-à-vis des amastigotes intracellulaires. Les macrophages modifiés (de par leurs pathogènes intracellulaires), vont être sollicités en macrophages "primés" par un premier signal : l'INF γ . Cet état transitoire des macrophages va les faire passer à l'état activé (Nacy C. 1985).

b Médiateurs de l'inflammation

Avant d'aborder leur rôle biologique, ils sont répartis dans la littérature en deux grands groupes :

- Les médiateurs préformés

qui sont contenus dans les granules des mastocytes tels que l'histamine, la sérotonine, les facteurs du chimiotactisme, et les enzymes liées à la matrice.

- les médiateurs néoformés

dûs à l'activation membranaire tels que le PAF-acether et les dérivés de l'acide arachidonique (AA), qui par la voie de la lipoxycgénase conduisent aux leucotriènes, SRS-A , et par la voie de de la cyclooxygénase conduisent aux thromboxanes et prostaglandines.

Les médiateurs préformés

L'histamine

Elle se trouve stockée au niveau des granules du mastocyte sous forme inactive car liée à l'héparine par une liaison ionique. Les autres cellules libérant de l'histamine sont les plaquettes, les polynucléaires basophiles et accessoirement les macrophages poly ou mononucléés, et les hématies. Dans le cas des plaquettes l'histamine n'est pas synthétisée mais reçue des monocytes et véhiculée sous forme labile. Tous les facteurs agrégants plaquettaires, en particulier le TXA_2 , le PAF-acether et la thrombine, en induisant la dégranulation des plaquettes, concourent indirectement à l'amplification de la libération d'histamine avec toutes ses conséquences. L'histamine agit au niveau de très nombreux organes tels que les bronches, l'utérus,

l'intestin et les vaisseaux. Ses actions diffèrent radicalement selon le type de récepteurs cellulaires H1 ou H2 intéressé. De façon générale, les complexes membranaires histamine H1 entraînent une augmentation de synthèse du GMPc cytoplasmique, tandis que les complexes histamine H2 déclenchent l'augmentation de l'AMPc.

A côté des effets vasoactifs de l'histamine dans les réactions inflammatoires anaphylactiques, elles s'avèrent également jouer un rôle dans le déroulement des réactions inflammatoires immunes en inhibant indirectement la synthèse de lymphokines, et la prolifération de certaines lymphokines T cytotoxiques. Plus précisément, l'histamine agit sur les récepteurs H2 de ces lymphocytes qui libèrent secondairement un facteur suppresseur (HSF = histamine suppressor factor). L'histamine a une durée d'action courte car elle est rapidement catabolisée selon 2 voies quantitativement inégales :

- La voie accessoire par les polynucléaires (neutrophiles et éosinophiles) : elle subit une désamination oxydative par l'histaminase conduisant à l'acide imidazole acétique.

- La voie principale, dans les macrophages mononucléés, par méthylation des azotes 1 et 3 de l'hétérocycle, puis désamination.

Les facteurs chimiotactiques

- l'**histamine** à faible dose pour les éosinophiles.
- Le **neutrophile chemotactic factor (NCF)**

C'est un facteur qui se retrouve chez les patients présentant un urticaire au froid ou chez les sujets asthmatiques au pollen.

- L'**ECF-A (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis)**

Ce tétrapeptide est très puissant pour les éosinophiles et augmente leurs récepteurs $Fc\epsilon R$ et leur récepteur C3b. (Capron M.1981).

- L'**IF-A (inflammatory factor of anaphylactixis)**

Au cours des réactions tardives à IgE il attire les neutrophiles et les mastocytes.

La sérotonine

Présente dans les plaquettes, elle exerce une vasoconstriction sur les poumons et les reins, et au contraire une vasodilatation sur les muscles et la peau.

Les enzymes

- La **chymase** (chymotrypsine like), existe à un taux très faible chez l'homme ; elle clive le C5a et le C3a, des agents chimioattractants des neutrophiles.

- **La tryptase** (carboxypeptidase des mastocytes pulmonaires humains). Elle transforme le C3 en C3a et augmente la perméabilité vasculaire.

- **Des glycosidases**, telles que la β -glucosidase, et la β D galactosidase.

- **L'aryl sulfatase** qui inactive la slow-reactive protéine (SRS-A ou LTC₄).

- **La superoxyde dismutase.**

Toutes ces enzymes sont liées à la matrice du mastocyte et interviennent dans les physiopathologies liées à l'IgE.

Médiateurs néoformés

Les prostaglandines

Celles de la série E2 (PGE₂) sont fabriquées par les monocytes et les macrophages pendant les premières heures du phénomène inflammatoire. Des expériences ont montré que les PGE₂ inhibent la production d'IL2 et diminuent la réponse immunitaire (Chouaib 1982). En effet, des monocytes d'individus normaux exercent un double contrôle sur la production d'IL2 i) d'une part, la production d'IL1 par ces cellules est indispensable à la production d'IL2 par les lymphocytes T auxiliaires et d'autre part, les monocytes peuvent empêcher la synthèse d'IL2

lorsqu'ils fabriquent des PGE_2 ii) Les PGE_2 induisent la formation de lymphocytes T suppresseurs qui inhibent à la fois le fonctionnement d'autres cellules et la production d'IL2 par les lymphocytes T auxiliaires ; il en résulte une diminution de la réponse immunitaire.

Les prostaglandines (PG) de la série 2 sont dérivées de l'acide icosa-tétra-énoïque, un métabolite de l'acide arachidonique (AA), alors que les PG de la série 1 sont dérivées de l'acide icosa-tri énoïque. Il faut noter le rôle central de deux endoperoxydes : PGH_2 et PGG_2 sécrétés par les plaquettes, en effet ce sont les précurseurs de :

- la PGE_2 qui a un effet bronchoconstricteur,
- du TXA_2 qui intervient à la fois dans l'agrégation plaquettaire et le bronchospasme,
- de la PGI_2 qui est synthétisée essentiellement par les cellules endothéliales, ces effets sont médiés par une augmentation d'AMPc dans les cellules cibles. Elle possède un effet vasodilatateur important (effet antagoniste du TXA_2).

Les caractères extravasculaire et discontinu de la synthèse du TXA_2 s'opposent exactement au cas de synthèse intravasculaire et continuelle de la PGI_2 . La synthèse de PGI_2 peut se faire à

partir de l'AA des cellules endothéliales ou à partir d'apports en PGH_2 et PGG_2 délivrés par les plaquettes.

Les PG : PGE_2 , PGD_2 , PGF_2 , sont au niveau du foyer inflammatoire, sécrétées par les phagocytes mononucléés essentiellement. Produites au niveau des membranes, leur demi-vie est très courte, après avoir transmis leur message métabolique aux adényl cyclases membranaires, elles sont internalisées et inactivées par des enzymes cytolitiques.

Les effets pro-inflammatoires de la PGE_2 sont analogues à ceux de la PGI_2 .

Les effets anti-inflammatoires correspondent à l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T et des phagocytes mononucléés (Kuehl F. 1980).

Le thromboxane A2

Il est synthétisé de façon discontinue dans le territoire extravasculaire du foyer inflammatoire. Les cellules sécrétrices sont les macrophages, les polynucléaires, les mastocytes activés

et surtout les plaquettes. Le TXA_2 est le plus puissant des facteurs agrégants plaquettaires, en même temps c'est un vasoconstricteur dont la cible est essentiellement veinulaire.

Nous venons de voir que ces effets biologiques sont à l'opposé de ceux de la PGI_2 , ils sont obtenus par une diminution du taux d'AMPc dans les cellules cibles.

Les leucotriènes

Chez l'homme, les mastocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles et les lymphocytes sont capables de synthétiser des leucotriènes. Selon Samuelson et Austen leur activité biologique est mille fois plus intense que celle de l'histamine. Indépendamment de l'effet algogène et chimiotactique de LTB_4 sur les neutrophiles et les éosinophiles, les LTB_4 , LTC_4 et LTD_4 entraînent une contraction des muscles lisses, il en résulte une bronchoconstriction et surtout une augmentation de la perméabilité vasculaire par vasoconstriction des veinules de la microcirculation.

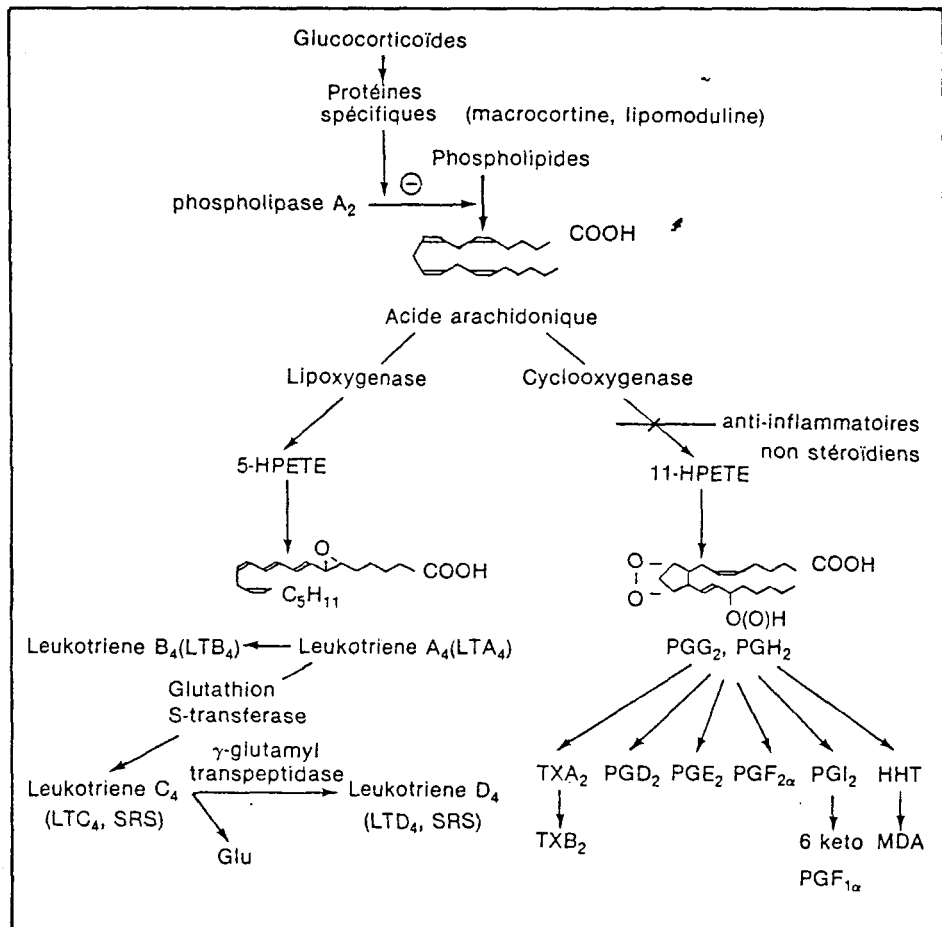


Figure 4.12

*Métabolisme de l'acide arachidonique sous l'effet
de la lipoxygénase ou de la cyclooxygénase*

D'un point de vue quantitatif, les voies de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase sont à peu près d'égale importance. L'effet inhibiteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens porte sur la voie de la cyclooxygénase. Les glucocorticoïdes bloquent les deux voies (lipomoduline). Les leucotriènes C₄, D₄ ont des effets identiques à la S.R.S.A.

Les leucotriènes sont capables d'activer les macrophages, en particulier leur synthèse de TXA_2 et des PG.

L'inhibition de la cyclooxygénase augmente la production des leucotriènes (Lewis, Austen 1981). Il existe un balancement entre la synthèse des leucotriènes et celle des prostaglandines dont l'importance n'est pas encore élucidée en physiopathologie.

Les TXA_2 , les PG avec les leucotriènes sont des facteurs d'amplification de la réaction inflammatoire. Leurs effets peuvent être pro, anti-inflammatoires et immunomodulateurs selon les endroits et les besoins de l'organisme. A fortiori il sera très difficile de juger de l'effet de modulateurs exogènes sur de tels facteurs.

Le PAF-acether

Méiateur libéré par les neutrophiles et les macrophages, il se retrouve également dans les granules de la plaquette et de l'éosinophile. (Benveniste 1981).

Il intervient surtout dans la bronchoconstriction plaquettes dépendante, (car il peut être bloqué par un anti-sérum plaquettaire) et possède des effets pro et anti-inflammatoire, il augmente la perméabilité vasculaire (Vargaftig 1983).

Des macrophages alvéolaires de patients asthmatiques sont capables de sécréter du PAF-acether après incubation avec de l'anti-IgE ou des allergènes spécifiques. Le macrophage alvéolaire pourrait être source de médiateurs variés qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire durant l'asthme allergique (Ford-Hutchinson A.W. 1985), et certains auteurs ont émis l'hypothèse que le PAF-acether est à l'origine de l'hyperréactivité bronchique caractéristique de cette pathogénie (Morley, Page 1986).

Comment s'effectue la modulation des étapes essentielles de ces processus biochimiques d'activation cellulaire ?

Actuellement, l'étude des agents exogènes d'immunomanipulation permet d'envisager une nouvelle approche vaccinale; en combinant les structures potentiellement protectrices, seules ou associées dans le support adjuvant adéquat, les immunomodulants sont choisis en fonction des mécanismes à inhiber, des cellules à promouvoir ou à bloquer, des anticorps à induire ou à réprimer.

La troisième partie des généralités sera donc consacrée aux caractéristiques d'immunomodulants pouvant modifier positivement ou négativement le cours spontané des réactions immunitaires.

C) LES IMMUNOMODULANTS.

I IMMUNOSTIMULANTS.

Il est possible de stimuler l'immunité à plusieurs niveaux; il peut s'agir, dans des cas de carence immunitaire, de la reconstitution des éléments déficients par la greffe de cellules de moëlle osseuse, ou de thymus, ou d'injection d'extraits thymiques (immunorestauration). On peut aussi utiliser des produits biologiques qui sont les médiateurs normaux des réactions immunitaires comme les anticorps, sous forme de gamma globulines pour l'immunité humorale ou le "facteur de transfert" pour l'immunité à médiation cellulaire (immunomodulation).

Cette stimulation peut être spécifique de l'antigène, c'est le cas des adjuvants qui stimulent les réponses à l'égard des antigènes auxquels ils sont incorporés. Par ailleurs la stimulation peut être non spécifique de l'antigène, les effets du traitement s'exerçant alors sur les réponses induites pendant la phase d'activité du produit utilisé. On regroupe ces produits sous le nom d'immunostimulants.

Les adjuvants

Il est rare que l'injection d'un immunogène, seul ou associé à un immunomodulant se fasse en solution dans un milieu liquide.

A l'origine la notion d'adjuvant recouvrait des substances qui, mélangées ou combinées à un antigène injecté simultanément, augmentent la réponse immunitaire spécifique vis-à-vis de cet antigène.

Ils agissent essentiellement en augmentant le pouvoir immunologique des antigènes. Le plus souvent ils augmentent globalement les divers types de réponses immunitaires. Néanmoins, cette augmentation globale peut parfois favoriser sélectivement une catégorie particulière de réponse en modifiant les mécanismes de régulation, en particulier la persistance de l'antigène et la rétro-régulation de la synthèse d'anticorps. Expérimentalement ils sont utilisés pour augmenter la production d'anticorps ou favoriser le développement d'une hypersensibilité retardée. Chez l'homme ils sont surtout utilisés dans les vaccinations. C'est Freund qui en 1947 montra le premier la capacité d'émulsion d'huile dans l'eau ou surtout d'eau dans l'huile, d'augmenter les réponses immunitaires, en particulier si on leur ajoutait des corps bactériens tués.

a Adjuvants huileux

- L'adjuvant incomplet de Freund (ICA).
 - L'adjuvant complet de Freund (ICA + mycobactéries tuées = CFA)
- effet amplificateur de la réponse IgG.

- Le Bayol F (42 % de paraffine).
- Le naphtalène monocyclique (31,4 % de paraffine).
- le naphtalène polycyclique (26,1 % de paraffine).
- L'adjuvant 65 qui est une émulsion d'eau dans l'huile contenant du monostéarate d'aluminium et qui a été utilisé chez l'homme dans la vaccination contre la grippe.
- Les sels d'alumine...

b Immunostimulants

Ils ont une action plus générale sur l'immunité pouvant modifier simultanément plusieurs réponses immunitaires, grâce à une augmentation non spécifique et transitoire de la réactivité immunitaire. Cette stimulation peut être globale ou s'appliquer à un type particulier de réponse. Ils suscitent beaucoup d'intérêt depuis que leur utilisation a été envisagée dans le traitement de certains cancers, leucémies et maladies auto-immunes.

Les substances bactériennes

- BCG : bacille de Calmette et Guérin

Il a surtout été étudié sur les tumeurs chez l'animal et chez l'homme ; des greffes syngéniques de carcinomes induits par le méthylcholanthrène ou des tumeurs induites par l'adénovirus de

type 12 sont rejetées sous l'action du BCG. (Robinson M.R. 1985).

Des surnageants de cellules spléniques sensibilisées, vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis in vivo* et incubées *in vitro* avec du BCG, ajoutés à des cultures de cellules spléniques normales augmentent la réponse immunitaire vis-à-vis des hématies de mouton.

L'inoculation par voie veineuse de "jeunes BCG" bacilles de Calmette Guérin à des souris 14 jours avant la pénétration transcutanée des cercaires de *S. mansoni*, détermine une forte protection contre cette infection (Bout 1977).



La liste n'est pas exhaustive nous pourrions encore citer d'autres stimulants d'origine bactérienne, *Bordetella pertussis* (agent de la coqueluche considéré comme un immunostimulant de la réponse IgE), les *Nocardia* ...ou des extraits bactériens tels que MER (BCG), Biostim (*Klebsiella pneumoniae*)...

(Voir le tableau de Werner ci-après).

ADJUVANTS ET IMMUNOSTIMULANTS

ADJUVANTS EXCLUSIFS

Adjuvants huileux

Adjuvant complet de Freund (CFA)

Adjuvant incomplet de Freund (ICA)

Sels minéraux

Phosphate ou hydroxyde d'alumine

Sulfate de béryllium

Alginate de calcium

IMMUNOSTIMULANTS

Bactéries

Bacille de Calmette-Guérin (BCG)

*Corynebacterium parvum**Brucella abortus**Nocardia**Bordetella pertussis**Extraits bactériens*

- Chimiquement non définis

MER (BCG)

Picibanil (*Streptococcus pyogenes*)Biostim[®] (*Klebsiella pneumoniae*)Ribomunyl[®] (extraits ribosomaux)

- Chimiquement définis

WSA

Lipopolysaccharides (endotoxine)

Muramyl dipeptides et analogues (murabutide, MTP-PE,...)

Lauryl dipeptides

Extraits fongiques

Krestin (protéine + polysaccharide)

Glucan (polysaccharides)

Lentinan (polysaccharides)

Bestatine (peptide, synthétisé)

*Produits du système immunitaire*Hormones thymiques : thymopoïétine (TP-5), thymosine $\alpha 1$, thymuline (anciennement FTS)

Interférons

Interleukines (IL-1, IL-2)

Tuft sine (tétrapeptide)

Autres produits naturels

Vitamine A et dérivés (rétinoïdes)

Vitamine E

Lynestérol

Produits chimiques

Polynucléotides (poly AU)

Isoprinosine

Lévamisole

Diéthylthiocarbamate (DTC ou imuthiol)

Aziméxone

Tiborone (polymère de pyran)

Les endotoxines bactériennes

Elles s'opposent aux substances qui diffusent hors des bactéries. Leur action sur l'immunité est complexe, puisqu'elles sont à la fois des antigènes, des adjuvants, des immunostimulants, des toxines neurotropes et des pyrogènes. A titre d'exemple, nous citerons le lipide A isolé d'endotoxines lipopolysaccharidiques des germes gram négatif dont le principe actif est à la fois responsable de l'effet adjuvant et toxique, et qui agit comme deuxième signal d'activation macrophagique. (Williams J.F. 1980).

Les Substances fongiques

- Le lentinan extrait d'un champignon comestible est doué d'une activité anti-tumorale. Par contre il n'a pas d'effet adjuvant sur la production d'anticorps, ni sur les réactions d'hypersensibilité retardée et les rejets de greffes.

Les produits du système immunitaire

Les médiateurs intercellulaires sont de puissants agents modulateurs de l'immunité. On peut donc les considérer en eux-mêmes ou dans l'optique d'une stimulation de leur production.

- Les hormones thymiques :

Le thymus exerce une partie de ses fonctions par l'intermédiaire d'hormones thymiques. Il était donc tentant d'utiliser ces hormones dans la reconstitution immunologique de certains déficits immunitaires, ou comme stimulateurs pharmacologiques des lymphocytes T. Des facteurs thymiques synthétiques sont maintenant disponibles et se sont révélés capables de normaliser certaines fonctions T chez les souris thymoprives ou auto-immunes, et même de stimuler des cellules T suppressives chez les souris normales. Ces facteurs synthétiques :

- Thymopoïétine, thymuline et la thymosine, ainsi que des extraits thymiques plus grossiers (en particulier la fraction 5 de Goldstein et la thymostimuline) ont été administrés à des malades atteints de déficit immunitaire, de polyarthrite rhumatoïde ou de certains cancers, avec des résultats prometteurs, tant sur le plan clinique qu'au niveau des paramètres immunologiques (Naylor 1986).

-Interleukines et interférons ont été décrits précédemment.

La Tufstine

Tétrapeptide (Thr-Lys-Pro-Arg) dont la séquence est retrouvée dans la chaîne lourde des IgG, stimule la plupart des activités des macrophages et augmente la défense anti-infectieuse et anti-tumorale.

La tufstine et la bestatine s'avèrent capables de restaurer l'immunité abaissée chez les souris âgées et de prévenir l'apparition de lymphomes corrélée à celle du désordre immunitaire (Phillips J.M. 1981).

Chez l'homme, elle semble ramener les taux des cellules OKT₈, à la normale que ces taux soient abaissés ou élevés.

Les autres produits

Le MDP

Le muramyl-dipeptide et ses analogues, de nos jours synthétisés industriellement, interviennent dans divers vaccins. (Chedid 1986), et ont un impact au niveau du macrophage (Spreafico 1985).

L'étiologie infectieuse des maladies respiratoires de l'homme et des animaux domestiques se caractérise par la présence simultanée de nombreux agents pathogènes : virus, bactéries, mycoplasmes. De ce fait, différents auteurs ont cherché les moyens susceptibles de stimuler les défenses non spécifiques du tractus pulmonaire et parmi celles ci les

fonctions du macrophage alvéolaire.

Cette population cellulaire, majoritaire dans l'espace bronchoalvéolaire participe à l'épuration du poumon et à la résistance aux infections pneumotropes tant de par ses capacités phagocytaires et bactéricides, par ses fonctions cytotoxiques anti-virales, que par son aptitude à produire de l'interféron (Charley B. 1986).

L'activation du macrophage alvéolaire a été recherchée *in vitro* à l'aide de lipopolysaccharides (LPS) ou de dérivés mycobactériens : tels que les muramyl dipeptides (MDP). Fidler (1981) montre que les fonctions cytotoxiques du macrophage alvéolaire sont activées *in vitro* par le LPS ou par du MDP lorsqu'ils sont injectés librement ou encapsulés dans les liposomes et injectés en intraveineuse chez les rongeurs. Enfin des essais d'activation du macrophage alvéolaire du porc ont montré qu'il est possible d'accroître *in vitro* la production d'IL1 par le LPS et le MDP, alors que dans les mêmes conditions d'autres fonctions macrophagiques étaient inchangées (Charley 1986).

Ainsi un état d'immunité accrue peut être atteint par l'amplification, avec un immunostimulant des capacités fonctionnelles de cellules impliquées dans la phase d'induction et/ou effectrice de la réponse immune, mais aussi par une

inhibition sous l'effet d'un immunodépresseur, des éléments participant aux mécanismes de rétrocontrôle et de régulation négative de l'immunité.

L'obtention d'une immunité anti-tumorale efficace exige une forte potentialisation de l'immunité cellulaire, alors qu'en chirurgie de greffe, il serait souhaitable, à côté des traitements supprimeurs, nécessaires mais pas toujours suffisants, de favoriser dans certaines conditions la synthèse d'anticorps facilitants ou bloquants, et même de supprimer la réponse cellulaire.

De la même façon, que nous avons cité quelques exemples de substances potentiatrices de l'immunité, nous citerons quelques exemples de substances ayant un rôle inhibiteur sur la réponse immune.

II IMMUNOSUPPRESSEURS.

La suppression de l'immunité peut être :

a) Non spécifique, elle s'applique simultanément à toutes les réponses immunitaires induites pendant la durée d'action du produit utilisé. Ce type d'immunosuppression est obtenue par la

destruction des cellules lymphoïdes, par irradiation ou par administration de certains produits chimiques ou biologiques.

b) Spécifique de l'antigène : c'est la tolérance.

Les immunosupresseurs cytotoxiques et les agents anti-cancéreux sont remarquablement hétérogènes dans leur interaction avec le système immunitaire, conséquence d'une grande disparité de leur action sur les divers composants de l'immunité.

a) La destruction ou l'élimination des cellules lymphoïdes, la thymectomie, l'irradiation, la canulation du canal thoracique sont des méthodes d'immunosuppression non spécifiques. En revanche, il existe des substances suppressives de la réponse immune telles que:

- les thiopurines
- les agents alkylants
- la cyclosporine
- les corticoïdes
- les anticorps anti-lymphocytes.

b) La tolérance, la facilitation, l'injection passive d'anticorps, la désensibilisation sont quelques exemples

d'immunosuppression spécifique.

Deux aspects de l'immunosuppression restent difficiles à appréhender :

1) l'action anti-inflammatoire

C'est-à-dire l'effet des immunosupresseurs sur les manifestations symptomatiques de la sensibilisation immunologique, qu'il est souvent difficile de distinguer de l'action sur la sensibilisation spécifique des lymphocytes vis-à-vis de l'antigène.

2) l'index thérapeutique

C'est-à-dire la faible marge qui existe entre la dose toxique et la dose biologique active.

Il faut aussi remarquer que des produits chimiquement proches (telles que les antracyclines : daunorubicine et damnorubicine) varient considérablement dans leur capacité d'affecter un ou plusieurs types de cellules immunes. On observe les mêmes différences avec des substances cytotoxiques anti-cancéreuses comme la nitrosourée et les alcaloïdes de la violette. Certains produits sont parfaitement inhibiteurs pour

un type de cellule immune, et totalement ou seulement partiellement inactifs sur d'autres. C'est ainsi que les sérums anti-lymphocytaires (SAL) et l'azathioprine semble avoir une action préférentielle sur les cellules T, alors que les agents alkylants affectent à la fois les cellules B et T.

Rappelons aussi que selon le protocole d'administration et le type de réponse examinée, certains produits comme le cyclophosphamide ou les SAL peuvent avoir un effet inverse de celui attendu sur la réponse immunitaire.

L'acide acetylsalicylique, ou l'indométacine, sont exclusivement des anti-inflammatoires, d'autres produits sont des immunosupresseurs vrais comme la cyclosporine (métabolite fongique dont la structure et la synthèse ont été obtenues, et qui a pour cible principale les lymphocytes T auxiliaires.)

On voit que l'immunomanipulation est devenue une véritable immunomodulation des mécanismes immunitaires et qu'elle a ouvert un nouveau domaine de recherche : l'immunopharmacologie.

De la même façon que certaines cellules du système immunitaire, comme les macrophages et les plaquettes sanguines par exemple, jouent plusieurs rôles dans la réponse immune (mécanisme d'induction, effecteurs ou de régulation) ; un modulant peut exercer son influence dans des directions divergentes selon la population ou sous population cellulaire touchée, en stimulant ou en inhibant la réponse, en ayant des

effets immuns de signes contraires, en étant induits successivement ; compliquant la prévision du résultat final obtenu...

Le second point à souligner est que la plupart des modulateurs modifient l'immunité par des actions directes ou indirectes à plusieurs niveaux.

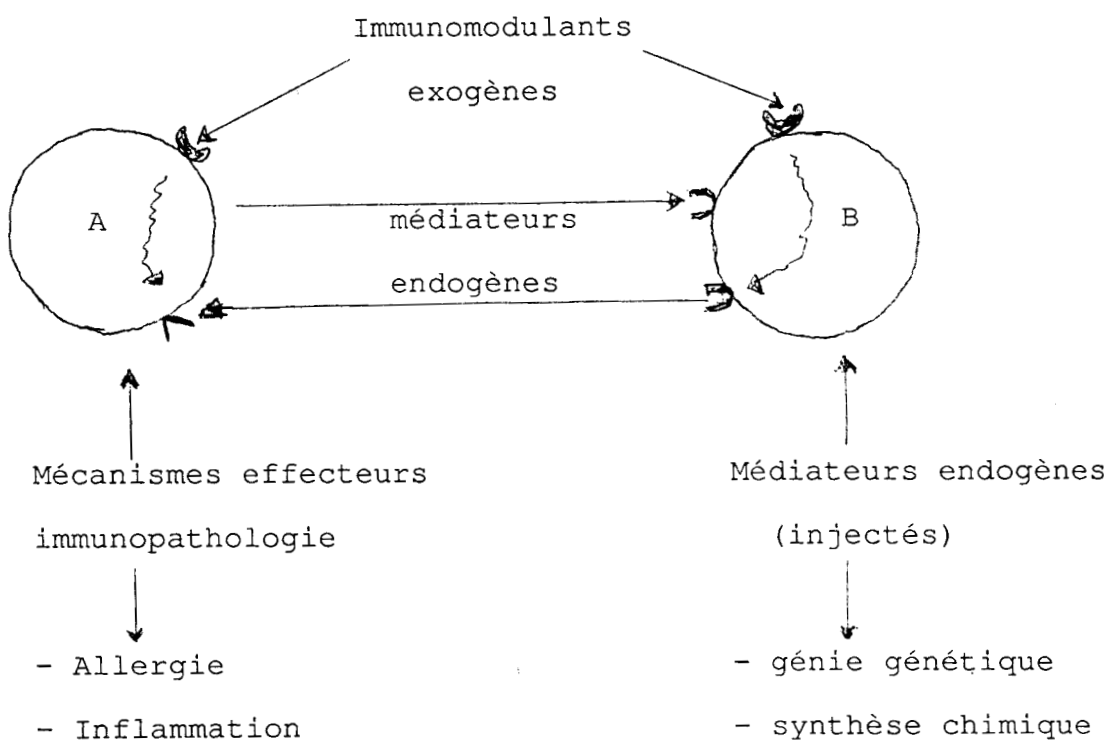
Il devient alors difficile de déterminer l'étape initiale du traitement et par conséquent il est difficile de considérer ses agents comme absolument sélectifs. D'autre part, les effets qualitatifs et quantitatifs peuvent différer grandement donnant une forte hétérogénéité dans les profils immunopharmacologiques observés, selon leurs capacités d'interactions avec les divers composants du système immunitaire.

A mesure que la notion d'immunostimulants et d'immunosuppresseurs se nuancait, en même temps le nombre et la variété des produits s'accroissaient. Certains immunostimulants peuvent avoir un effet suppresseur comme le BCG ou les hormones thymiques et inversement certains immunosuppresseurs peuvent éliminer sélectivement, dans certains protocoles d'administration, les cellules T suppressives et augmenter certaines réponses immunitaires. L'ensemble de ces modulateurs exogènes est donc regroupé actuellement sous le terme plus opérationnel d'immunomodulateurs.

L'utilisation thérapeutique de ces immunomodulants reste donc extrêmement délicate. Mais il était dès lors intéressant d'analyser le rôle de diverses substances sur l'interaction IgE/cellules inflammatoires au cours des réactions d'hypersensibilité immédiate.

Au cours de ces dernières années, dans le groupe d'immunopharmacologie du laboratoire, diverses recherches ont concerné l'étude de molécules immunomodulatrices ; telles que le cromoglycate disodique (DSCG). L'action de cette molécule, très largement utilisée dans la thérapeutique de l'asthme, a permis de montrer qu'elle modulait de manière très significative l'expression des récepteurs $Fc\epsilon RII$ des macrophages, éosinophiles et plaquettes et leur activation IgE dépendante (Tsicopoulos A. 1987).

Dans ce travail nous avons cherché, par l'utilisation de divers immunomodulants exogènes, à interférer non seulement sur l'activation IgE dépendante des phagocytes mononucléés et des plaquettes, mais aussi sur les signaux déclenchant l'activation plaquettaire anormale par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dans l'asthme à l'aspirine.



MATERIEL ET METHODES

LES IMMUNOMODULANTS

1 Le LF 1695

Fourni sous forme d'une poudre jaune inodore de PM 328,5 son point de fusion est 89° C. Dans tous les cas il doit être conservé à l'abri de la lumière. Sous forme de poudre il est stable à température ambiante. En solution dans l'alcool ou dans un milieu aqueux à pH 3, il est stable 15 jours à + 4° C. En suspension dans l'eau gommeuse avec 0,1 % de Tween, il est stable 8 jours à + 4° C. Comme il adhère fortement au plastique il est utilisé dans des récipients en verre.

Utilisation in vitro

Nous utilisons deux procédés de solubilisation :

- préparation d'une solution alcoolique du LF (éthanol R.P.) et dilution de cette solution alcoolique dans le milieu de culture. En règle générale, nous ne dépassons jamais 1 % d'alcool final. Si le milieu de culture contient du SVF (sérum de veau foetal) nous pouvons atteindre des concentrations finales de 10 µg/ml en LF.

- Préparation d'une solution de LF 1695 100 mg/l dans du sérum physiologique à pH 3 :

a) Eau physiologique

peser 9 g de NaCl, le dissoudre dans 1 l d'eau distillée; sur la moitié (500 ml) ajuster le pH à 3,0 avec HCL 1 N.

b) Préparation de la solution de LF :

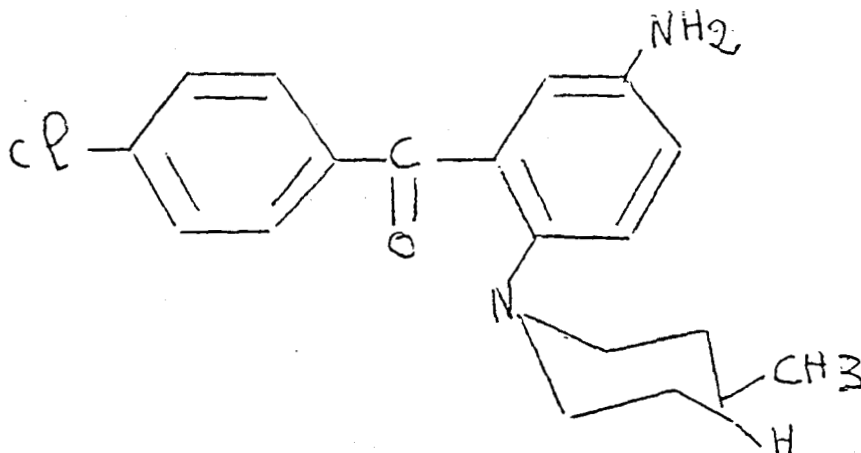
pour 20 ml de solution à 100 mg/l

- peser exactement 2 mg de LF 1695
- sur la poudre ajouter 16 à 17 ml d'eau physiologique pH 3
- agitation sur agitateur magnétique chauffant réglé sur 40° C
- agiter jusqu'à solubilisation totale (2 à 3 h)
- laisser refroidir
- ajuster le pH à 3 avec une solution de soude 1 N dans l'eau physiologique.
- ajuster le volume à 20 ml avec l'eau pH 3.

Cette solution gardée à l'abri de la lumière et à 4°C peut être conservée 15 jours.

Nous pouvons introduire jusqu'à 10 % de cette solution dans le milieu de culture sans modification du pH, ce qui permet d'atteindre des concentrations de l'ordre de 10 µg/ml final.

LF 1695 : phenyl pipéridine benzoyl



Utilisation in vivo

- administration du produit par voie orale à l'aide de microcapsules.
 - administration du produit par tubage gastrique sous forme d'une suspension dans de l'eau gommeuse avec 0,1 % de Tween 80 :
 - . peser 6,25 mg; 12,5mg; 25mg; 62,5mg; (poids pour les doses de 5, 10, 20, 50, mg/kg respectivement) de LF 1695.
 - . ajouter sur la poudre 10 µg de Tween 80 et laisser la poudre s'imbiber.
 - . préparer de l'eau gommeuse à 30 g/l
 - . ajouter 2 ml d'eau gommeuse
 - . agiter 30 min à température ambiante (agitation magnétique) .
 - . ajouter 3 ml d'eau gommeuse
 - . agiter 2 h à température ambiante
 - . ajouter 5 ml d'eau gommeuse
 - . agiter une nuit à température ambiante
 - . toutes les opérations sont faites à l'abri de la lumière
 - . la solution finale est jaune et opalescente, la durée de conservation est d' une semaine à 4° C.
- Agiter avant l'emploi.
- Pour traiter les animaux, 0,2 ml de la suspension sont injectés :
- Chez la souris et chez le rat, la dose optimale dans la plupart des tests est de 5 mg/kg/jour. Néanmoins, pour être sûr de mettre en évidence une activité potentielle, il convient de faire 3 doses (1, 5, 20, mg/kg par exemple).

2 Pind-Avi (PA 485) Delalande, Paris.

Il ne s'agit pas d'un modulant synthétique, mais d'un modificateur de la réponse biologique obtenu à partir d'une souche atténuée par de multiples repiquages d'un virus aviaire, inactivé par irradiation aux rayons gamma à raison de 14 kGy (Mayr 1960, Mayr 1966).

Le PA 485 n'entraîne pas la formation d'anticorps neutralisants. L'étude de toxicité du produit a été effectuée dans le cadre de la Faculté vétérinaire de Munich. Les preuves de l'activité biologique et de la standardisation au contrôle biologique du PA 485 sont fondées sur le test VSV chez le souriceau. Ce test recherche l'effet préventif du modificateur de la réponse biologique vis-à-vis de l'infection virale obtenue par injection I.P. de suspension de virus de la stomatite vésiculaire. Dans d'autres études il a été établi que la substance ne produisait chez l'animal : souris, chiens, lapins, porcelets... (Mayr 1986), aucun effet secondaire nocif en dessous de 2 ml en I.P.

Le PA 485 a été étudié sur des lymphocytes (Schleicht 1986), des hépatocytes, des granulocytes et des monocytes. Dans différents modèles viraux (Muller-Brunecker 1986) et bactériens, ainsi que dans des études cliniques.

Nous l'avons testé dans des infections parasitaires, il nous parvenait sous forme de poudre lyophilisée de 320 unités biologiques pour 2 ml i.p.p.

- Utiliser en général chez l'animal à 1600 UB/kg.

(L'injection s'effectue en sous-cutanée).

- In vitro de 1,6 UB/ml à 32 UB/ml.

3 Imuthiol : Diéthylldithiocarbamate de sodium (DTC).

Mérieux, Lyon.

Cet agent stimulant de l'immunité, est un composé soufré (voir, formule chimique). Le DTC est dépourvu de toxicité ou d'effets pharmacologiques indésirables jusqu'aux doses de 300 mg/kg, mais selon le mode d'administration, la fréquence, et le modèle animal utilisé, les doses toxiques peuvent varier entre 100 mg/kg et 500 mg/kg. Les effets fongicides, bactéricides et parasitocides joints à l'action anti-émaciant du DTC impliquent des effets favorables chez des malades rendus susceptibles par une immunodépression (Renoux 1982). Son action sur les SOD, limitant la libération de superoxydes, et son action sur l'agrégation des plaquettes permettent de prévoir des effets anti-inflammatoires du DTC. La multiplicité apparente des influences du DTC relève fort probablement d'un mécanisme de base unique, la chélation lipophile des métaux et l'élimination des radicaux libres : modification et régulation selon la dose et l'activité des métalloenzymes et des taux de catécholamines (Renoux 1973, Renoux 1980).

Les essais phase I-II chez l'homme confirment l'expérimentation en montrant l'accroissement des fonctions T. Il est aussi actif en administration prolongée qu'après une seule injection, spécifiquement sur la lignée T. L'effet favorable chez les malades atteints de pneumopathies chroniques fait augurer l'efficacité du DTC dans les infections virales ou bactériennes.

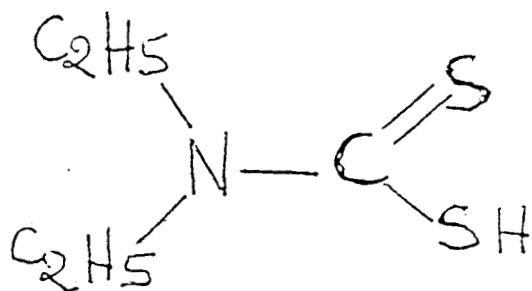
L'Imuthiol a donc été testé dans différentes parasitoses pour son action stimulante de l'immunité en vue d'applications thérapeutiques. La

substance nous était fournie sous forme de poudre lyophilisée de 125 mg à reprendre par le solvant extemporanément (5 ml).

- Utiliser en général chez l'animal à 250 mg/kg.

(L'injection s'effectue en sous-cutanée).

- *In vitro* de 62,5 µg/ml à 250 µg/ml.



Imuthiol : acide diéthyl dithiocarbamide



4 DSCG

Cromoglycate de sodium : sel disodique de 1.3 bis (2 carboxicrome- 5. yloxy) 2 hydroxypropane = DSCG, (FISONS Ecully)

Fisons, lot 30071 MM = 468,38

Flacon de :

- Poids anhydre = 4,70 g
- Poids réel = 5,15 g
- Taux d'humidité = 8,70 %

5 Nédocromil de sodium

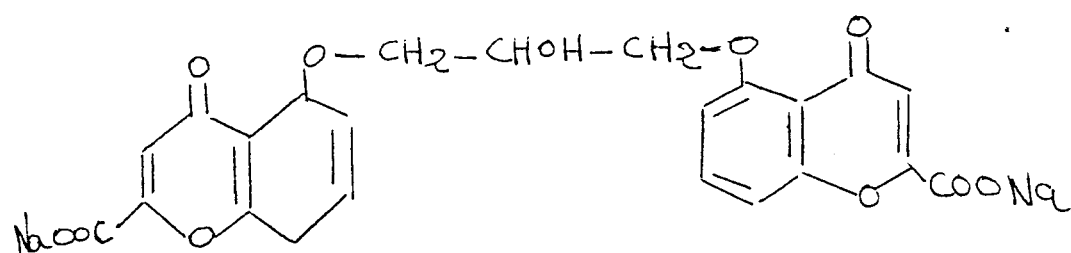
Nédocromil de sodium: disodium-9 éthyl-6-9 dihydro-4-6-dioxo-10 propyl-4-H-pyranol (2,3) quinoline-2-8 dicarboxylate = aérosol (Tilade) = FPL 59002 KP , (FISONS)

Fisons, lot 5 : FPL 59001 (appellation du produit par Fisons). MM = 400

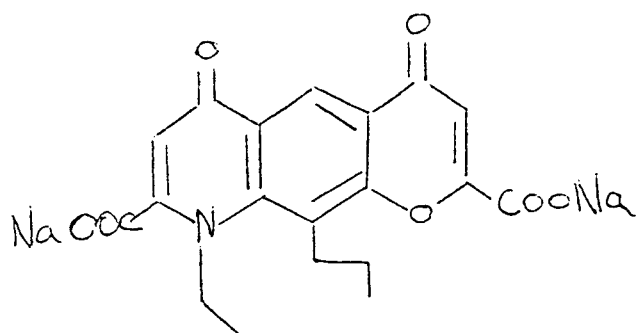
Poudre jaune à conserver à l'abri de la lumière.

Le DSCG et le Nédocromil sont solubles en MEM/PS ou en RPMI (milieux de culture). Ils se préparent extemporanément à partir d'une solution mère à 1 mg/ml. On effectue différentes dilutions afin d'obtenir une gamme de concentration de 10^{-5} M à 10^{-12} M.

L'incubation de l'un ou l'autre modulant dure environ 30 min pour les tests de cytotoxicité ou 15 à 30 min dans le cas du test de chimioluminescence.



DSCG : sel disodique de 1-3 bis hydroxypropane



Nédocromil de sodium : sel disodique de 1-3 hydroxypropane quinone

LES PARASITES

A SCHISTOSOMA MANSONI

Dans toutes les expériences de cytotoxicité nous avons utilisé une souche portoricaine de *Schistosoma mansoni* dont le cycle biologique est maintenu au laboratoire chez la planorbe : *Biomphalaria glabrata* (variété albinos) et le hamster doré : *Mesocricetus auratus*.

1 Les cercaires:

Les mollusques infectés sont exposés pendant 1 h 30 à la lumière et à 30°C, et les cercaires libérées sont purifiées et concentrées par phototropisme.

2 Les schistosomules:

Nous pouvons préparer des schistosomules "mécaniques" ou "peau". Dans le premier cas les cercaires sont soumises à une agitation sur vortex afin de rompre leur queue bifide et provoquer leur transformation.

Dans le second cas, la transformation de la cercaire en schistosomule se réalise par le passage transcutané d'une peau abdominale de souris placée sur un collecteur selon la technique de Clegg et Smithers (1972). La récolte des schistosomules est effectuée 3 h après le dépôt des cercaires dans un milieu HLEG (hydrolysate de lactalbumine en

Earle-glucosé) maintenu à 37 °C et contenant 1000 U de pénicilline/ml et 50 µg de streptomycine/ml. Cette méthode de préparation a l'avantage d'être proche des conditions d'infection, elle est utilisée lors des tests de cytotoxicité cellulaire.

B. *BRUGIA MALAYI*

Nous avons choisi le mastomys (*Mastomys natalensis* souche Gissen RFA) car cet hôte définitif remplace l'homme.

L'infestation est réalisée par les larves L3 (80 L3/mastomys), injectées en sous-cutanée dorsale.

On laisse le cycle se poursuivre durant 6 mois. Puis on effectue des relevés de la microfilarémie: l'animal est saigné à l'oeil au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie, et toujours aux mêmes heures, afin d'éviter le phénomène de périodicité circadienne. Le sang est prélevé sur pipette de Thoma (10 mm jusqu'à la graduation 0,5) que l'on ajuste à la graduation 1,1 avec de l'acide acétique à 5 %. Les microfilaires contenues dans le sang sont ainsi tuées; elles deviennent alors rigides et cela permet une numération plus aisée sur cellule de Nageote:

$$X \times 4 = \text{nombre de microfilaires} / 10 \text{ mm}^3$$

Il suffit ensuite de multiplier par 100 pour ramener ce nombre au ml de sang.

Pour la détermination du nombre de vers adultes, les mastomys sont sacrifiés puis disséqués. Chaque organe est dilacéré en HW, puis observé à la loupe binoculaire afin de numérer les filaires adultes.

C. TOXOPLASMOSE

Souche chronique:

L'infestation des souris Balb/C se fait à raison de 50 kystes par souris en intrapéritonéale. Les souris peuvent vivre 1 an; les kystes se retrouvent dans le cerveau et les lobes oculaires (absence d'anticorps).

Souche virulente RH:

Chez la souris Balb/C, 10^3 tachyzoïtes/souris représentent la dose létale au bout de huit jours.

Chez le rat Fischer, 10^9 tachyzoïtes/rat représentent la dose létale au bout d'un mois.

D. TRYPANOSOMA CRUZI

L'infestation de souris Balb/C est réalisée par 10 000 trypanosomes/souris. Après une évolution en huit jours, la trypanosémie est déterminée tous les trois jours. Le passage en phase chronique a lieu après 21 jours .

HOTES MAMMIFERES

A Les rats Fischer

Les rats ont été fournis par Iffa Credo (L'Arbresle, France). Ce sont

des animaux consanguins, utilisés pour obtenir d'une part le sérum, sain ou immun, et d'autre part les plaquettes sanguines et les macrophages péritonéaux.

B Les souris Balb/C

Les souris étaient originaires du Centre National de la Recherche Scientifique à Orléans. Ce sont des souris consanguines mâles ou femelles. Elles ont été utilisées dans le modèle *Trypanosoma cruzi*, et dans les Toxoplasmoses chronique et virulente .

C Les mastomys

Mastomys natalensis (souche Gissen, RFA) est maintenu en élevage au laboratoire. Ils sont employés comme hôtes définitifs pour la filariose: *B. malayi* .

L'infestation a lieu à partir de 6 semaines.

LES CELLULES.

1 Les macrophages.

Origines des macrophages utilisés:

a Les macrophages alvéolaires humains

Le lavage broncho-alvéolaire est réalisé au cours d'une fibroscopie

bronchique sur un patient en position assise, à jeun, ayant un prémédication à l'atropine (1/2 mg en sous cutané.) Une anesthésie locale est pratiquée à l'aide de lidocaïne (xylospray 10%) en pulvérisation. intra-pharyngée. Le fibroscope est introduit par voie nasale, 10 - 15 ml de lidocaïne 1% sont introduits dans les bronches par le fibroscope, puis aspirés immédiatement. Le fibroscope est ensuite poussé jusqu'à son blocage sous-segmentaire le plus souvent dans la Nelson droite. 50 ml de sérum physiologique stérile sont instillés, puis immédiatement aspirés, l'opération est renouvelée quatre fois. Le liquide de lavage est préservé à 4°C puis rapidement acheminé au laboratoire.

b Les macrophages péritonéaux de rats

Les rats utilisés pèsent environ 180 à 200 g et sont âgés de 5 à 10 semaines. Les rats sains fournissent les macrophages péritonéaux témoins, ou ceux sensibilisés passivement par de l' IgE de rat. Les rats infestés par exposition de la peau abdominale rasée à 1000 cercaires de *S. mansoni* selon la technique décrite par Smithers et collaborateurs (1972). Les rats sont saignés et tués entre le 40 ième et le 50 ième jour d'infestation afin d' obtenir d'une part le sérum riche en IgE spécifique du parasite, et d'autre part les macrophages péritonéaux chargés en IgE.

Isolement et préparation des macrophages

a Les macrophages alvéolaires humains

Le liquide de lavage broncho-alvéolaire est filtré à travers une

compresse stérile retenant le mucus, le filtrat est centrifugé à 250g , 10 min à 4°C, le culot cellulaire est lavé 3 fois par mise en suspension avec 50 ml de milieu frais, et centrifugation dans les mêmes conditions, puis, le culot est repris dans un milieu HBSS (Hanks balanced salt solution) ou MEM (Minimal Essential Medium) supplémenté par 15 % de SVF. La numération cellulaire est établie au microscope sur une cellule de Thoma. La formule cellulaire est déterminée par cytocentrifugation sur lame, 2 min à 500 tr/min (Cytospin Shandon), fixation et coloration au Giemsa. La viabilité cellulaire est appréciée au bleu trypan (en général 90 à 95 % des cellules sont vivantes).

Le culot cellulaire remis en suspension est ajusté à la concentration finale de $1,5 \times 10^6$ cellules / ml puis il est aliquoté à raison de 2 ml par boîte de pétri (35 mm de diamètre, Falcon S A) et mis à l'étuve (37°C air humide 5 % CO₂). Après 2 heures d'incubation, les boîtes sont lavées trois fois avec du milieu frais, les cellules adhérentes sont constituées par plus de 95 % de macrophages. Les mastocytes sont absents des cultures.

b Les macrophages péritoneaux de rats

L'animal étant anesthésié , on le saigne à l'oeil , au niveau du sinus rétro-orbitaire afin de récupérer le sérum. Après la mort de l'animal , on effectue une dissection de la peau abdominale sans entamer le péritoine . On injecte dans ce dernier une solution comprenant :

20 ml de MEM (Minimal Essential Medium, Institut Pasteur Production) :
milieu de Eagle MEM à base Earle (en mg) :

NaCl	6800,0
KCl	400,0
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	140,0
glucose	1000,0
CaCl ₂	200,0
NaHCO ₃	2200,0
glutamine lyophilisée	150
solution bicarbonatée à 55 %	: 20 ml
H ₂ O QSP	500ml

Aux 20 ml injectés à l'animal, sont ajoutées 2500 unités de calciparine (forme commerciale de l'héparinate de calcium) soit 0,1 ml de calciparine (25 000 UI/ampoule de 1 ml, Laboratoire Choay, Paris).

Après agitation de l'animal, cette solution est réaspirée et placée à 4°C. La suspension est centrifugée à 2000 g pendant 10 min.

Les cellules sont remises en suspension à une concentration de 1 à 3 10^6 cellules par ml dans une solution de MEM comportant 15 % de sérum de rat.

Cette suspension est déposée dans des boîtes de pétri en plastique de 35 mm de diamètre, à raison de 1,5 ml/boîte (boîte de culture Nuclon Delta SI, Nunc, Roskilde, Danemark), et incubée pendant 2 h à 37 °C dans un milieu ambiant contenant 95 % d'air et 5 % de CO₂. Après ce délai, l'adhérence des macrophages péritonéaux est obtenue et les cellules non

adhérentes sont éliminées en lavant les boîtes trois fois avec 1 ml de MEM .

Les cellules sont alors :

- soit remises en culture,
- soit décrochées par deux fois 1 ml de Hanks Wallace (HW)

NaCl 8,00 g/l

KCL 0,40 g/l

CaCl₂, 2 H₂O 0,25 g/l

MgSO₄, 7 H₂O 0,06 g/l

NaHCO₃ 0,98 g/l

glucose 1,00 g/l

H₂O QSP 1000 ml à pH 7,7.

2 Les monocytes humains

Origine

Prélèvements de sang calcipariné, du CRTS (donneurs sains).

Préparation

1 Méthode au dextran:

Laisser décanter le sang calcipariné avec 4,5 % de dextran (Sigma) dans une seringue pointée vers le haut, environ 3/4 d'heure; Plier l'aiguille à 45° et récupérer doucement le plasma . Ajouter

6 volumes de MEM pour un volume de plasma. Centrifuger à 120 g 15 min.

Reprendre le surnageant, centrifuger à 1000 g 10 min. Mettre en culture en MEM/PS + 10 % de SVF (étuve 37° C, 5 % de CO₂).

2 Méthode au Ficoll :

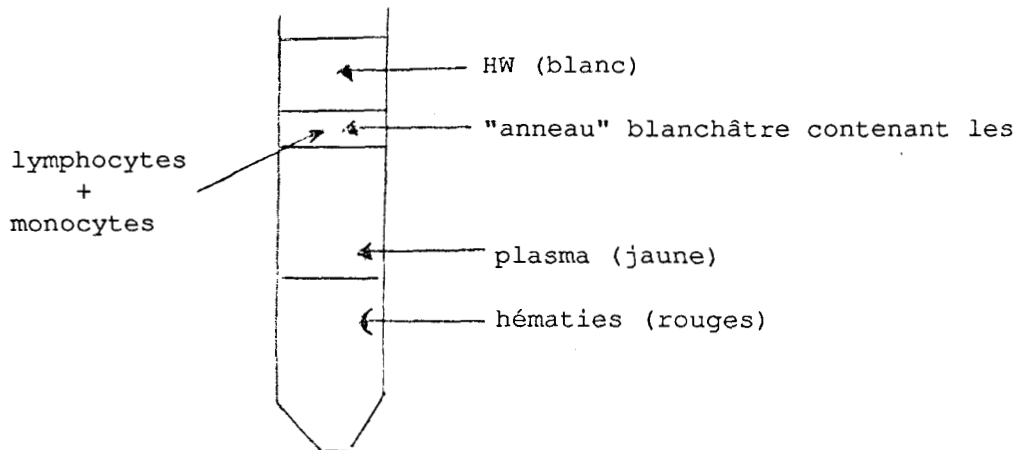
Ficoll-Paque (Pharmacia, Sweden).

Diluer le sang cacipariné au 1/2 en PBS ou HW.

Déposer sur 15 ml de Ficoll-Paque goutte à goutte, 45 ml du sang dilué.

Centrifuger 1700 g à + 4° C,

Reprendre à l'interface "l'anneau"



Après avoir récupérer les lymphocytes et les monocytes faire 2 lavages en MEM/PS (centrifuger 2000 g, 10 min à 4° C), puis mettre en culture en MEM/PS + 10 % SVF (étuve à 37° C , 5 % de CO₂) en boîte de culture plastique (Nunc) (diamètre des alvéoles variable

selon la manipulation). Après 2 h, éliminer les lymphocytes non adhérents contenus dans le surnageant.

Décrocher les monocytes en plaçant les boîtes sur de la glace, par jets répétés sur les cellules, de milieu MEM glacé avec une pipette automatique.

Faire une cytocentrifugation (2 min à 500 tr/min Cytospin Shandon) et une coloration au Giemsa, pour vérifier la formule cellulaire (95 à 98 % de monocytes en général). Numérer sur cellule de Thoma.

3 Les plaquettes.

Origine des plaquettes utilisées:

a Plaquettes de rats

Les rats utilisés sont les mêmes que pour les macrophages.

Rats sains

Ils fournissent les plaquettes témoins, ainsi que celles qui sont sensibilisées passivement par le sérum de rats infestés.

Rats infestés

De la même façon que précédemment, ils sont saignés entre le 40 et 50 ième jour d'infestation pour les plaquettes immunes.

b Plaquettes humaines :

Sujets sains

Donneurs volontaires au sein du laboratoire, ne présentant aucune pathologie allergique ou asthmatique et dont le taux d'IgE a été vérifié.

Sujets allergiques ou asthmatiques

Donneurs choisis sur des critères cliniques dans le service hospitalier du Professeur TONNEL A.B. (Hôpital Calmette, CHR de Lille).

Isolement et préparation des plaquettes:

a Les plaquettes de rat

L'animal étant anesthésié, la saignée s'effectue à l'oeil au niveau du sinus rétro-orbitaire. Dans ce cas le sang est prélevé sur calciparine 100 µl pour 3 à 4 ml de sang. Il est ensuite centrifugé pendant 10 min à 600 g. On récupère le plasma riche en plaquettes (P.R.P.) qui est alors centrifugé à 2000 g. Le culot

obtenu est resuspendu en HW. La suspension est ensuite centrifugée à 2000 g 10 min (Patscheke H. 1981).

Le culot est resuspendu à son tour à l'aide d'un volume de HW ou de MEM adapté à la concentration plaquettaire désirée et à l'expérimentation envisagée.

b Plaquettes humaines

Le sang (6 volumes) est prélevé sur anti-coagulant citraté et glucosé (ACDA, 1 volume). L'isolement des plaquettes se fait à température ambiante. Le PRP est obtenu après centrifugation à 120 g pendant 15 min. Après addition de PGE1 (100 nM), le PRP est centrifugé à 2000 g 15 min. Le culot plaquettaire est repris en tampon de lavage : acide citrique 36 mM, glucose 5mM, calcium 2mM, magnésium 1mM, sérum albumine bovine 0,35 %, PGE1 (100mM) pH 7,4. Trois lavages sont réalisés à 2000 g 15 min.

Les plaquettes sont alors soit reprises en tampon de réaction ou en HW pour les expériences de chimioluminescence; (voir après), soit en milieu de culture: milieu minimum essentiel (MEM) complété de pénicilline (1000 UI/ml) et de streptomycine (50 µg/ml) pour les test de cytotoxicité.

Tampon de réaction des plaquettes:

NaCL 137mM, KCL 2mM, NaHCO₃ 12mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, CaCL₂ 2H₂O 0,3 mM, MgCL₂ 6 H₂O 1 mM, Glucose 5,5 mM, HEPES 5 mM QSP 1000 ml, pH 7,4; ajouter extemporanément de la B.S.A.: 0,35 g/100 ml.

TESTS FONCTIONNELS

Tests de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules in vitro

I Dépendant des IgE

1 Macrophages

On incube 3 heures une suspension de macrophages (2×10^5) en plaque de microtitration (Falcon), afin de n'avoir que des macrophages adhérents, pour un volume final de 200 µl. Les cellules sont incubées une nuit en MEM avec 10 % de sérum sain. Puis les sérums immuns ou allergiques (5 à 20 % selon les cas) sont préincubés 6 h avec les cellules effectrices (afin " d'armer" les macrophages par les IgE).

Le modulant est en général préincubé 30 min, avant d'ajouter 50 schistosomules "peau" par puits. L'incubation dure 18 h à 24 h à l'étuve à 37° C 5% de CO₂. Les schistosomules morts sont

entourés de macrophages. La détermination du pourcentage de cytotoxicité est estimée par le rapport :

$$\frac{\text{nombre de schistosomules morts}}{\text{nombre total de schistosomules}}$$

2 Plaquettes

Les plaquettes sont reprises en MEM/PS à raison de 75×10^6 (plaquettes de rat) ou 150×10^6 (plaquettes humaines) par alvéole, pour un volume final de 200 μ l, dans des plaques de culture 96 puits (Falcon) ou elles sont préincubées 30 min avec le modulant. Après quoi on ajoute 20 % de sérum, 50 schistosomules par alvéole, qsp 200 μ l de milieu. Le $Fc\gamma$ RII des plaquettes n'a pas besoin d'une préactivation aussi longue que les macrophages. La mortalité des larves de schistosomes est évaluée après 24 h de la même façon que pour les macrophages (Morts/Total). Le pourcentage est significatif pour chaque type de cellules effectrices pour une valeur supérieure à 25 %.

II Dépendant de l'aspirine

a Plaquettes d'asthmatiques sensibles à l'aspirine (ASA)

Elles sont préparées de la même façon que les plaquettes de sujets sains ou de sujets allergiques.

b Test de cytotoxicité aspirine dépendant

On répartit 150×10^6 plaquettes ASA par alvéole (Falcon) en MEM/PS. Elles sont incubées avec ou sans nédocromil de sodium, à différentes concentrations allant de $2,24 \times 10^{-12}$ M à $2,24 \times 10^{-5}$ M. Après quoi, on ajoute 20 % de sérum du donneur des plaquettes (sérum autologue), l'aspirine 0,6 mM (Catalgine forte verte Théraplix). 50 schistosomules par alvéole pour un volume final de 200 μ l. La mortalité est évaluée après 24 h, (Morts/Total).

AUTRES PARAMETRES METABOLIQUESI CHIMIOLUMINESCENCE

Pour étudier le relargage des métabolites de l'oxygène par les macrophages et les plaquettes, nous avons utilisé la chimioluminescence en système luminol-luciférine pour les plaquettes, et en système lucigénine pour les macrophages.

REACTIFS:

Hank's Wallace (Hw):

.NaCL	8,00 g/l
.KCL	0,40 g/l
.(CaCL ₂)2,H ₂ O	0,25 g/l
.MgSO ₄ ,7 H ₂ O	0,06 g/l
.NaHCO ₃	0,98 g/L
.glucose	1,00 g/l
H ₂ O	QSP 1000 ml à pH proche de 7,7 .

Luminol : 5 amino 2,3 dihydro 1,4 phtaléine dione (PM : 177,16, Serva, Heidelberg)

2mg de luminol/ml de diméthyl sulfoxyde (0,0122 M) à diluer au 1/10 au moment de l'emploi.

Luciférine : acide D-(-)2(6')hydroxy-benzothiozoly1 ,thiazoline -4-carbonique,PM : 280,27 (Boehringer, Mannheim)

Peroxydase de Raifort: de type I ou HRP (Horse Radish Peroxydase) (Sigma, St Louis Missouri)

90 unités par mg de solide. Solution à 1 mg de HRP/ml de HW.

Lucigenine: bis N méthyl acridinium nitrate PM : 510 (Sigma, St

Louis Missouri)

Solution à 400 µg/ml.

IgG mouton anti-IgE humaine (Cappel, West Chester) à diluer dans 5 ml d'eau stérile et à congeler. 20 mg de protéines / ml.

IgG mouton anti-IgE de rat (Miles, Indiana), préparée chez le mouton contre l'ascite de rat IR 162, à reconstituer dans 2 ml d'eau stérile gardée à + 4°C.

PROTOCOLE

a Chimiluminescence en luminol-luciférine :

La production de métabolites de l'oxygène par des cellules est quantifiée par chimiluminescence selon la technique dérivée de celle décrite par Whitehead (1983), utilisant le couple luminol-luciférine. La technique décrite par cet auteur permet le dosage immuno-enzymatique de la peroxydase à condition de fournir de l' H_2O_2 au milieu.

La méthode utilisée par notre laboratoire inverse les constituants puisqu'elle mesure l' H_2O_2 produite par les cellules

en présence d'une dose fixe de peroxydase ajoutée au mélange réactionnel. Les photons captés par un appareil de chimioluminescence (nucléotimètre 107, Interbio, 95599 Le Thillay), couplé à un enregistreur donne en continu la coube d'émission de lumière.

Les tubes à passer dans l'appareil contiennent 200 μ l d'une suspension contenant :

- 50 μ l de suspension plaquettaire à la concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml
- 37 μ l de luminol (418 μ M final)
- 37 μ l de luciférine (30 μ M final)
- 28 μ l de tampon HW
- 10 à 5 μ l de stimulant (anti-IgE)
- 40 μ l de HRP à 1 mg/ml diluée au 1/4 (720 mU final)

b Chimioluminescence en lucigénine

Cette méthode, en contraste avec la précédente, ne nécessite pas d'activité peroxydasique pour la production de lumière, ce qui est intéressant pour les macrophages qui ont un taux bas de peroxydase. La réponse à la lucigénine est totalement supprimée par la superoxyde dismutase, suggérant donc une dépendance vis-à-vis de la production d'anions superoxydes (Williams 1981, Muller 1984). La technique utilisée est celle décrite par Williams (1981)

Les tubes sont passés dans le même appareil que précédemment et contiennent :

250 µl de suspension cellulaire ainsi répartie :

- 200 µl de macrophages à la concentration de 10^6 /ml préincubés 10 à 15 min à 37° C au BM sec.
- 20 µl de lucigénine à 400 µg/ml (0,063 mM final)
- 20 µl de HW ou de modulant à la concentration voulue.
- 10 à 5 µl de stimulant (anti-IgE) .

II DOSAGE DE LA B-GLUCURONIDASE

1 Activation des macrophages

Elle se réalise en milieu Hank's supplémenté avec 15 mM d'HEPES (Sigma St Louis, USA) afin de stabiliser le pH à 7,4. Les macrophages (immuns ou passivement sensibilisés) sont incubés 30 min en présence du modulant (nédocromil ou DSCG) ou non (témoin). Après lavage on ajoute de l'anti-IgE ou de l'allergène durant 30 min. L'anti-IgE utilisée à la concentration de 15 µl/ml est une fraction d'IgG d'un immun sérum de mouton (Cappel, Flobio SA, 92400 Courbevoie). Les allergènes employés à la dose de 500 ng/ml sont soit l'extrait de *Dermatophagoides pteronyssinus*, soit l'extrait de pollens de 5 à 12 graminées (Laboratoire des Stallergènes), (si il s'agit de macrophages alvéolaires humains de sujets allergiques au DP ou aux graminés).

Les surnageants sont recueillis, puis les macrophages qui, eux, sont lysés au Triton X 100. (0,05 %) en Tris-MgCl₂ 10⁻² pH 7,2.

2 Dosage de la β -glucuronidase (Szasz 1967)

Cette enzyme lysosomiale a été choisie comme marqueur de dégranulation du fait de la simplicité de son dosage et de la quantité importante synthétisée par le macrophage.

. 0,2 ml d'échantillon :

- surnageant (B-glu "relarguée")
- macrophage lysé (B-glu "synthétisée")

sont ajoutés à :

. 0,1 ml de substrat (para-nitrophenyl β -glucuronide, Boehringer) (315 mg/ml) dissous dans du tampon acétate:0,1 M pH 4,5,

plus :

. 0,7 ml du même tampon acétate .

Après 4 h d'incubation à 37° C, la réaction est stoppée par 2 ml de tampon carbonate-glycocolle (respectivement 200 mM et 320 mM) puis mélangé jusqu'à obtention de pH 9,5. La présence de β -glucuronidase se traduit par l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm. Après étalonnage de la réaction, l'activité s'exprime en nM de substrat hydrolysé par heure pour 10⁶ cellules .

VISUALISATION DES TOXOPLASMES DANS LES CELLULES HELA

- Mettre en culture pendant 3 jours des cellules Hela dans du MEM/PS + 10 % de sérum de veau nouveau né (SV), jusqu'à l'obtention d'un tapis confluent.
- Infester les cellules à raison de 3 à 5 tachyzoïtes par cellule (soit 200 000 cellules Hela par alvéole de plaque Nunc à 24 alvéoles de 8 mm de diamètre, et 1 million de tachyzoïtes).
- Laver après 2 heures en MEM/PS + 10 % S.V.
- Laisser proliférer les tachyzoïtes à l'intérieur des cellules 24 heures.
- Laver 2 fois en PBS pH 7,4 stérile.
- Fixation : Il en existe deux types :
 - a) au glutaraldéhyde 2,5 % en PBS 10 min à 4° C. Laver au PBS, et à l'eau, sécher et colorer.
 - b) à l'hypochlorite d'acridine 0,4 % (Sigma) dans l'éthanol 50%, 15 à 30 min à 4° C. Laver en PBS, et à l'eau; puis sécher et colorer.
- Coloration

Préparer extemporanément du Giemsa 10 % en PBS pH 7,4. Colorer 20 à 30 min. Rincer en PBS, puis à l'eau distillée, et sécher.
- Observation au microscope, obj.x 40 ou immersion .

MESURE DE LA PRODUCTION D'IL1 PAR DES MACROPHAGES
STIMULES PAR LE LF 1695

La production d'IL1 est mesurée biologiquement grâce à son effet comitogène avec la PHA sur les thymocytes de souris de race C3H/HeJ. Ces animaux sont choisis jeunes (4 à 8 semaines) afin de recueillir les thymocytes par broyage du thymus.

Les cellules après lavages sont remises en suspension avec du RPMI contenant 10 % de SVF, 2 mM de L-glutamine, $2 \cdot 10^{-5}$ M de 2-mercapto-éthanol et 15 mM d'HEPES, à la concentration de $30 \cdot 10^6$ cellules par ml. La culture est réalisée en microplaque de 96 puits (Nunc). On répartit par puits 50 μ l de suspension cellulaire, 50 μ l de solution de PHA (Difco, Detroit, Michigan, USA) (0,25 μ g/ml) à la dilution de 10^{-3} , ou de milieu, 100 μ l de la dilution de surnageant à tester ou de l'IL1 de référence. Les surnageants de macrophages stimulés ou non par le LF 1695, sont classiquement testés à plusieurs dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, ...final) avec et sans addition de PHA. Le témoin positif est soit un surnageant de cellules spléniques de rat stimulé par de la Con-A, soit de l'IL1 humaine semi-purifiée obtenue à partir de monocytes que l'on utilise à la dose de 1 U/puits. Après 3 jours de culture à 37°C 5 % de CO₂ et en atmosphère humide, la prolifération des thymocytes est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée (18 500 Bq/puits). Après 6 h de contact les

cellules sont lysées et les brins d' ADN sont recueillis sur filtre; ils sont alors séchés et la radioactivité est mesurée après addition de 4 ml de scintillateur (Lipofluor) grâce à un compteur β (à scintillation en milieu liquide). Les résultats sont exprimés en unités d'IL1, une unité représentant la quantité minimale induisant une incorporation égale à 50 % du maximum de radio-activité incorporée.

Le broyage d'un thymus de souris permet d'obtenir 100 à 200 10^6 thymocytes. L'activité IL1 directe des macrophages stimulés avec le LF 1695 a été testée après dialyse dans les mêmes conditions.

R E S U L T A T S

Les modulants exogènes que nous avons étudiés sont de deux types. D'une part, trois immunostimulants: le LF 1695 des Laboratoires Fournier à Dijon, le Pind-Avi des laboratoires Delalande à Paris, et l'imuthiol de l'Institut Mérieux à Lyon, qui ont été testés dans différents modèles parasitaires tels que la bilharziose, la toxoplasmose, la filariose à *Brugia malayi* et la maladie de Chagas. D'autre part, un immunoinhibiteur, le nédocromil de sodium des laboratoires Fisons à Loughborough (G.B.), qui a été testé à la fois dans un système dépendant de l'IgE et dans l'asthme à l'aspirine.

A LES IMMUNOSTIMULANTS.

L'utilisation des immunostimulants est en premier lieu envisagée dans des situations de déficit immunitaire (DI). Il peut s'agir de DI primitif, le plus souvent il s'agit de DI secondaires dûs à une malnutrition, à une maladie hématologique ou métabolique, à une intervention chirurgicale ou à des infections virales, bactériennes ou parasitaires.

Selon les cas, l'objectif est de prévenir ou guérir des infections ou promouvoir une réponse vaccinale.

Dans d'autres cas les immunostimulants sont administrés en dehors de tout DI à titre pharmacologique pour stimuler tel ou tel type de cellule (T, NK dans les tumeurs, T suppressives dans

l'autoimmunité...)).

Avant de déterminer l'activité clinique d'une substance à activité immunostimulante, il convient d'avoir recours à des tests de protection globale visant une activité soit anti-bactérienne, soit anti-virale, soit anti-tumorale, soit anti-parasitaire.

C'est donc la nécessité de cette étape qui a conduit à étudier plusieurs molécules, en l'occurrence le LF 1695.

I LE LF 1695

Cette molécule dérivée du benzoyl phényl pipéridine, provenant des laboratoires Fournier à Dijon (voir matériel et méthodes), a été testée pour son effet immunostimulant *in vitro* sur différentes populations cellulaires: prothymocytes, lymphocytes, cellules NK, (Pascal M. 1982) et des cellules endothéliales, et *in vivo* sur différentes infections chroniques, bactériennes ou virales, ayant pour origine un déficit immunitaire cellulaire (Lagrange, Othmane, 1985, Touraine 1986).

L'exploration du domaine parasitaire n'avait pas encore été faite. Etant donné l'intérêt d'une immunothérapie dans ce type d'infection, il nous a semblé intéressant d'étudier le LF 1695 sur les mécanismes effecteurs de l'immunité à l'encontre des helminthes. Les processus cytotoxiques identifiés au cours de la

schistosomiase impliquent la synergie de facteurs cellulaires et humoraux (Capron A. 1985).

Les résultats vont rendre compte de l'effet pharmacologique du LF 1695 sur les propriétés cytotoxiques de deux types de populations cellulaires effectrices : les phagocytes mononucléés et les plaquettes, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que son action sur différents paramètres métaboliques tels que : la β -glucuronidase des macrophages et la production des métabolites de l'oxygène par les cellules, ainsi que celle des monocytes et plaquettes sanguines, quantifiée par chimioluminescence.

Le LF 1695 est solubilisé 2 à 3 heures à 40°C dans une solution physiologique à pH 3 pour son utilisation *in vitro*. Pour les expériences *in vivo* (chez l'animal), le produit est dissous dans de l'eau gommeuse à 3 % contenant 0,1 % de Tween 80 à la concentration de 0,625 μ g/ml (voir matériel et méthodes).

1 Cytotoxicité anti-parasitaire

L'incubation *in vitro* de macrophages péritonéaux de rats normaux avec du LF 1695 à la dose de 10 μ g/ml (dose qui induit une forte stimulation des enzymes lysosomiales), durant 24 heures, avant l'activation par 5 % (V:V) de sérum de rats immuns (j 42) accroît de 41 % l'effet cytocide des cellules effectrices au cours du test *in vitro*, par rapport aux macrophages non traités (table I).

EFFET DU LF 1695 POUR INDUIRE LA CYTOTOXICITE DES MACROPHAGES DE RATS CONTRE LA LARVE DE S. MANSONI *

Macrophages de rats normaux	Addition des larves de S. mansoni		
	5 % de sérum rat immun J35		5 % de sérum rat normal
sans LF 1695	25 $\pm$ 2,5	55 $\pm$ 4,8	5 $\pm$ 2
LF 1695 (10 ug/ml) (incubation 24 h)	40 $\pm$ 5,1	83 $\pm$ 3	12,5 $\pm$ 2,5

* Les résultats sont exprimés en % de cytotoxicité (n = 8 expériences en duplicate)

TABEAU 1

Lorsque les macrophages péritonéaux proviennent de rats qui ont reçu 1 mg de LF 1695 en I.P., 3 à 4 jours avant d'être testés *in vitro* pour leur activité cytotoxique anti-schistosome, ils tuent *in vitro* jusqu'à 100 % les larves de schistosomes (figure 1). De la même façon, les plaquettes des animaux traitées par le LF voient leur propriétés cytocides augmenter *in vitro* (fig.1).

Des plaquettes humaines sont "stimulées" lorsqu'elles sont incubées 24 h avec le LF 1695 à la dose de 100 ng/ml. En effet lors des tests de cytotoxicité anti-schistosome *in vitro*. Ces plaquettes mises en présence de 5 % de sérum bilharzien (soit une dose sub-obtimale d'IgE spécifiques), ont un pouvoir cytotoxique supérieur à un lot de mêmes plaquettes qui n'ont pas été préincubées avec le LF 1695 ($p < 0,01$) (table II).

Les approches *in vitro* (tables I et II) et *ex vivo* (fig 1), nous encourageaient à poursuivre l'étude. En particulier les résultats obtenus *ex vivo* dans la mesure où les cellules effectrices ont été stimulées *in vivo* par la substance.

CYTOTOXICITE IgE-DEPENDANTE ANTI-SCHITOSOME APRES INJECTION EN I.P. D' 1MG DE LF1695

%DE CYTOTOXICITE

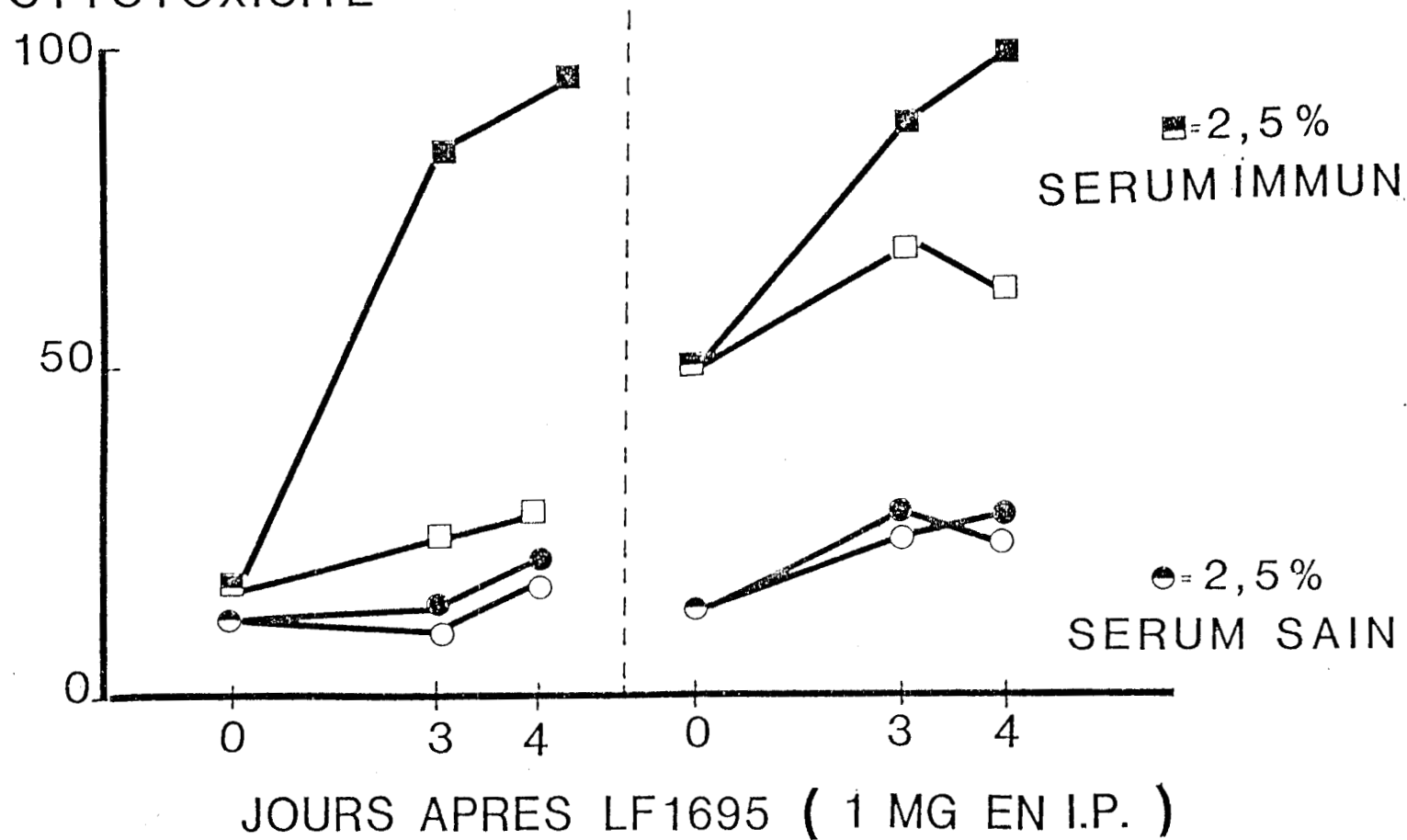


FIG. 1

EFFET DU LF 1695 POUR INDUIRE LA CYTOTOXICITE DE PLAQUETTES HUMAINES CONTRE LA LARVE DE S. MANSONI*

Plaquettes humaines	Sans LF 1695	Avec LF 1695 (100 ng/ml) (incubation 24 h)
+ 5 % de sérum humain	12,5 $\pm$ 2,5	23 $\pm$ 2
+ 5 % de sérum bilharzien	63 $\pm$ 5	88 $\pm$ 4

*Les résultats sont exprimés en % de cytotoxicité (n = 8 expériences en duplicate)

TABEAU 2

ACTION DU LF 1695 SUR L'IMMUNITE
HUMORALE
EFFICACITE DES SERUMS SUR DES
MACROPHAGES DE RATS NORMAUX

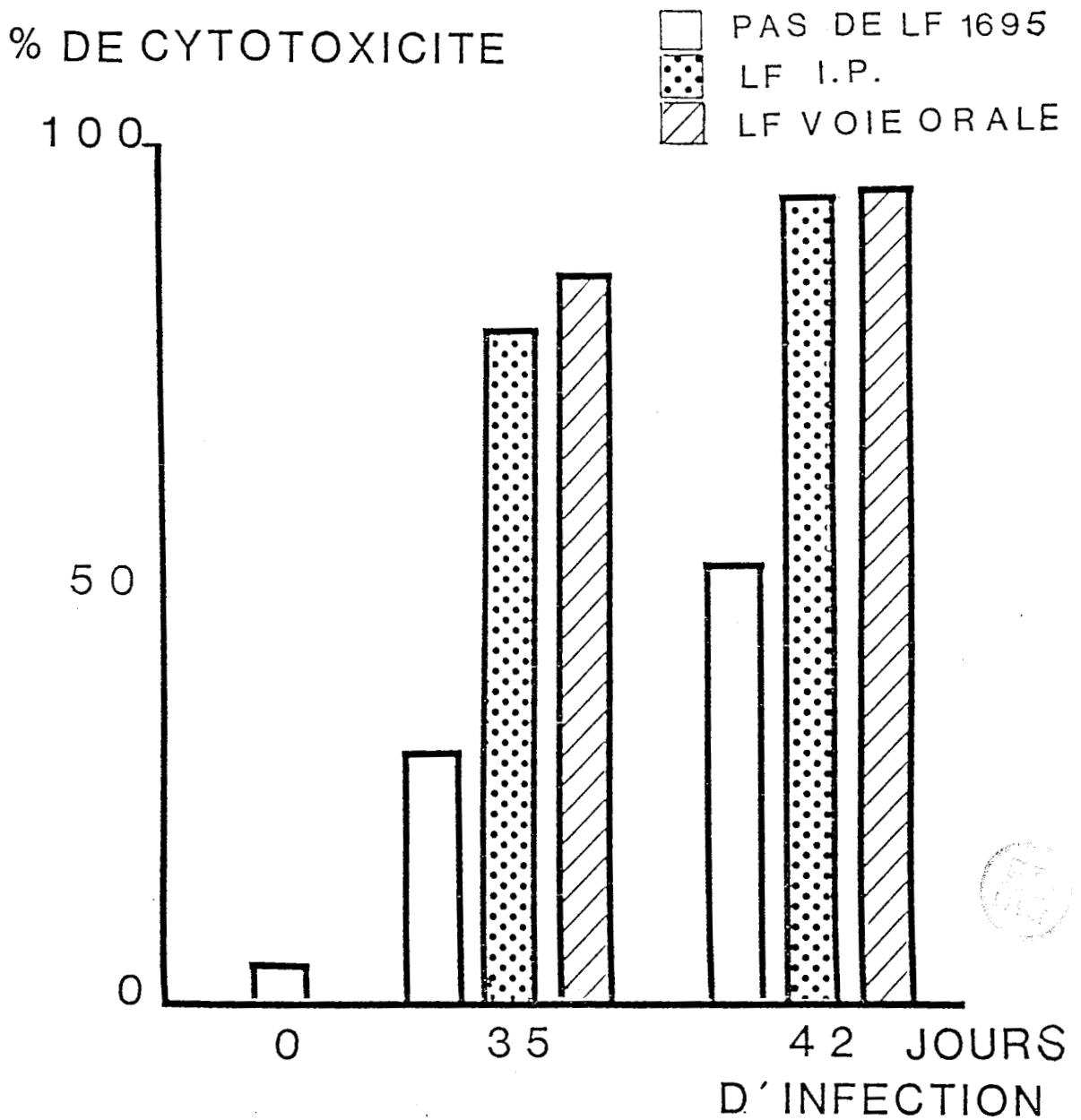


FIG. 2

2 Stimulation de l'immunité humorale

L'infection des rats Fischer par *S. mansoni* induit une élévation progressive du taux d'IgE spécifiques avec un maximum à j 42.

Le LF est injecté en I.P. à la dose de 3 mg, 1 fois par semaine entre le 7 et 35^{ième} jour après l'infestation à raison de 1000 cercaires par rat (lot de 5 rats). Les rats témoins sont seulement infestés (lot de 5 rats).

Dans une autre expérience, le LF 1695 est administré par voie orale, durant la même période de l'infection (entre le 7 et 35^{ième} jour), avec l'eau de boisson à la même dose (lot de 5 rats).

Il apparaît dans les deux situations, que les sérums des rats traités par le LF 1695, induisent une cytotoxicité plus élevée pour des macrophages de rats normaux à l'égard des schistosomules, que les sérums de rats infectés mais non traités par le LF 1695 (figure 2).

Un test comparatif du sérum prélevé au 32^{ième} jour chez les rats LF 1695 et chez les rats en eau physiologique révèle une plus forte activation des macrophages par une dilution donnée des sérums, l'effet étant très net à 5 % de sérum (fig A).

EFFET DU LF1695 SUR LA CYTOTOXICITE DEPENDANTE DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE RATS

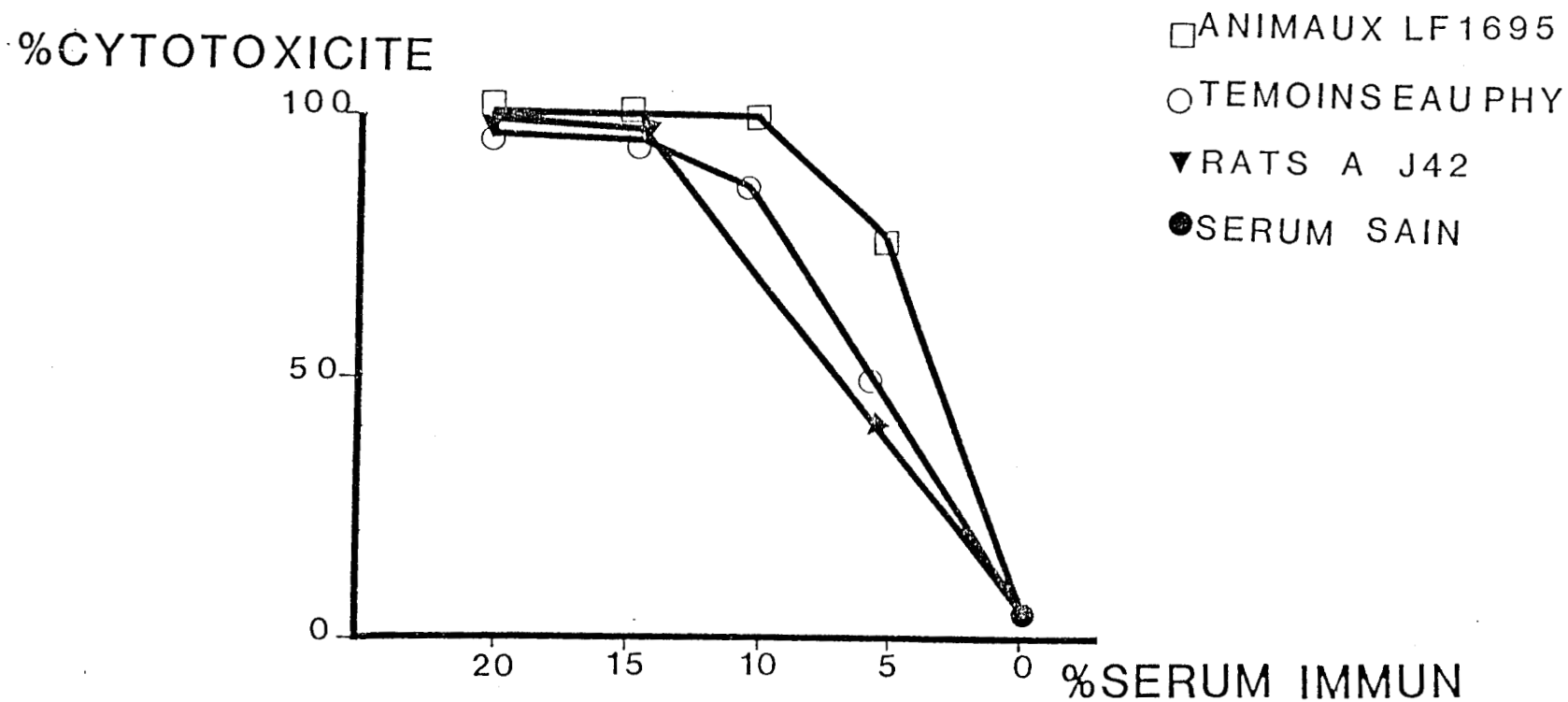


FIGURE A

3 Stimulation de l'immunité acquise

L'administration *in vivo* d'un immunomodulateur dans le cadre des infections parasitaires peut être envisagée au cours de l'immunité acquise à la suite d'une première infection par le schistosome. Le LF 1695 a été injecté en I.P. en doses hebdomadaires de 3 mg en eau physiologique pH 3 entre le 7^e et 35^{ième} jour (soit 5 injections), après une primo infection. A la 6^{ième} semaine, les rats sont réinfestés et les parasites parvenant à maturité au niveau du foie sont dénombrés 3 semaines après cette réinfection. Les résultats sont comparés aux vers comptabilisés chez les témoins soumis aux mêmes infections, mais ne recevant que de l'eau physiologique pH 3. La protection développée chez les rats expérimentaux et chez les rats témoins est calculée par rapport à une troisième série de rats ne recevant que la seconde infestation.

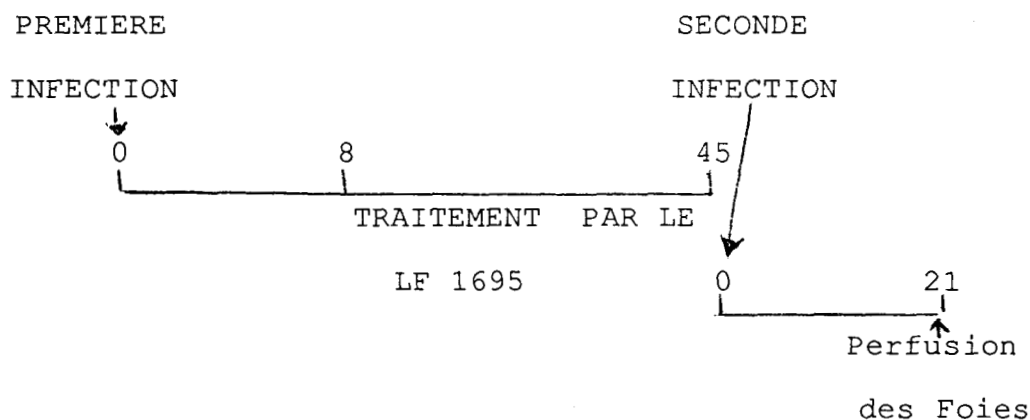


TABLEAU A

Séries :	Témoin			eau phy.			LF1695		
vers	♂	♀	i	♂	♀	i	♂	♀	i
rats									
a	34	13	26	6	20	5	7	4	8
b	36	14	16	7	8	4	6	15	6
c	41	30	37	23	31	18	14	9	14
d	22	15	15	18	16	31	6	11	12
e	33	24	38	15	13	18	-	-	-
totaux	78,8±22,5			46,6±22,3			28±7,4		
pourcentages	0			41			64		

Annotations : ♂ = mâles

♀ = femelles

i = immatures

Dans ces conditions alors que les rats témoins développent une immunité de 41 % les rats ayant reçu le LF 1695 présentent une immunité de 64 %.

Cet effet significatif de l'immunomodulateur corrobore l'efficacité supérieure des sérums des animaux traités, dans l'induction de la cytotoxicité des macrophages *in vitro* à l'égard de larves de schistosomes.

Le LF se révèle être un immunostimulant efficace du macrophage *in vitro* et améliore sensiblement le développement d'une immunité acquise contre les schistosomes, apparemment en accélérant la synthèse des anticorps anaphylactiques capables de rendre les cellules effectrices cytotoxiques.

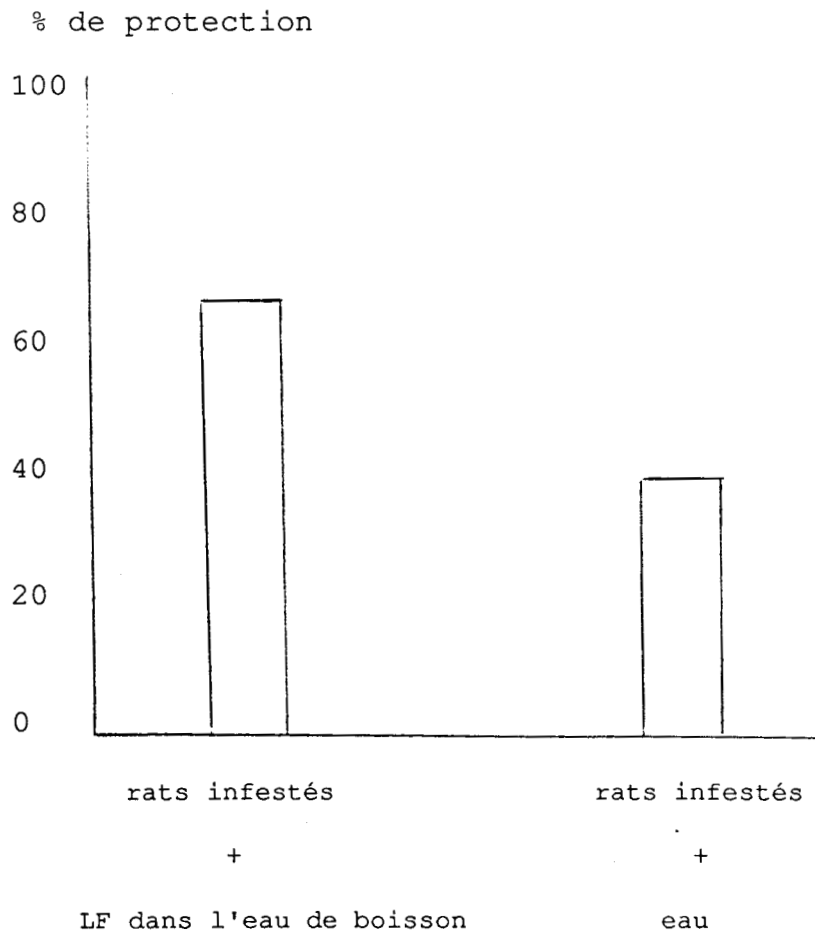
Le pourcentage de protection est calculé de la façon suivante :

$$\frac{T_e - T_t}{T_e} \times 100 = \% \text{ de protection}$$

Nous obtenons une protection significative (66,5 %) par rapport aux animaux non traités par le LF 1695 mais réinfectés (40 %);

L'immunostimulant augmente considérablement l'immunité acquise :

Efficacité in vivo du LF 1695 par voie orale à des rats sur l'immunité acquise contre *S. mansoni*:



B-GLUCURONIDASE CONTENUE DANS DES
MACROPHAGES PERITONEAUX DE RATS
APRES 24h D'INCUBATION AVEC :

nm P-NITROPHENOL/ 10^6
MACROPHAGES/HEURES

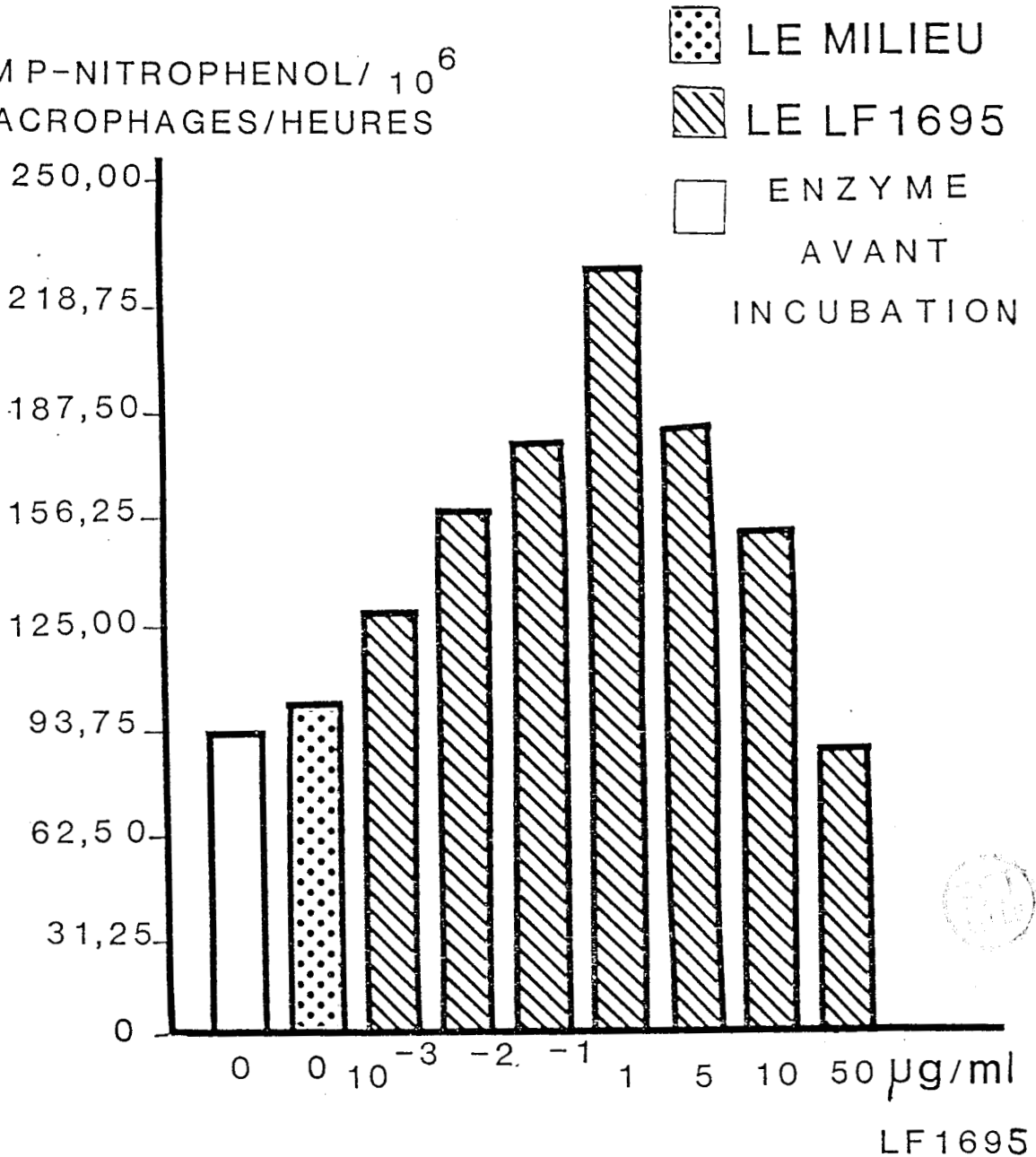


FIG.3

4 Enzyme lysosomale : β -glucuronidase:

L'incubation *in vitro* de macrophages péritonéaux résidents de rats Fischer sains dans une gamme de concentration de LF 1695 allant de 10^{-3} μ g à 50 μ g/ml pendant 24 h conduit à une forte stimulation intracellulaire d'enzymes lysosomales évaluées par le dosage de la β -glucuronidase. Cette augmentation est maximale à la dose de 1 μ g/ml et atteint 91 % (figure 3). Le LF 1695, en revanche, n'induit pas d'exocytose d'hydrolases acides pendant cette période, mais présente une certaine toxicité si on en juge à la lyse cellulaire constatée en microscopie optique (test au bleu trypan ou au diacétate de fluorescéine), par l'effondrement du taux intracellulaire de β -glucuronidase, et par l'augmentation de son taux dans le milieu. La stimulation intracellulaire observée en 24 h est déjà significativement quantifiable quelques heures après le début de la culture avec le LF 1695, comme le montre des expériences de compétition entre l'immunomodulant et un peptide inhibiteur du macrophage à l'étude dans notre laboratoire, le TKP (Thr-Lys-Pro) fragment de la chaîne lourde des IgG (Auriault C. 1985). Le peptide inhibe de 50 % environ l'augmentation de l'activité enzymatique induite par le LF 1695, c'est à dire une inhibition équivalente à celle obtenue avec les divers processus d'activation cellulaire utilisés au laboratoire.

EFFET DU LF 1695 SUR LA PRODUCTION D'IL₁ PAR DES MACROPHAGES DE RATS

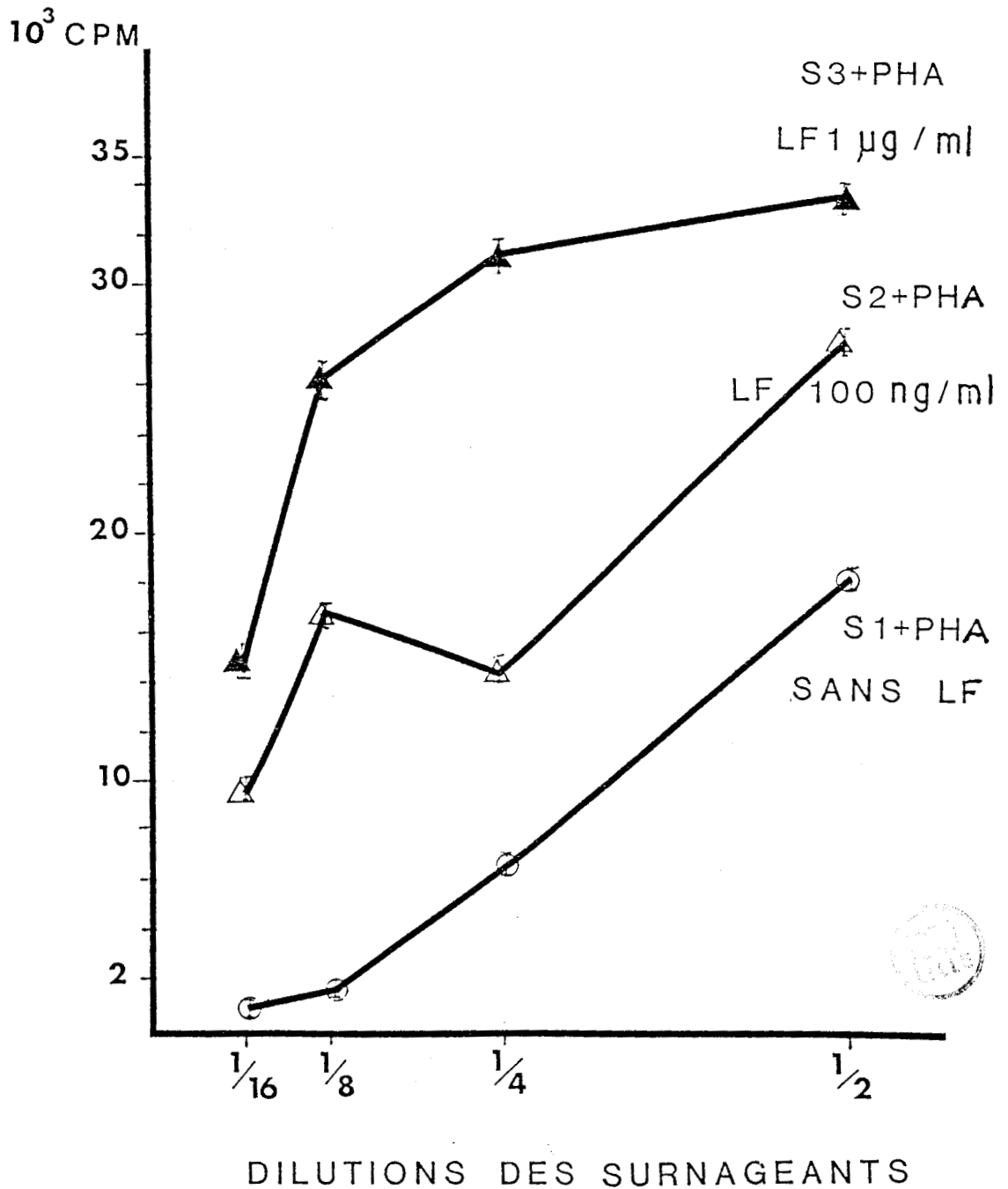


FIG. 4

5 Sécrétion d'IL 1

Des macrophages péritonéaux de rats incubés 24 h avec du LF 1695 augmentent la production d'IL1, induite par un mitogène (PHA 0,25 µg/ml) et mesurée par la prolifération de thymocytes murins (5×10^5 thymocytes dans 80 µl de RPMI) (voir matériel et méthodes). On constate un effet comitogène de la PHA et des surnageants (100 µl de la dilution à tester), de macrophages traités avec 1 µg de LF 1695 (figure 4).

6 Potentialisation du métabolisme oxydatif

Pour étudier la génération dépendante de l'IgE des métabolites de l'oxygène par des phagocytes mononucléés, la chimioluminescence par oxydation de la lucigénine est la meilleure méthode pour le dosage de l'anion superoxyde (Williams 1981) (voir matériel et méthodes).

Le traitement, *in vitro*, de macrophages péritonéaux de rats passivement sensibilisés par 5 % de sérum immun, par le LF 1695 aux mêmes doses que celles induisant l'augmentation de l'activité enzymatique de leurs lysosomes (c'est à dire 1 µg/ml et 100 ng/ml), potentialise la production d'anions superoxydes. (figure 5).

Des observations tout à fait similaires ont été faites avec des monocytes humains (voir préparation des monocytes dans le

CHIMIO-LUMINESCENCE DE MACROPHAGES DE RATS

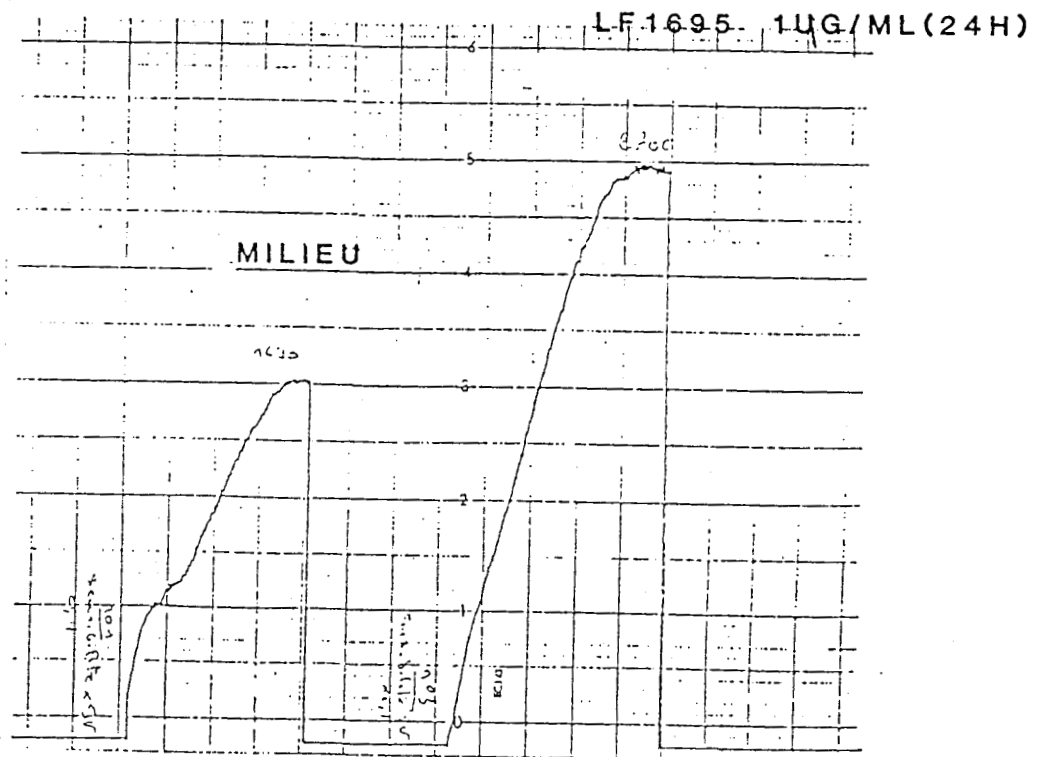


FIG. 5

CHIMIO-LUMINESCENCE DES MONOCYTES HUMAINS

APRES 24H D'INCUBATION

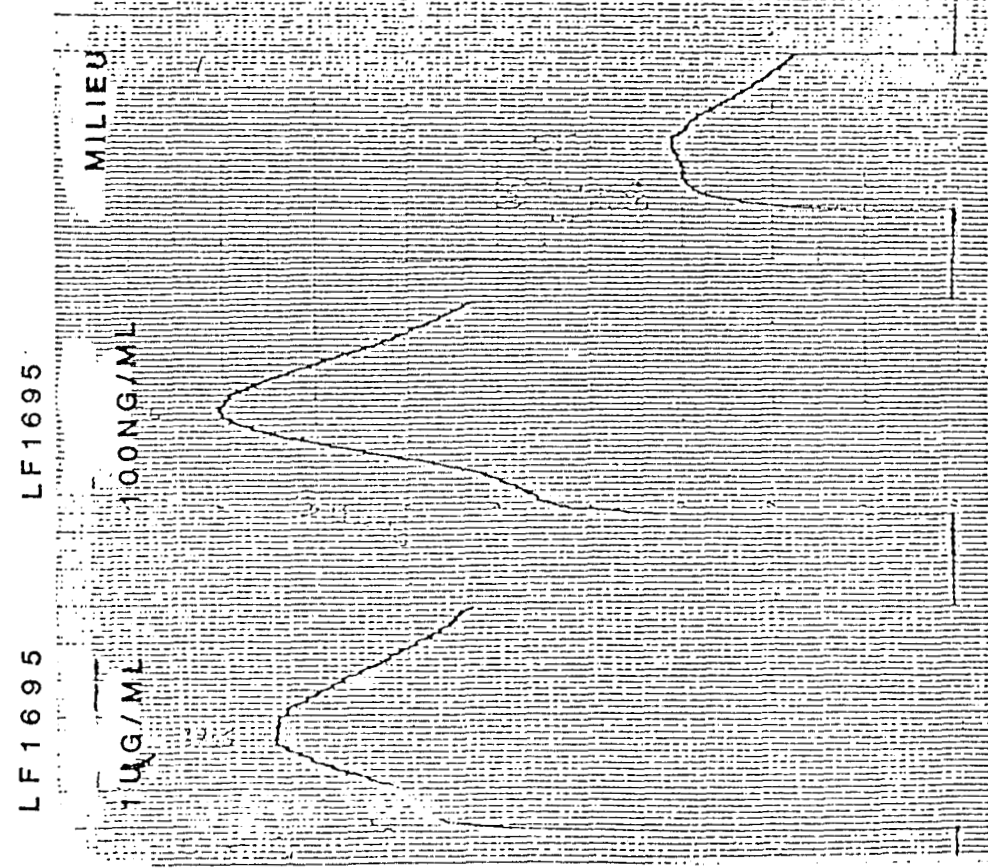


FIG.5

matériel et méthodes), passivement sensibilisés avec 5 % de sérum bilharzien. Il apparaît que la dose de LF 1695 qui potentialise le plus la production d'anions superoxydes, quantifiés par chimioluminescence, est également de 100 ng/ml. (fig. 5).

De la même façon, si on sensibilise passivement les monocytes par 5 % de sérum allergique et de l'anti-IgE humaine et qu'on les incube 24 h avec du LF 100 ng/ml, on constate lors du test de chimioluminescence une augmentation de la production des métabolites de l'oxygène.

DISCUSSION

Pour les infections bactériennes et virales, Renoux (1982), Lagrange (1985), Perrin (1985), ont décrit que le LF 1695 restaurait les systèmes immunitaires déficients, ou tout au moins augmentait les défenses immunes naturelles.

Les résultats rapportés ici, apportent de tout évidence que la substance a des propriétés immunostimulantes dans les helminthiases, et plus particulièrement ici dans la schistosomiase.

Au cours des infections expérimentales par *S. mansoni*, on constate chez les rats, en 6 semaines, une immunité acquise à la réinfection (Smithers et Terry 1965). Dans ce modèle d'infection, les animaux traités par le LF 1695, par voie orale

ou intra-péritonéale, ont une immunité acquise beaucoup plus efficace comparés aux rats infectés mais non traités par le LF.

Au cours de ces dix dernières années, des études sur les mécanismes effecteurs dans la schistosomiase, ont mis en évidence les mécanismes d'ADCC; qui représentent la base des procédés cytotoxiques vis-à-vis du parasite, (Capron A. 1982, Joseph 1983), en coopération avec les IgE.

Les phagocytes mononucléés et les plaquettes jouent dans ces mécanismes le rôle de cellules effectrices. L'action du LF 1695 sur ces cellules accessoires amplifie à la fois *in vitro* et *in vivo* leur effet cytocide à l'égard des parasites, en présence d'anticorps anaphylactiques à des doses suboptimales. Cela implique que les mécanismes d'ADCC peuvent supporter, en partie, la potentialisation des différentes propriétés métaboliques des cellules effectrices, principalement l'amplification de leurs capacités cytotoxiques, aussi bien dans le modèle expérimental qu'humain.

Par ailleurs, plusieurs paramètres métaboliques ont été stimulés : l'activité des enzymes lysosomiales des macrophages augmente significativement en présence de LF 1695, ainsi que la génération de métabolites de l'oxygène par les phagocytes mononucléés (chez le rat: macrophages péritonéaux, chez l'homme: monocytes).

L'action du LF 1695 *in vivo* stimule l'immunité humorale, principalement :

- la production d'anticorps anti-parasitaires spécifiques ; en effet, le LF augmente l'efficacité des sérums immuns avant la période d'immunité, ou par des doses suboptimales de sérum immun il potentialise l'immunité.
- Enfin sur des lymphocytes, il améliore la synthèse d'anticorps spécifiques.

Les précédentes investigations montrent que l'isotype IgE est le seul impliqué dans ces procédés de cytotoxicité (macrophages, plaquettes), alors que les IgG sont totalement inactives. (Capron A. 1983). Les IgE sont préférentiellement et plus rapidement produites grâce au LF 1695, durant l'infection par *S.mansoni* lorsque les animaux sont traités par le produit.

Finalement, l'augmentation de la production d'IL1 par des macrophages péritonéaux de rats incubés avec le LF 1695, (ce qui avait aussi été montré par des macrophages de souris (Pascal M. 1986), conforte l'idée d'une potentielle activité helper de la molécule sur la réponse immune, ou tout au moins, ouvre de nouveaux horizons sur la régulation de la réponse IgE lors d'infection par les helminthes.

Parmi les questions soulevées, les résultats de ce travail, ouvrent d'autres axes de recherche, en particulier quant à la

possible action du LF 1695 :

- sur le nombre et l'affinité des récepteurs pour l'IgE à la surface des cellules étudiés ici (macrophages et plaquettes)
- par la modulation de leurs activités par les lymphocytes (via les lymphokines),
- et sur la génération de molécules cytocides induites par l'IgE.

II L'Imuthiol et le Pind-Avi

a) Imuthiol

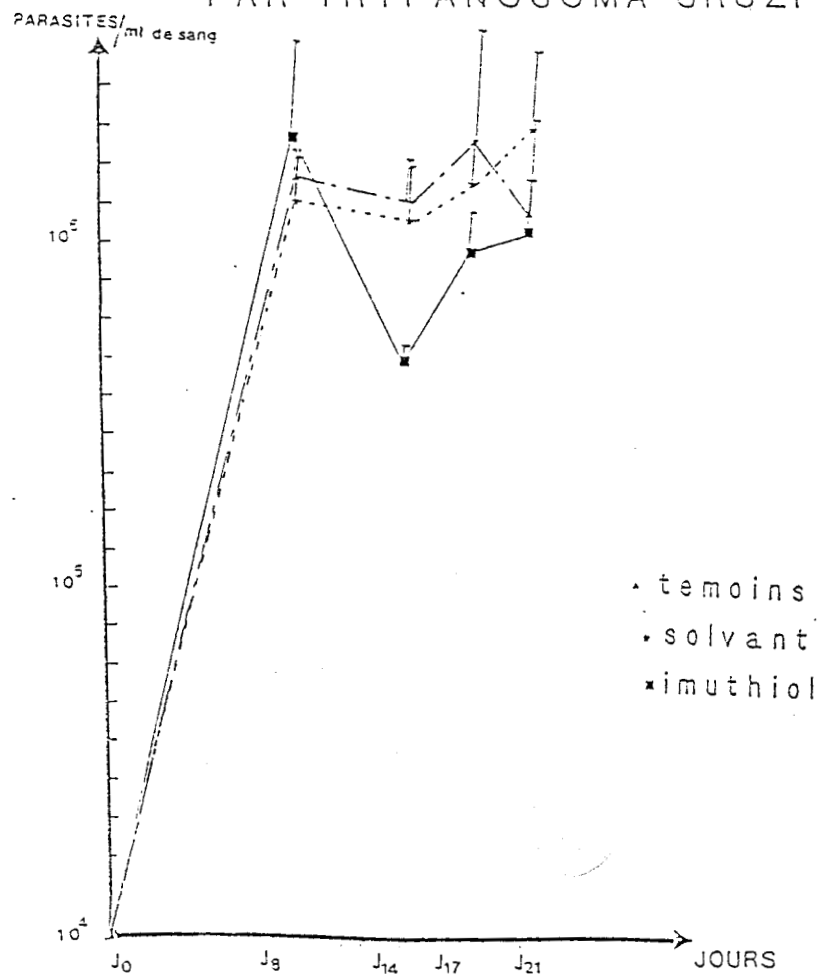
L'imuthiol ou DTC a été testé dans différentes parasitoses telles que la maladie de Chagas, la toxoplasmose (parasitoses intracellulaires), et la filariose : *B. malayi*, pour son action stimulante de l'immunité en vue d'applications thérapeutiques.

I Action de l'imuthiol sur des souris infestées par *Trypanosoma cruzi*

La souche de souris utilisée est Balb/C, l'infestation est de 10 000 trypanosomes/souris (en I.P.), nous avons utilisé 3 lots

Figure 1

ACTION DE L'IMUTHIOL SUR LA
PARASITEMIE DE SOURIS INFECTÉES
PAR *TRYPANOSOMA CRUZI*



de 10 souris :

- 1 lot témoin
- 1 lot témoin solvant seul : 200 μ l/souris
- 1 lot DTC : 250 mg/kg en I.P. une journée avant l'infestation "

Il y a réinjection du modulant à la même dose après chaque évaluation de la parasitémie : J9, J15, J18.

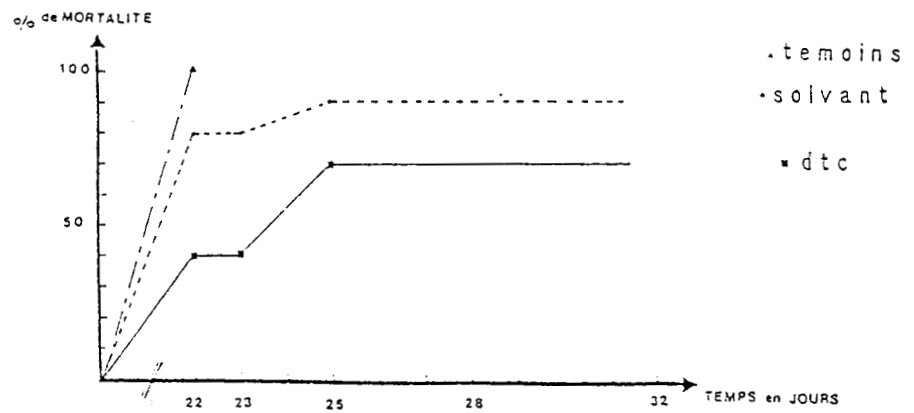
Il apparaît, d'après la figure 1, que le DTC n'empêche pas la parasitémie mais diminue fortement celle-ci (différence significative avec $p = 0,0003$) 15 jours après l'infestation. A partir de 3 semaines les souris commencent à mourir. Dans le lot traité par le DTC il reste 3 souris survivantes passées en phase chronique contre 1 pour le solvant : figure 2.

On constate donc une diminution de la parasitémie après 2 semaines de traitement, cependant elle n'est pas suffisante pour le passage de toutes les souris en phase chronique. Ces expériences devront être envisagées dans différentes autres conditions (souches de souris, doses, temps...). En ce qui nous concerne, nous nous étions fixés cette dose d'imuthiol (250 mg/kg), telle qu'elle est utilisée dans la littérature, pour ce modulant.

Après ces essais dans la trypanosomiase, nous avons testé l'imuthiol dans le modèle filarien.

Figure 2

POURCENTAGES DE MORTALITE DES SOURIS
TRAITEES PAR L'IMUTHIOL AU COURS DE
LA MALADIE DE CHAGAS



II Effet de l'imuthiol dans la filariose à *B. malayi*

Le DTC a été administré à la dose de 250 mg/kg à des mastomys 2 jours avant l'infestation, à raison de 80 larves infestantes L3 de *B. malayi* par mastomys.

Nous avons laissé évoluer 6 mois le développement de la maladie (voir matériel et méthodes) puis nous avons effectué des prélèvements pour mesurer la microfilarémie dans le sang. (Toujours aux mêmes heures de la journée pour éviter le phénomène de périodicité circadienne).

Cette première série d'expériences s'est réalisée en parallèle avec le PA 485 dont nous parlerons plus loin.

Nous avons 4 mastomys par lot : l'imuthiol étant dissous dans un solvant approprié , nous avons réalisé aussi un lot solvant seul.

Il apparaît (figure A) que le DTC ne semble avoir aucune action sur la microfilarémie, et qu'au contraire le solvant provoquerait une augmentation de ces microfilaires.

Dans une seconde expérience, l'imuthiol étant testé en parallèle avec le PA 485, les conditions sont les mêmes que lors de la première expérience, mais après chaque prélèvement (afin de compter le nombre de microfilaires), on réinjecte du médicament (250 mg). Il apparaît figure B, que le DTC augmente le nombre de microfilaires et est donc sans intérêt pour cette parasitose. Par contre le PA 485 inhibe pratiquement la microfilarémie. (Voir plus loin chapitre PA 485).

ACTION DE L'IMUTHIOL SUR LA MICROFILAREMIE (J-2)

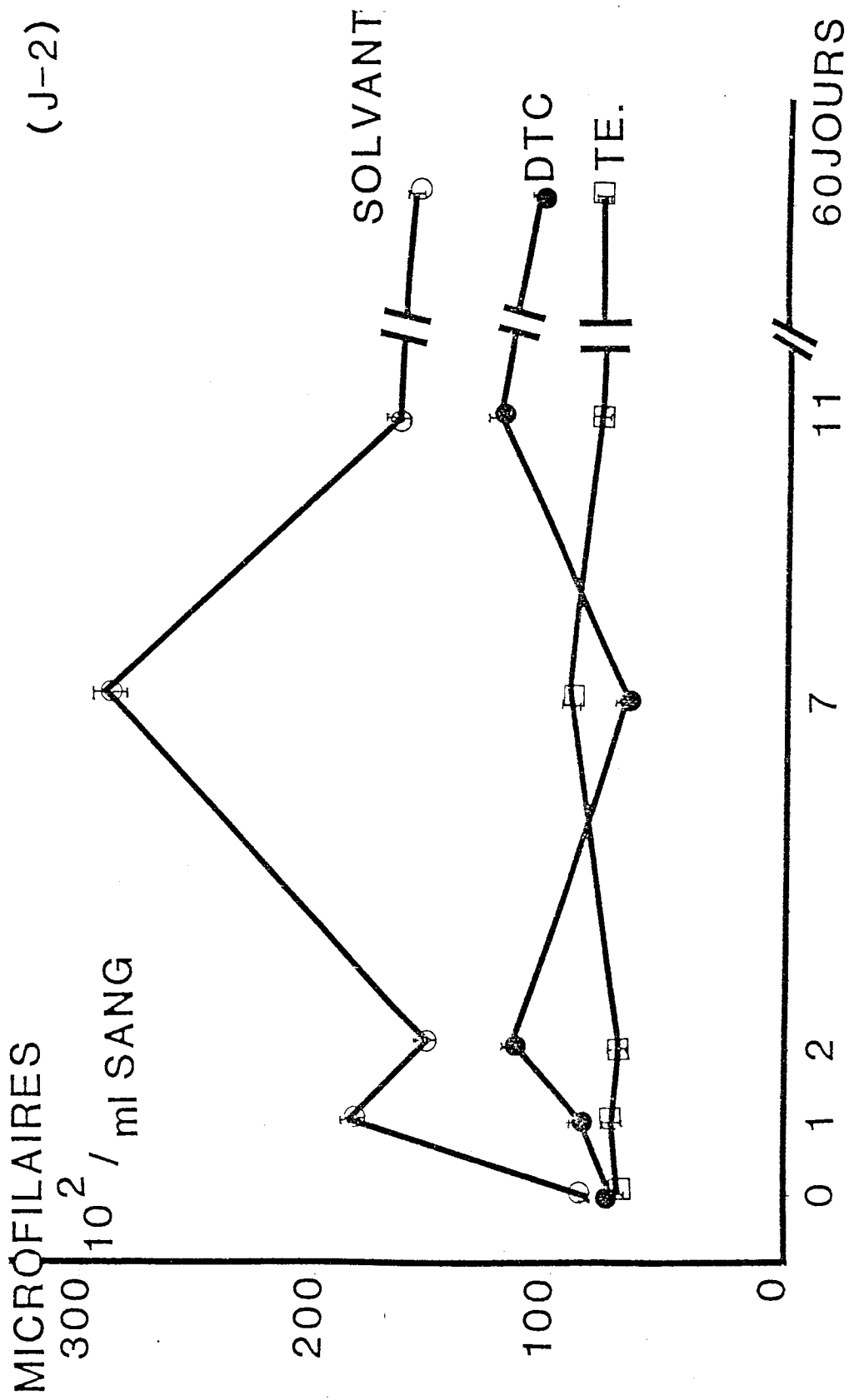


FIG.A

ACTION DU DTC ET DU PA485 SUR LA MICROFILAREMIE

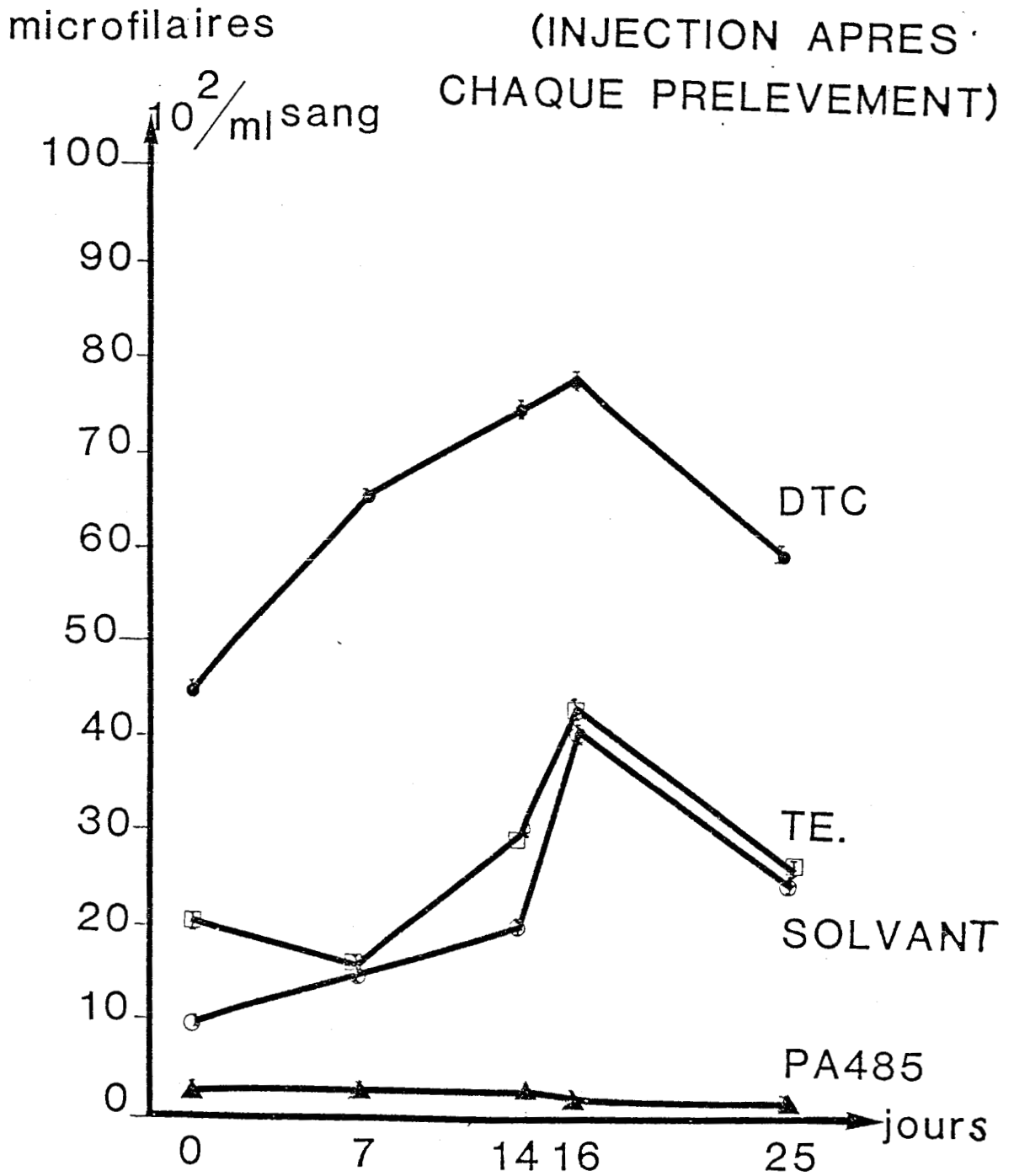


FIG.B

III Etude de l'imuthiol dans la toxoplasmose in vitro et in vivo.

L'étude *in vivo* a été réalisée chez le rat et la souris pour la souche virulente RH :

- chez la souris l'infestation est de 10^3 tachyzoïtes/souris. Le DTC est administré à la dose de 250 mg/kg en I.P. 2 jours avant l'infestation :

- chez le rat l'infestation est de 10^8 à 10^9 tachyzoïtes/rat. Le DTC est injecté de la même façon à la même dose, 2 jours avant l'infestation.

Le modulant ne s'est pas révélé efficace *in vivo*. En revanche les expériences *in vitro* semblent plus encourageantes.

Action du DTC sur des cellules HELA infestées par *Toxoplasma gondii*.

Les cellules Hela proviennent d'un épithéliome humain (1951) d'une patiente nommée Hélène. Nous avons prétraité les cellules par le DTC 1 h avant l'infestation (par 5×10^6 tachyzoïtes / 10^6 cellules), et post-traité ces mêmes cellules 24 h après l'infestation.

Les doses d'imuthiol utilisées étaient les suivantes :

- DTC 1	62,5 µg/ml final
- DTC 2	125,0 µg/ml final
- DTC 3	250,0 µg/ ml final

Le solvant seul sans DTC : 25 µl/ 500 ml de milieu .

Milieu des cellules Hela : MEM/PS + 10 % SVF décomplémenté.
Séchage des cellules par cytocentrifugation puis coloration au
Giemsa (voir matériel et méthodes). L'observation se fait au
microscope à immersion. Les résultats sont les suivants :

Cellules Hela	% de cellules infestées
non infestées	0
infestées	82,7 + 12,6
+ solvant	71,2 + 2,0
+ DTC 1	34,8 + 1,9
+ DTC 2	23,8 + 2,0
+ DTC 3	40,4 + 5,6

On constate qu'un pré et post-traitement par le DTC des
cellules Hela empêche la pénétration des tachyzoïtes à
l'intérieur du carcinome humain. L'utilisation de l'imuthiol à
la dose de 125 µg/ml final inhibe à 76 % l'infestation.

Des doses faibles semblent empêcher l'infestation des
cellules Hela par les tachyzoïtes. L'action combinée d'un pré-
et post traitement produit un maximum d'effet, si l'on ne fait

que l'un ou l'autre la différence est moins significative (prétraitement DTC 125µg/ml: 40,1 % $\pm$ 2,2 de cellules infestées; post traitement DTC 125µg/ml: 52,7 % $\pm$ 1,3 de cellules infestées). Le délai optimum de stimulation se situe 1 h avant l'infestation et 24 h après. Une cinétique de 15 min à 48h nous a permis de déterminer ces temps. En ce qui concerne la gamme de concentrations il serait souhaitable de l'élargir.

b) Le Pind-Avi ou PA 485

Il ne s'agit pas d'un modulant synthétique, mais d'un modificateur de la réponse biologique obtenue à partir d'une souche atténuée par de multiples repiquages d'un virus aviaire, inactivé par irradiation aux rayons gamma à raison de 14 kGy (Delalande). Ce produit a été testé par Pompidou A. dans la stomatite vésiculaire chez la souris, sur des hépatocytes et des lymphocytes isolés de rats (1971), puis sur la dispersion précoce de la chromatine de lymphocytes humains par test de réfringence nucléaire (1986), sur la phagocytose des granulocytes et des monocytes (chez la souris et la vache en post-partum), sur la cytotoxicité à médiation cellulaire sur des cellules d'origine splénique de souris. Dans tous ces cas, le PA 485 s'est révélé positif. Puis ces auteurs ont essayé de mettre en évidence un effet inducteur d'interféron, et une activité sur divers modèles d'infection virale (la stomatite vésiculaire

PIND-AVI DANS LA FILARIOSE B.MALAYI

injection : J-2

PA₄₈₅ : 1600 UB/kg

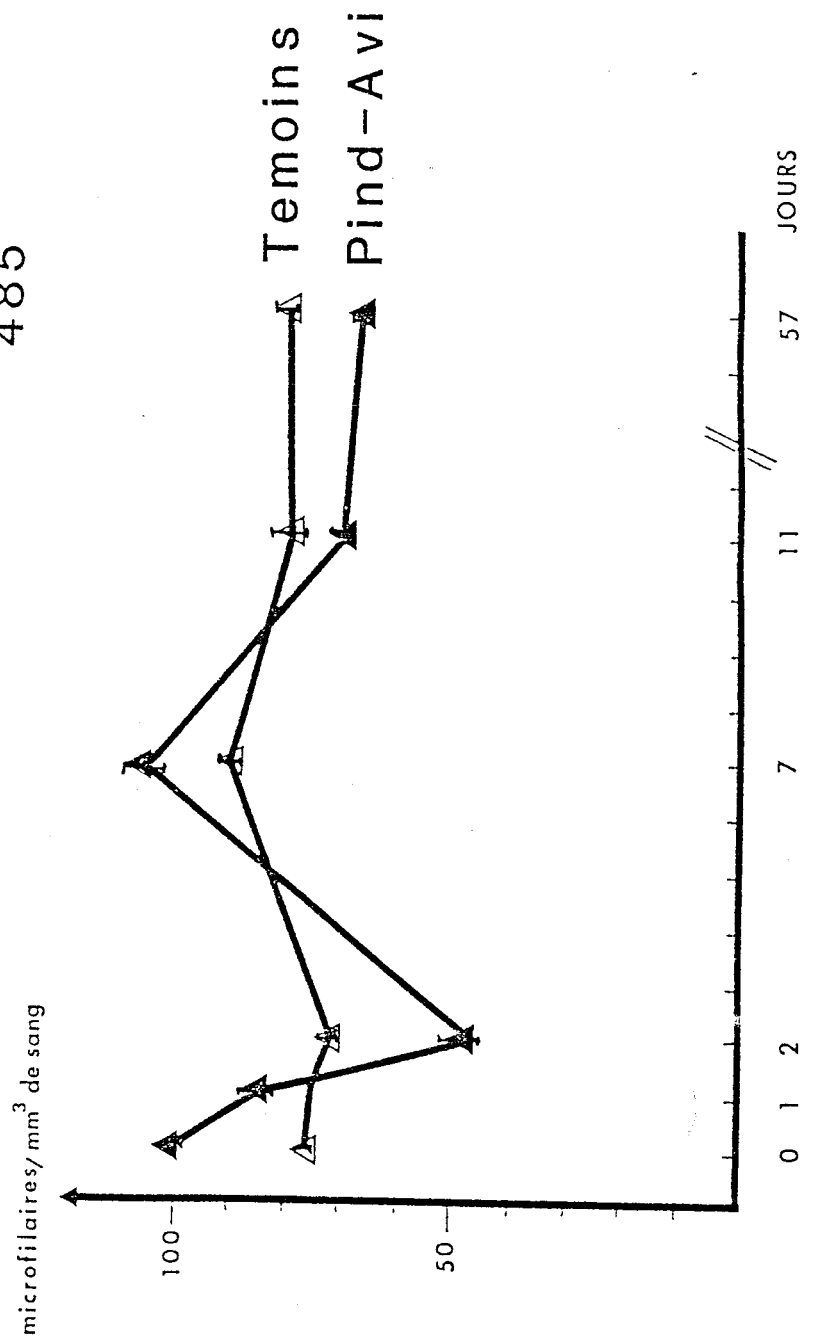


Fig. 1

servant de test de contrôle d'activité au PA 485) tels que : l'infection à virus anjesky (herpes), et l'infection à virus de l'encephalomyocardite (EMC).

Dans des modèles d'infection bactériennes le Pind-Avi a été testé sur *Pseudomonas aeruginosa* et sur *Listeria monocytogenes* chez la souris.

En études cliniques le PA 485 a été utilisé sur zona (Pr. Stickl), sur herpes génital (Pr. Stickl), en chirurgie orthopédique (Dr. Kupp), sur épithélio-carcinomes de l'ortopharynx (Pr. Zauer), chez des patients cancéreux (carcinome du tractus gastro-intestinal, Pr. Zauer).

Le Pind-Avi possède un large spectre d'action dans la mesure où il se révèle efficace dans différentes pathologies. Nous voulions savoir s'il avait également un impact dans différentes parasitoses :

I Le PA 485 dans la filariose *Brugia malayi*

En parallèle avec l'imuthiol, dans une première série d'expériences (voir chapitre DTC pour les conditions d'experimentations), le PA 485 a été injecté 2 jours avant l'infestation à la dose de 1600 UB/kg.

Il s'avère qu'il ne présente pas beaucoup d'effet (fig.1).

Par contre dans la seconde expérience le PA 485 est réinjecté après chaque mesure de microfilarémie, dans ce cas il inhibe presque totalement la production de microfilaires

(fig.2).

Les mastomys de cette seconde expérience qui ont reçu le Pind-Avi ou l'imuthiol ont été sacrifiés afin de numérer les filaires adultes dans les différents organes par rapport aux témoins.

Les résultats sont les suivants :

	Témoins	PA 485	Imuthiol
Organes			
coeur	26+6	6+2	1+1
poumons	15+3	0	16+4
testicules	5+1	0	10+2
foie	0	0	0
rate	0	0	0
mésentères	0	0	0
peau	0	0	0
glandes			
salivaires,	0	0	0
et surrénales			
cerveau	0	0	0

Les résultats sont exprimés en nombre de filaires adultes pour 4 mastomys par série.

Le PA 485 inhibe la microfilarémie mais ne semble pas toucher les filaires adultes. On peut donc s'interroger pour savoir s'il n'inhiberait pas la fécondation, ou l'ovogénèse, ou la ponte des filaires femelles adultes.

II Etude du PA 485 dans la maladie de Chagas

Le Pind-Avi est injecté 2 fois en 15 jours à une semaine d'intervalle à la dose de 800 UB/kg (x2) avant l'infestation des souris balb C par 10 000 trypanosomes par souris.

Lors de la trypanosémie on compte le nombre de trypanosomes par ml de sang. Au bout de 15 jours, si le nombre de parasites commence à se stabiliser ou à diminuer on effectue un relevé tout les 3 jours (fig.3).

La parasitémie est telle que la plupart des souris meurent, celles qui survivent sont considérées comme passées en phase chronique (fig.4).

Dans cette parasitose ce premier "coup de sonde" ne s'est pas révélé suffisamment significatif pour pousser plus loin les investigations. Sinon il aurait été intéressant de titrer les anticorps et d'envisager l'action du modulant sur de tels anticorps.

ACTION DU DTC ET DU PA485 SUR LA MICROFILAREMIE

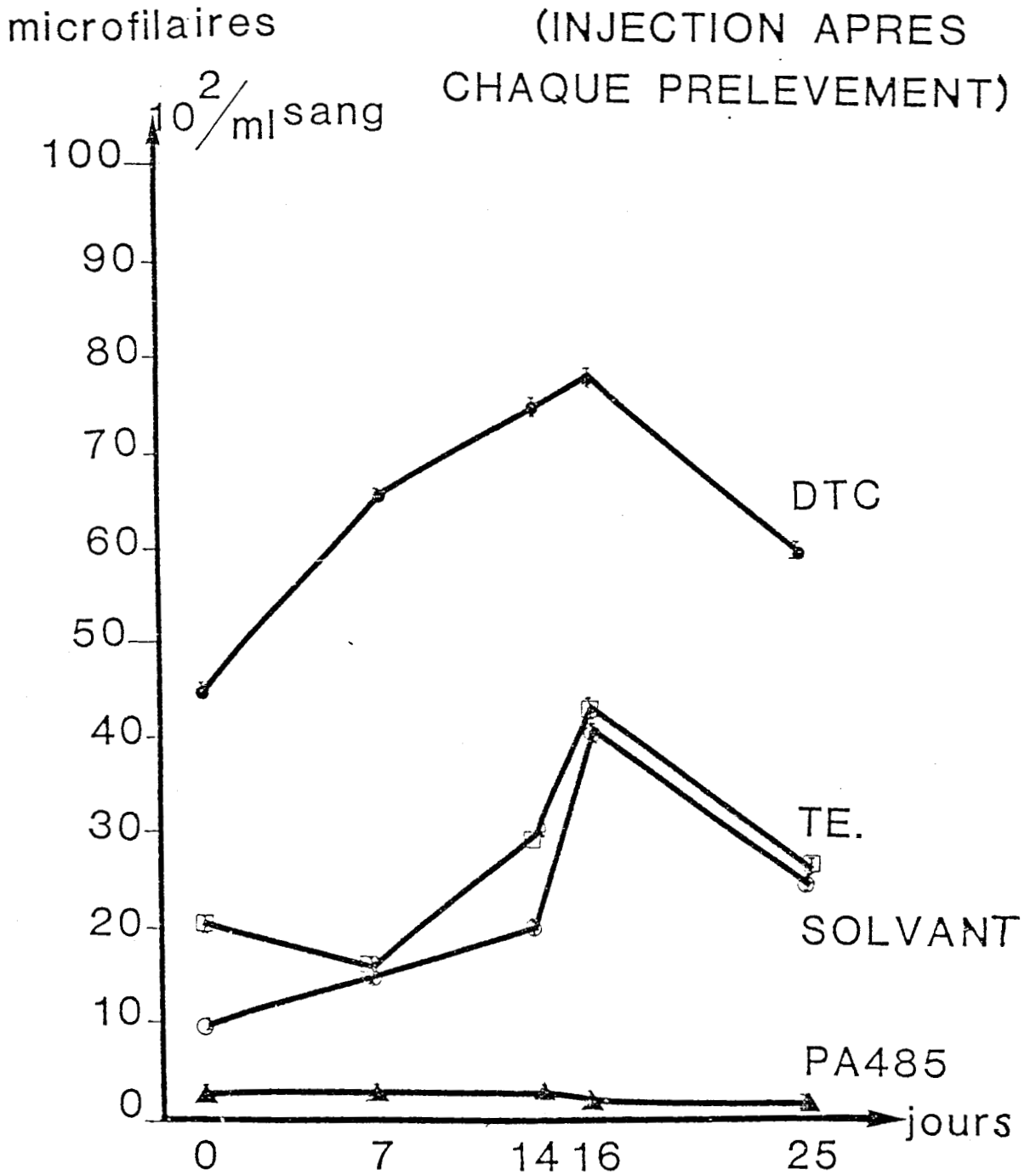


FIG.2

PIND-AVI DANS LA TRYPANOSOMIASE

PA 485 : J-15, J-7

2x800UB/KG

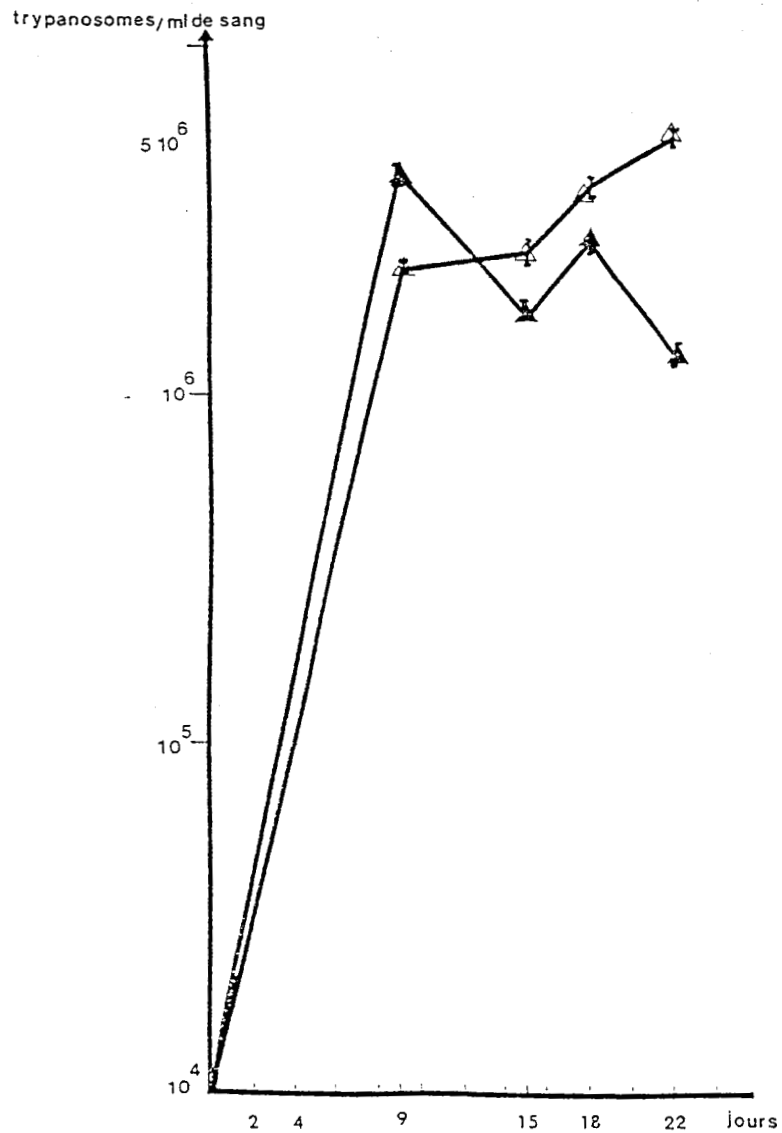


Fig. 3

PA₄₈₅ DANS LA TRYPANOSOMIASE,
PASSAGE EN PHASE CHRONIQUE

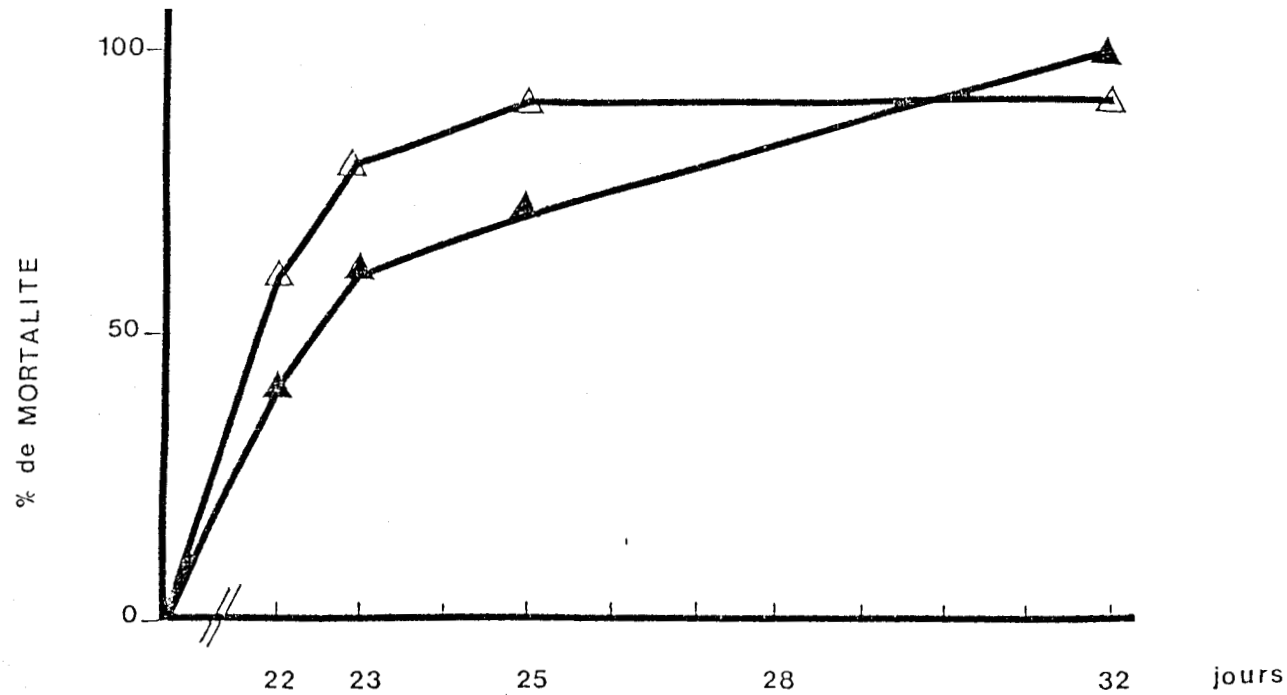


Fig 4

III Le PA 485 dans la Toxoplasmose

a souche virulente RH

Chez le rat, nous avons obtenue une survie de 60 % des animaux ayant reçu le PA 485 à J-7 et J-3 en i.p. à la dose de 800 UB/kg, alors que 30 % seulement des rats témoins ont survécu ; les animaux ont reçu 10^8 tachyzoïtes/rat (dose létale en 8 jours) (fig.5).

Le rat est un animal naturellement résistant à l'infestation par cette espèce de toxoplasme, et nécessite une charge massive de parasites (tous les témoins ne sont pas morts).

Chez la souris la dose létale en 8 jours est de 1000 tachyzoïtes de cette souche de *T.Gondii*. Des lots de 10 souris ont reçu à J-7 et J-3 800 UB/kg de PA 485 avant l'infestation. Il apparaît (fig.6) un effet protecteur.

b Souche chronique

Dans un premier protocole des souris mâles ont reçu 800 UB/kg de PA 485 en i.p. 7 jours avant l'infestation à raison de 50 kystes/souris. On laisse évoluer la maladie puis on sacrifie les animaux et on compte le nombre de kystes au niveau du cerveau et des lobes oculaires (figure 7).

PA₄₈₅ DANS LA TOXOPLASMOSE
SOUCHE RH CHEZ LE RAT

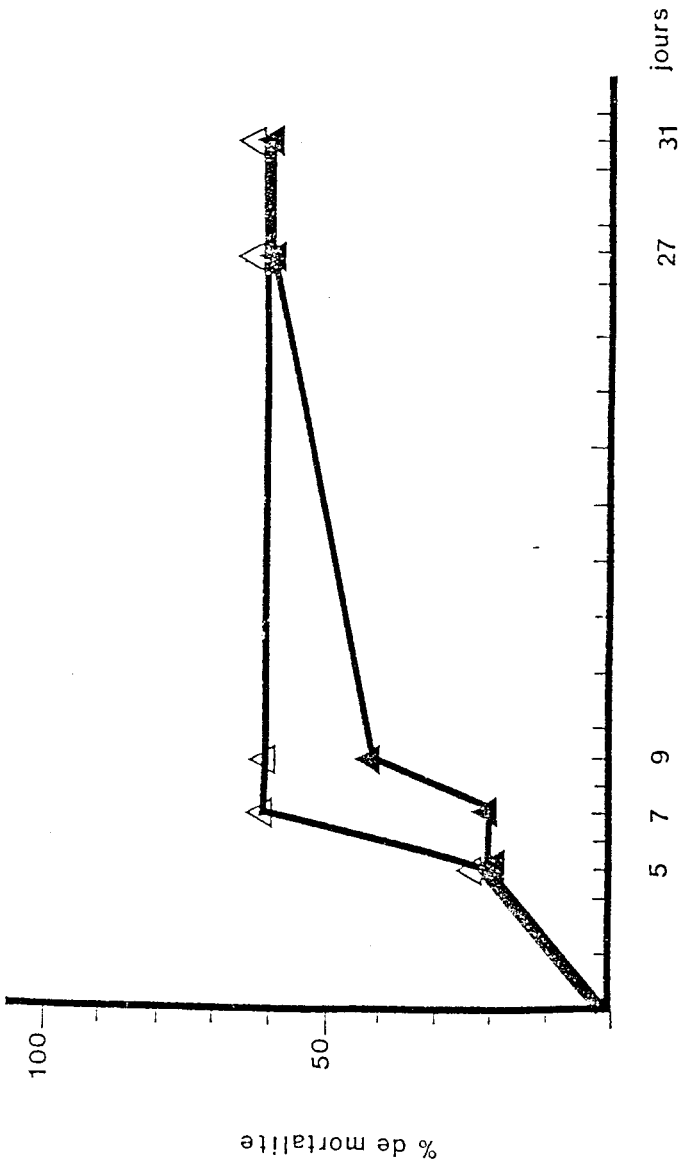
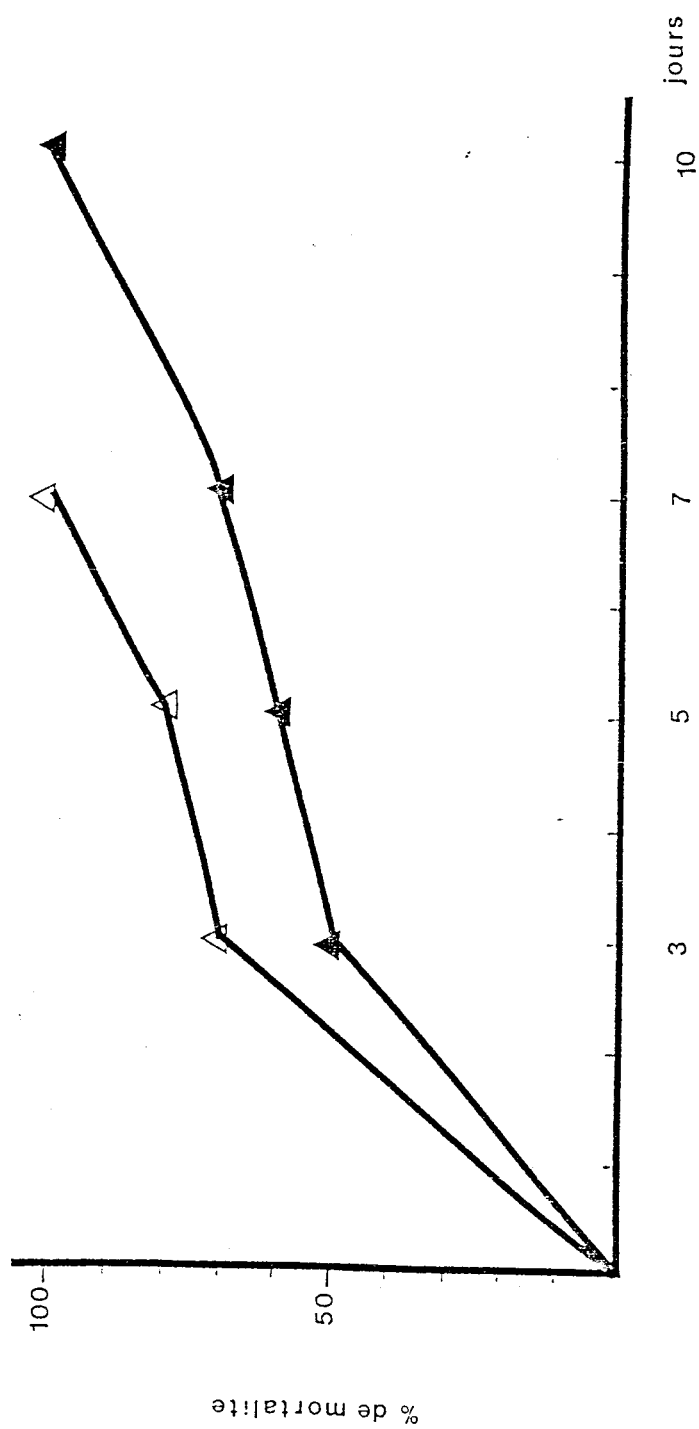
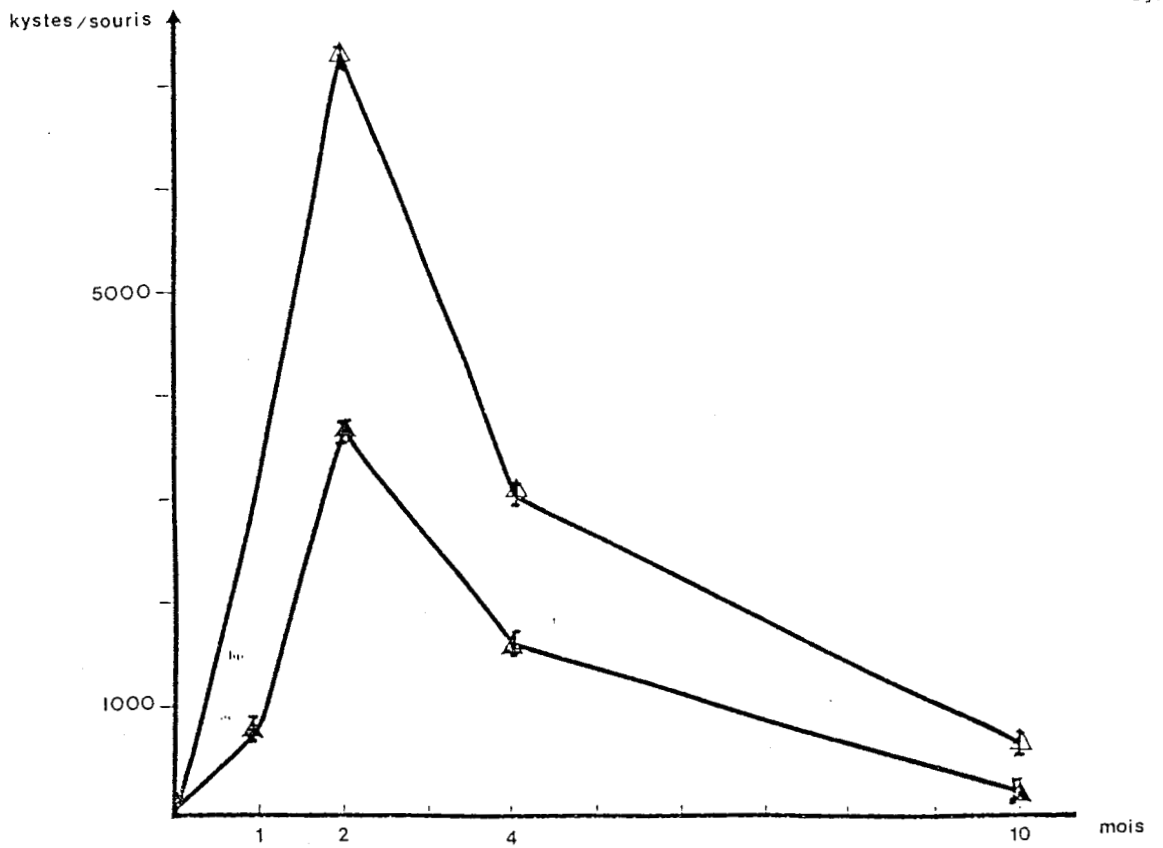


Fig. 5

PIND-AVI DANS LA TOXOPLASMOSE
SOUCHE RH CHEZ LA SOURIS



PA₄₈₅ DANS LA TOXOPLASMOSE
IN VIVO, J-7 (SOUCHE CHRONIQUE)



PA₄₈₅ DANS LA TOXOPLASMOSE
IN VIVO, J-2 (SOUCHE CHRONIQUE

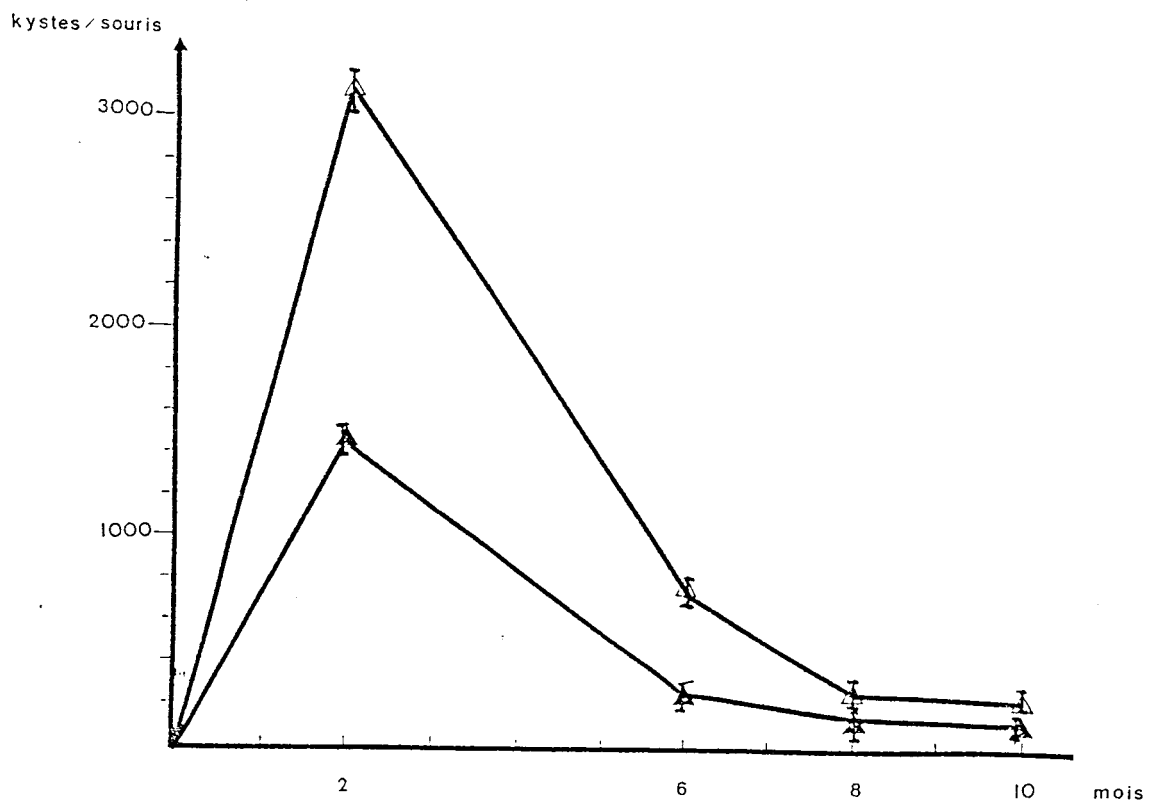


Fig. 8

Dans une seconde série d'expériences, des souris femelles ont reçu 800 UB/kg de PA 485 en i.p. 2 jours avant l'infestation à raison de 50 kystes / souris. De la même façon on numère le nombre de kystes (figure 8).

Dans une troisième série d'expériences, nous avons repris des souris mâles auxquelles nous avons injecté 800 UB/kg de PA 485 2 jours avant l'infestation. La figure est la même que la figure 8, aux écarts types près.

IV Action du PA 485 sur des cellules Hela infestées par T.Gondii

Nous avons traité les cellules Hela par le PA 485 1 heure avant l'infestation ($5 \cdot 10^6$ tachyzoïtes/ 10^6 cellules) et post-traité ces mêmes cellules 24 h après l'infestation.

Les doses de PA 485 utilisées sont les suivantes :

PA 1	1,6 UB/ml
PA 2	8 UB/ml
PA 3	16 UB/ml

On constate (fig.9) que le PA 485 empêche la pénétration des tachyzoïtes à l'intérieur des cellules Hela. L'utilisation du PA 485 à la dose de 1,6 UB/ml inhibe à 74 % l'infestation.

Cette expérimentation faite en parallèle avec l'imuthiol révèle une similitude d'effet de ces deux modulateurs, très

ACTION DU PA₄₈₅ SUR DES CELLULES HELA INFESTÉES PAR T. gondii

% de cellules infestées

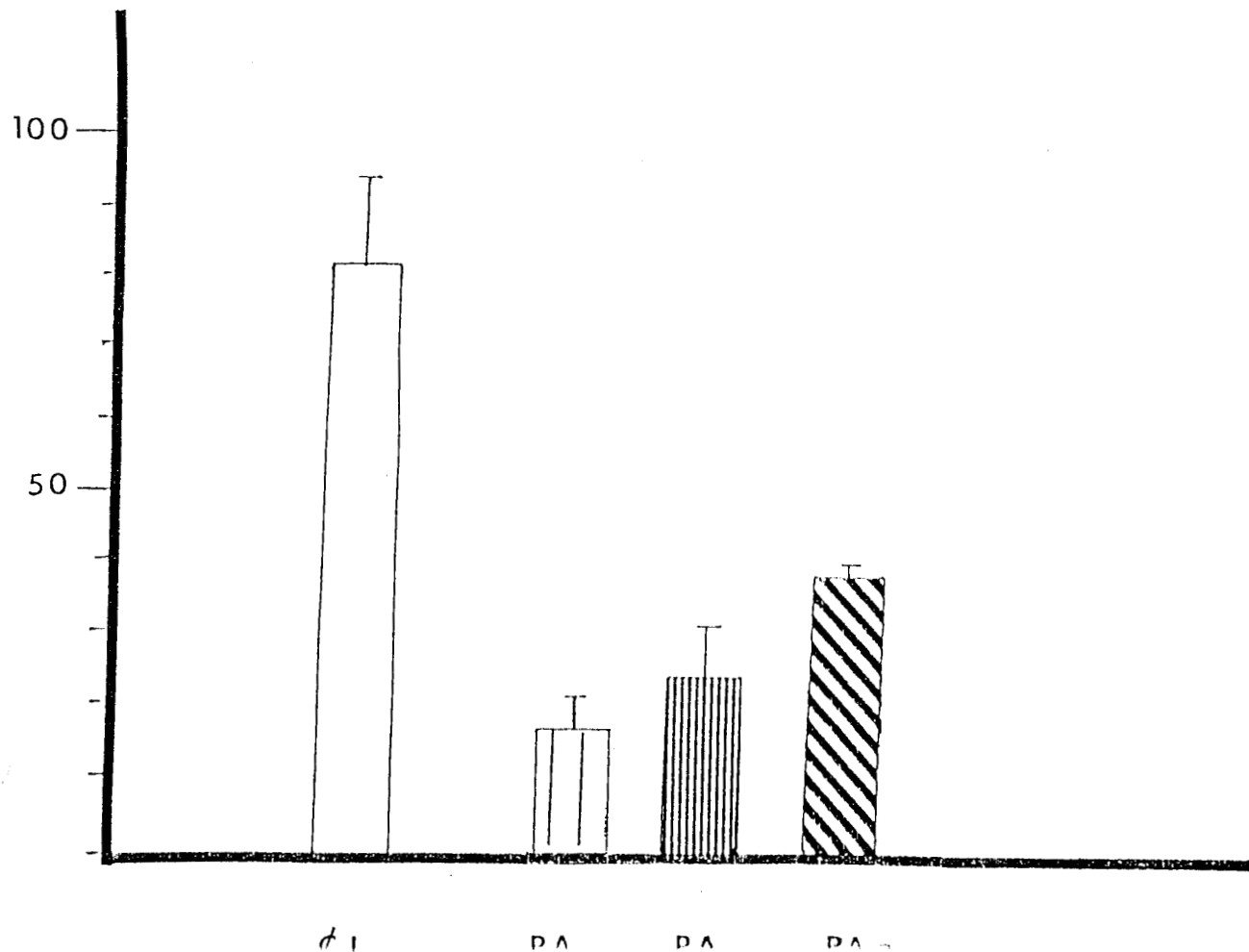


Fig. 9

différents pourtant, sur des cellules du carcinome utérin Hela.

DISCUSSION

De ces deux immunomodulants le PA 485 semble être plus efficace dans les différentes parasitoses étudiées.

En infection expérimentale chez *mastomys natalensis* par *B.Malayi*, chez des animaux déjà infectés le taux de microfilaires sanguines n'est pas modifié, par contre en traitement préventif l'effet est important (fig.2). D'autre part lorsqu'on sacrifie ces animaux le nombre de filaires adultes est lui aussi diminué et l'on peut se demander si le Pind-Avi n'interviendrait pas en bloquant la ponte des filaires ?

En ce qui concerne la toxoplasmose chronique là encore le PA 485 diminue le nombre de kystes chez les souris infestées lorsqu'il est utilisé en traitement préventif.

Sur les cultures de cellules Hela, Pind-Avi et Imuthiol empêchent la pénétration des tachyzoïtes.

Quant aux résultats négatifs, ils ont néanmoins l'avantage d'être pondérés par trois considérations :

- une chute brutale de la parasitémie n'est pas sans danger pour le sujet parasité en raison du choc anaphylactique qui peut l'accompagner (en particulier dans la filariose).

- Il n'est pas rare d'observer un accroissement de la parasitémie (microfilaires avec le DTC) avec des substances immunopotentiatrices et le maintien du taux en présence n'est donc pas totalement défavorable.

- Ces expérimentations sont très préliminaires et laissent la possibilité d'un effet protecteur si elles étaient réalisées dans d'autres conditions (temps de pré et post traitement, doses, mode d'injection ...)

Ces résultats montrent que l'étude des immunostimulants dans les parasitoses est rendue plus difficile lorsque les mécanismes immunitaires qu'il s'agit de moduler ou de manipuler sont mal définis. L'on est en réduit alors à une étude très empirique d'un effet en tout ou rien sur l'évolution vitale des animaux infectés et sur une exploration ponctuelle du comportement de telle ou telle cellule-hôte lors d'un traitement *in vitro*. Cet abord reste toutefois l'une des seules possibilités offertes aux laboratoires pharmaceutiques qui tentent de développer des molécules à visée thérapeutique ou prophylactique dans le domaine des infections parasitaires.

B IMMUNOINHIBITEUR.

Le nédocromil de sodium, sel disodique de l'acide pyranoquinoline dicarboxylique, a un profil d'action assez proche du cromoglycate de sodium (DSCG) vis-à-vis des cellules possédant le récepteur de type I pour l'IgE, avec activité sélective vis-à-vis du mastocyte muqueux (Stadler 1987).

Nous avons donc étudié le rôle possible du nédocromil de sodium dans la réactivité des phagocytes mononucléés et des plaquettes à une stimulation dépendante de l'IgE, et dans l'anomalie plaquettaire identifiée chez les patients souffrant d'asthme à l'aspirine.

Le nédocromil de sodium ou Tilade sous forme aérosol est un nouvel agent utilisé dans le traitement de l'asthme et de l'inflammation (Auty 1986).

I Le nédocromil de sodium : modulateur de la réponse IgE

Nos investigations portent sur l'action du nédocromil de sodium en système IgE dépendant dans un premier temps, à la fois sur les fonctions anti-parasitaires et sur les paramètres métaboliques, comme dans le cas de l'étude des immunostimulants, tels que :

- pour les macrophages et les plaquettes la production de métabolites de l'oxygène quantifiée par chimioluminescence (Joseph M. 1985),
- pour les phagocytes mononucléés l'induction et la libération active d'enzymes lysosomiales (Joseph M. 1977).

1 Regulation des fonctions anti- parasitaires IgE dépendantes de macrophages et de plaquettes de rats

La stimulation IgE dépendante des macrophages péritonéaux de rats et des plaquettes sanguines de rats a été mesurée par la cytotoxicité anti-parasitaire.

a cytotoxicité anti-parasitaire

L'addition de nédocromil de sodium à des macrophages péritonéaux de rats immuns en présence de larves de schistosomes induit une inhibition dose dépendante de la cytotoxicité. Une réduction de 66 % de la cytotoxicité est obtenue en présence de nédocromil de sodium à la concentration de $2,2 \cdot 10^{-8}$ M (10 ng/ml) et de $2,2 \cdot 10^{-7}$ M (100 ng/ml) (fig.1).

De façon analogue le nédocromil de sodium a un effet inhibiteur sur la cytotoxicité IgE dépendante de plaquettes de

rats avec une inhibition de 78 % à la dose de $2,2 \cdot 10^{-7}$ M (fig.2).

b viabilité cellulaire

On exclut la possibilité d'une inhibition des fonctions effectrices par le nédocromil de sodium liée à une toxicité directe du composé sur les cellules.

Pour ce faire on utilise des tests de viabilité cellulaire au bleu trypan ou au diacétate de fluorescéine. Par exemple le tableau I nous indique la bonne viabilité des macrophages péritonéaux de rats en présence de nédocromil de sodium à différentes doses.

En ce qui concerne les plaquettes traitées par la drogue, l'absence de déshydrogénase lactique dans les surnageants plaquettaires confirme leur bonne intégrité.

Fig. 1.

- ▨ normal serum(n.s.)
- ▧ immune serum (i.s.)
- ▤ nedocromil sodium + i.s.
- nedocromil sodium + n.s.

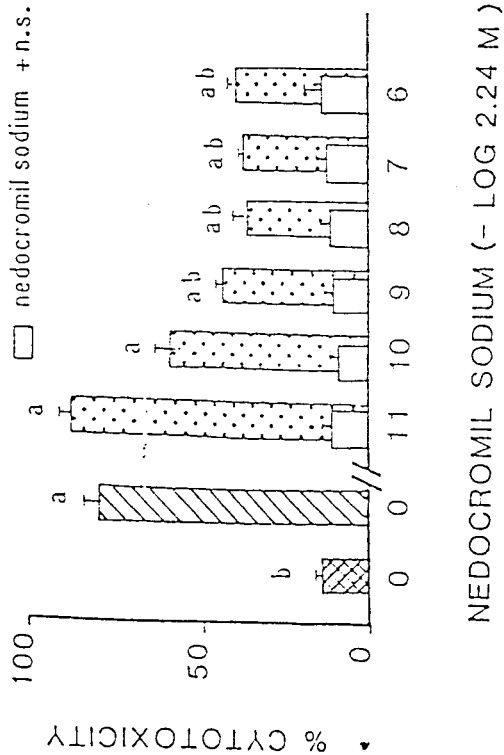


Fig. 2.

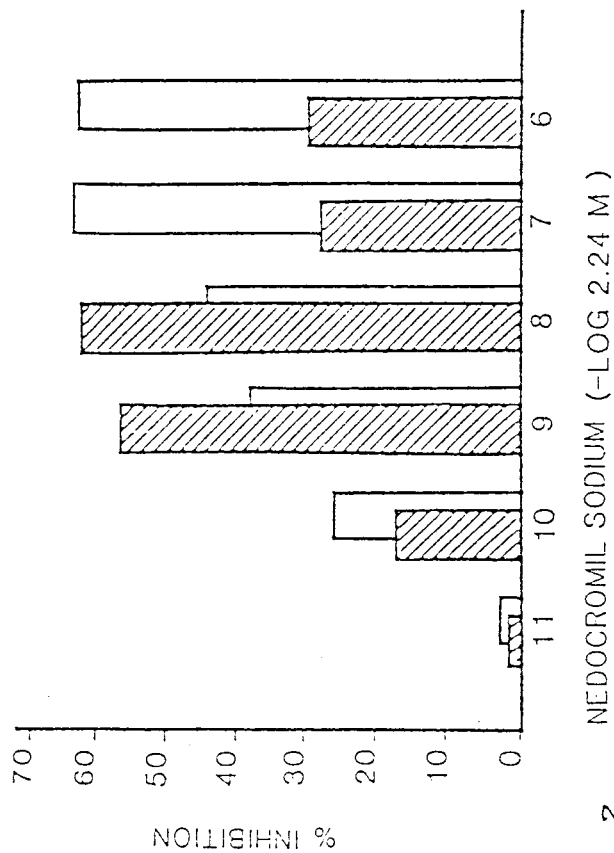
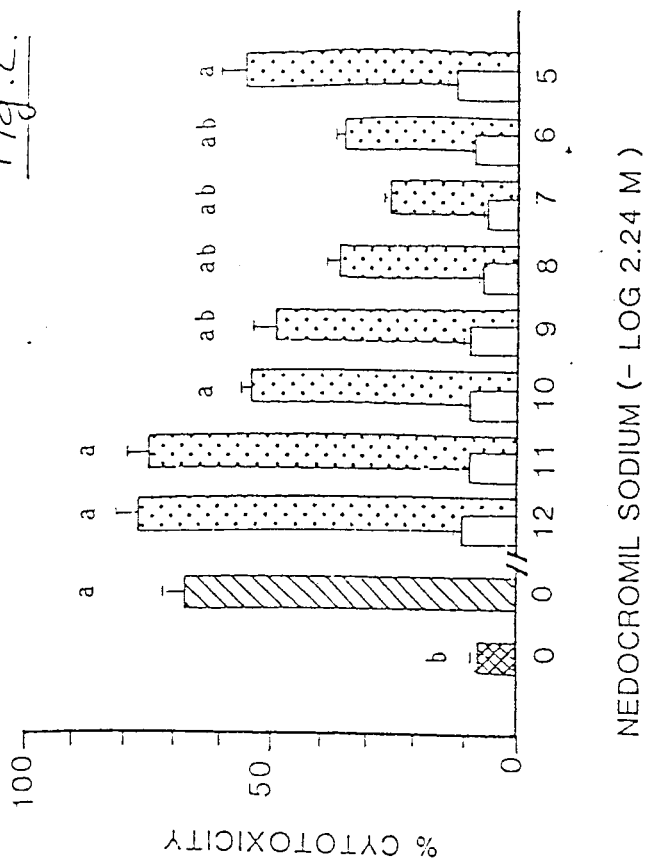


Fig. 2

Légende des figures :

fig.1 : Effet du nédocromil de sodium sur la cytotoxicité IgE dépendante vis à vis de larves de schistosomes par des macrophages péritonéaux de rats. Les histogrammes indiquent le pourcentage de schistosomules morts (moyenne $\pm$ SD) après 24 h d'incubation avec 20 % de sérum de rats normaux (N.S) ou de rats infectés (I.S) soit dans le milieu, soit en présence de nédocromil de sodium à différentes concentrations.

a) $p < 0,0001$ macrophages en N.S

b) $p < 0,001$ macrophages en I.S

En absence de macrophages la cytotoxicité n'excède jamais plus de 13 %.

fig.2 : Effet du nédocromil de sodium sur la cytotoxicité IgE dépendante vis à vis de larves de schistosomes par des plaquettes de rats. Les plaquettes sont incubées avec la substance à différentes concentrations () pendant 30 min avant l'addition de sérum immun () et de larves de schistosomes. Les contrôles sans plaquettes ou les plaquettes avec du sérum normal () , ou sans nédocromil de sodium () n'excèdent jamais plus de 15 % de cytotoxicité.

a) $p < 0,001$ plaquettes en N.S

b) $p < 0,001$ plaquettes en I.S

fig.3 : Effet du nédocromil de sodium sur le relargage et la synthèse de B-glucuronidase par des macrophages péritonéaux de rats stimulés par de l'IgE/anti-IgE. Les histogrammes représentent le pourcentage d'inhibition du relargage de l'enzyme (□) et de la synthèse (▨) induits après 30 min de préincubation avec le nédocromil de sodium à différentes concentrations, avant la stimulation par de l'IgE/anti-IgE comparé au niveau de l'enzyme de macrophages non traités par l'immunomodulant.

c Chimiluminescence

Le nédocromil de sodium induit un effet supprimeur sur la production de lumière médiée par la lucigénine en ce qui concerne des macrophages péritonéaux de rats stimulés par l'IgE. Des phagocytes mononucléés normaux présentent spontanément de l'IgE de surface, et induisant donc une faible chimiluminescence lors de l'addition d'anti-IgE, par rapport à des macrophages immuns.

En effet après 6 semaines d'infection par *S.mansoni* les macrophages de ces rats présentent une grande réactivité au test de chimiluminescence due à la présence d'un taux accru d'IgE ; de la même façon des macrophages de rats sains passivement sensibilisés par du sérum de rats infectés voient leur nombre de récepteurs pour l'IgE augmenter et réagissent de façon importante au test de chimiluminescence.

Le nédocromil de sodium à des doses de $2,2 \cdot 10^{-8}$ M, $2,2 \cdot 10^{-7}$ M et $2,2 \cdot 10^{-6}$ M, incubé avec de tels macrophages (immuns ou passivement sensibilisés), réduit de 80 % la production de lumière quantifiée par chimiluminescence dans les 3 cas (tableau II).

Tableau I. Viabilité des phagocytes mononucléés avec ou sans
nédocromil de sodium

Cellules dans le milieu	% de cellules vivantes	
	exclusion au bleu trypan	diacétate de fluorescéine
Macrophages péritonéaux de rats + IS ¹	96,3 ± 2,2	93,7 ± 2,0
" + IS + Nédocromil de Sodium 2.10 ⁻¹¹ M	97,1 ± 1,3	94,5 ± 2,8
" + IS + Nédocromil de Sodium 2.10 ⁻⁹ M	97,8 ± 1,5	94,0 ± 1,4
" + IS + Nédocromil de Sodium 2.10 ⁻⁷ M	94,5 ± 3,1	93,2 ± 4,4
" + IS + Nédocromil de Sodium 2.10 ⁻⁶ M	92,5 ± 4,2	91,8 ± 2,8

¹ macrophages péritonéaux de rats incubés une nuit avec 20 % de sérum de rat infecté (IS) et différentes concentrations de Nédocromil de Sodium dans le milieu (EMEN).

Tableau II. Chimiluminescence IgE-dépendente de macrophages
péritonéaux de rats ¹

N°	Macrophages péritonéaux de rats incubés avec	
	Nédocromil de Sodium ²	du sérum normal
2.10 ⁻¹² M	6,15 ± 0,75	28,8 ± 8,3
2.10 ⁻¹¹ M	ND	ND
2.10 ⁻¹⁰ M	ND	29,1 ± 2,7
2.10 ⁻⁹ M	ND	24,9 ± 2,4
2.10 ⁻⁸ M	ND	13,1 ± 3,1
2.10 ⁻⁷ M	4,70 ± 1,20	4,6 ± 0,8
2.10 ⁻⁶ M	1,90 ± 0,75	5,8 ± 2,1
2.10 ⁻⁵ M	1,50 ± 0,80	5,8 ± 2,9
	ND	ND

¹ Production de lumière mesurée en mv pour 4.10⁵ macrophages péritonéaux dans un mélange de luciférine et HBSS
(moyenne ± SD de 4 expériences)

² dans un volume final de 250 µl



Tableau III. Chimiluminescence IgE-dépendante de plaquettes de rats ¹

N°	Nédocromil de Sodium ²	
	Plaquettes de rats normaux avec du sérum normal	du sérum immun + anti-IgE
2.10 ⁻¹² M	0,30 ± 0,04	1,42 ± 0,22
2.10 ⁻¹¹ M	ND	1,58 ± 0,20
2.10 ⁻¹⁰ M	ND	1,33 ± 0,19
2.10 ⁻⁹ M	0,17 ± 0,01	0,85 ± 0,23
2.10 ⁻⁸ M	0,15 ± 0,02	0,43 ± 0,15
2.10 ⁻⁷ M	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01
2.10 ⁻⁶ M	0,17 ± 0,04	0,10 ± 0,05
2.10 ⁻⁵ M	0,03 ± 0,02	0,07 ± 0,03
	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,04

¹ production de lumière mesurée en mv pour 6.10⁵ plaquettes dans un mélange de luminol, luciférine et peroxydase dans du MBSS (moyenne ± SD de 4 expériences)

² dans un milieu final de 250 µl

Les plaquettes sanguines sont prélevées à partir d'animaux infectés par *S. mansoni*, et de la même façon, leur production de métabolites de l'oxygène est quantifiée par chimioluminescence en présence de nédocromil de sodium (tableau III).

d Enzymes lysosomiales

La stimulation de phagocytes mononucléés par de l'IgE peut être évaluée par un autre paramètre métabolique : le relargage et la synthèse d'enzymes lysosomiales quantifiés par le dosage de B-glucuronidase. Une incubation successive des cellules avec de l'IgE puis de l'anti-IgE provoque à la fois la synthèse et le relargage de cette enzyme par les macrophages.

Des macrophages péritonéaux de rats incubés uniquement avec du HBSS excrètent très peu de B-glucuronidase et permettent d'établir un taux de base des hydrolases intra-cellulaires, alors que s'ils sont stimulés par de l'IgE/anti-IgE la production et la synthèse de cette enzyme sont considérablement augmentées. Un pré-traitement des cellules par le nédocromil de sodium 30 min avant leur stimulation induit une inhibition à la fois de l'exocytose et de la synthèse de l'enzyme, avec un maximum d'effet à une dose de substance de $2,2 \cdot 10^{-7}$ M pour le relargage, et de $2,2 \cdot 10^{-8}$ M pour l'induction de la synthèse (fig.3).

DISCUSSION

Les récepteurs pour l'IgE ont été décrits sur au moins neuf populations cellulaires différentes dans le système immunitaire chez l'homme et chez différentes espèces animales. L'affinité, la densité de surface, la valence, l'antigénicité et l'homologie structurale permettent de distinguer deux groupes de populations cellulaires :

1) les cellules mastocytaires et les basophiles, caractérisés par des récepteurs pour l'IgE de haute affinité et monovalents, au nombre de 3×10^5 par mastocytes et 4×10^4 par basophiles (type I),

2) des cellules lymphoïdes (Gonzales M. 1977, Yodoi J. 1979) et des cellules inflammatoires :

macrophages, monocytes (Dessaint J.P. 1986), éosinophiles (Capron M. 1983) et des plaquettes sanguines (Joseph M. 1986), pour lesquels leur récepteur pour l'IgE est caractérisé par - une affinité plus faible, une interaction préférentielle pour l'IgE agrégée et un nombre d'environ 5×10^4 par cellule. Ce type de récepteurs possède une spécificité antigénique commune, distincte de celle des récepteurs des basophiles et des mastocytes. Ces différences ont permis d'individualiser un type II de récepteur pour l'IgE, noté $FC\epsilon RII$, à la surface des cellules inflammatoires (Capron A 1986). On peut dès lors accepter le concept général, qu'à la fois *in vitro* et *in vivo*,

les cellules inflammatoires comme les mastocytes ou les basophiles peuvent se lier sélectivement aux IgE, et participer grâce aux médiateurs qu'ils excrètent après leur activation dans les réactions IgE dépendantes, soit à une immunité protectrice vis-à-vis des parasites, soit à une hypersensibilité immédiate.

Il apparait qu'il faut au moins des dimères d'IgE pour provoquer l'activation de ces populations cellulaires possédant un récepteur de type II (Capron A.1985). Ce qui a pour conséquence d'entraîner la libération des métabolites de l'oxygène, communs aux différentes cellules de l'inflammation, d'induire le relargage d'enzymes lysosomiales pour les macrophages, des leucotriènes, des prostaglandines, du PAF-acether et de l'IL 1.

Le nédocromil de sodium inhibe la production d'histamine médiée par de l'IgE des mastocytes du tissu conjonctif de rat, (Riley P.A.1987) et des mastocytes muqueux provenant de lavages broncho-alvéolaires de singes macaques (Eady R.P. 1985).

Il a aussi été montré que le Tilade inhibait le relargage d'histamine de mastocytes humains provenant de lavages broncho-alvéolaires ou de fragments de poumons dégradés de façon enzymatique (Leung K. 1986).

Ces expériences montrent l'interaction du nédocromil de sodium avec les IgE à la surface des macrophages péritonéaux ou des plaquettes de rats, nous donnant une activité suppressive de cette substance en système IgE dépendant sur des populations de

cellules de l'inflammation non mastocytaires. L'inhibition est dose dépendante, atteignant un plateau pour la courbe de cytotoxicité IgE dépendante des macrophages, alors que celle des plaquettes atteint un maximum d'inhibition, puis décroît dans les fortes doses de médicament.

Les présentes investigations montrent que le nédocromil de sodium est au moins 10 fois plus efficace que le cromoglycate sur l'activation IgE dépendante des macrophages et des plaquettes de rats (Tsicopoulos A.1987), et par conséquent, à des doses physiologiques il est possible d'atteindre dans le sérum après inhalation d'1 à 2 mg de produit.

L'inhibition IgE dépendante des propriétés des cellules effectrices décrites ici ouvre de nouvelles perspectives de contrôle cellulaire dans la mesure où dans les réactions allergiques on ignore jusqu'où va l'impact de ces cellules chez l'animal et chez l'homme.

La modulation des mécanismes IgE dépendant par le nédocromil de sodium pourrait être un apport bénéfique pour nos connaissances des processus physiopathologiques des troubles allergiques.

2 Inhibition par le nédocromil de sodium de l'activation IgE dépendante de phagocytes mononucléés et de plaquettes humaines dans l'allergie

La démonstration d'un récepteur spécifique pour l'IgE sur des populations non mastocytaires ou non basophiles, telles que les phagocytes mononucléés, les éosinophiles et les plaquettes suggère que ces cellules participent directement dans les troubles immunologiques de l'allergie. Aussi la compréhension du mode d'action anti-allergique ou anti-asthmatic de drogues sur ces cellules revêt un intérêt particulier, dans la mesure où elle ouvre la voie à des perspectives diagnostiques et thérapeutiques nouvelles.

En conséquence l'inhibition du nédocromil de sodium sur l'activation IgE dépendante de macrophages alvéolaires, de monocytes et de plaquettes chez l'homme a été examiné. Le modulant induit une inhibition du métabolisme oxydatif apprécié par chimioluminescence (des monocytes et des plaquettes humaines), et une réduction de multiples médiateurs des macrophages alvéolaires humains (enzymes, leucotriènes, PAF-acether) estimée principalement par le dosage de B-glucuronidase pour les enzymes lysosomiales. Ces observations chez l'homme renforcent celles décrites chez l'animal, et confirment l'hypothèse du mode d'action du nédocromil de sodium sur un compartiment cellulaire, différent des mastocytes et basophiles, cible de la réponse IgE lors d'une réaction

d'hypersensibilité immédiate telle que l'allergie et plus particulièrement l'asthme.

La découverte dans notre laboratoire du 2^{ième} récepteur pour l'IgE, $Fc_{\epsilon}R_{II}$, à la surface des macrophages, éosinophiles et plaquettes, ainsi que la démonstration de mécanismes IgE dépendants conduisant à la cytotoxicité anti-parasitaire ont permis de rechercher la signification de ces mécanismes originaux dans d'autres situations que l'infection parasitaire comme l'allergie (Capron A. 1985, Capron A. 1986). L'activité anti-parasitaire a une contribution réelle dans l'immunopathologie IgE dépendante des réactions d'hypersensibilité immédiate (Capron A. 1986).

D'autre part les macrophages alvéolaires, les éosinophiles et les plaquettes jouent un rôle primordial dans les réactions d'asthme extrinsèque et dans les manifestations d'hyperactivité allergique pulmonaire, par la libération de PAF-acether et de leucotriènes (Arnoux B. 1980, Gleich G.J. 1984). Ces nouvelles considérations permettant d'analyser l'activité prophylactique et thérapeutique de différentes drogues sur les troubles IgE dépendants, comme l'asthme, et de considérer leur modulation sur la libération de divers médiateurs produits par de tels macrophages et plaquettes.

Le but du présent travail est de définir l'effet du nedocromil de sodium sur les métabolismes des macrophages alvéolaires, monocytes et plaquettes sanguines exposés à une

activation IgE dépendante. Le nédocromil de sodium est un nouveau médicament qui apparait nettement efficace dans le traitement des maladies respiratoires obstructives et en particulier dans l'asthme bronchique (Lal S. 1984).

a cytotoxicité anti-parasitaire

Le nédocromil de sodium (10 ng/ml) provoque une inhibition de 64 % de la cytotoxicité anti-parasitaire vis-à-vis de *S. mansoni* par des monocytes humains incubés avec du sérum de patients infectés (tableau I). Pour exclure la possibilité d'une inhibition des fonctions effectrices par le Tilade comme une conséquence directe de la toxicité de la drogue sur les monocytes, des tests au bleu trypan ont été réalisés (tableau II). Le médicament induit aussi une inhibition dose dépendante de la cytotoxicité anti-parasitaire par des plaquettes de sujets normaux incubées successivement avec du sérum de patients asthmatiques riche en IgE, puis de l'anti-IgE (tableau III).

b Chimiluminescence

Le nédocromil de sodium inhibe la production de lumière médiée par le système luminol/luciférine/peroxidase, de plaquettes sanguines stimulées par de l'IgE. La concentration de

Tableau I. Effet du Nédocromil de Sodium sur la cytotoxicité IgE-dépendante vis-à-vis de larves de schistosomes par des monocytes humains ¹

Nédocromil de Sodium ²	Sérum de patients infectés ³	Sérum de donneurs sains ³
0	73,0 ± 3,7	11,6 ± 2,5
2.24 10 ⁻¹¹ M	73,8 ± 6,9	6,6 ± 0,5
2.24 10 ⁻¹⁰ M	58,0 ± 5,5	11,2 ± 2,0
2.24 10 ⁻⁹ M	38,8 ± 4,7	8,3 ± 3,5
2.24 10 ⁻⁸ M	26,9 ± 4,7	13,8 ± 2,3
2.24 10 ⁻⁷ M	31,3 ± 8,5	23,2 ± 7,1
2.24 10 ⁻⁶ M	34,4 ± 5,0	15,8 ± 5,7

¹ La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de schistosomules morts après 24 h (moyennes ± SD de 4 expériences en duplicates). Sans monocytes, la cytotoxicité avec différentes concentrations de Nédocromil de Sodium n'excède jamais plus de 12 %

² Le Nédocromil de Sodium est ajouté 30 min avant les schistosomules

³ Sérum (de patients infectés par S. mansoni ou de donneurs sains) ajouté 6 h avant les schistosomules à une concentration de 20 %

Tableau II. Viabilité des phagocytes mononucléés avec et sans Nédocromil de Sodium

Nédocromil de Sodium incubé en		% de cellules vivantes
Sérum immun		
"	+ Nédocromil de Sodium 2.24 10 ⁻¹¹ M	98,0 ± 0,5
"	+ Nédocromil de Sodium 2.24 10 ⁻⁹ M	96,8 ± 0,6
"	+ Nédocromil de Sodium 2.24 10 ⁻⁷ M	96,7 ± 0,5
"	+ Nédocromil de Sodium 2.24 10 ⁻⁶ M	93,4 ± 0,6
"	+ Nédocromil de Sodium 2.24 10 ⁻⁶ M	94,2 ± 0,7

1 Le test au bleu trypan a été réalisé sur deux expériences en duplicates



Tableau III. Effet du Nédocromil de Sodium sur la cytotoxicité anti-schistosome IgE-dépendante par des plaquettes humaines ¹

Nédocromil de Sodium ²	Sérum de patients asthmatiques + anti-IgE	Sérum de donneurs sains
0	83,8 ± 2,2	2,6 ± 1,8
2.24 10 ⁻¹¹ M	80,0 ± 3,3	3,2 ± 0,8
2.24 10 ⁻¹⁰ M	60,8 ± 5,7	4,0 ± 0,5
2.24 10 ⁻⁹ M	25,4 ± 4,4	3,2 ± 0,4
2.24 10 ⁻⁸ M	43,3 ± 0,6	1,6 ± 1,7
2.24 10 ⁻⁷ M	55,0 ± 0,6	1,6 ± 0,3
2.24 10 ⁻⁶ M	58,5 ± 1,2	6,1 ± 1,7

¹ La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de schistosomules morts après une nuit d'incubation avec les plaquettes

² Le Nédocromil de Sodium est ajouté 30 min avant les schistosomules et 10 % de sérum (moyennes ± SD, 4 expériences en duplicates)

1 ng et de 1 μ g/ml de Tilade réduit la production des métabolites de l'oxygène à plus de 80 % (fig.1).

Des monocytes humains passivement sensibilisés avec du sérum de patients infectés par *S. mansoni* riche en IgE, ont un taux de chimioluminescence réduit lorsqu'ils sont préincubés avec du nédocromil de sodium aux doses de 100 ng/ml et de 1 μ g/ml avant l'addition d'anti-IgE (fig.2).

c Activité sur des enzymes lysosomiales

Il a été montré que le récepteur pour l'IgE à la surface de macrophages alvéolaires stimulés par de l'anti-IgE déclenche la synthèse et le relargage d'enzymes lysosomiales par la cellule (Joseph M. 1983). l'effet du nédocromil de sodium sur l'interaction des IgE des macrophages alvéolaires est évalué par la B-glucuronidase. A la concentration de 1 µg/ml le Tilade inhibe complètement la synthèse de B-glucuronidase induite par l'IgE. De façon analogue, la concentration de 1 ng/ml inhibe presque totalement le relargage de l'enzyme induite par l'IgE (fig.3).

DISCUSSION

La contribution des cellules inflammatoires, au moins dans la "late phase reaction" (réaction à phase tardive) de l'allergie médiée par l'IgE est maintenant largement acceptée. Leur implication est associée tout d'abord à la réponse indirecte de l'allergène sur les mastocytes et les basophiles, pour la génération de divers médiateurs puis par la libération de ces médiateurs durant l'interaction des allergènes spécifiques avec les IgE à la surface de ces cellules. (Duhran S.R.1986).

Plus récemment, la démonstration de cellules inflammatoires

-macrophages, éosinophiles, plaquettes, possédant elles mêmes un récepteur pour l'IgE, sont capables après stimulation de libérer de puissants médiateurs, (Capron A. 1986), dont la participation intervient dans différents troubles allergiques en particulier l'asthme. Ces considérations peuvent nous aider à expliquer les dilemmes majeurs associés à la découverte et au développement de médicaments utilisés pour l'allergie dans des conditions inflammatoires telles que l'asthme. L'incapacité de certaines drogues à moduler les mastocytes lors des réactions allergiques ou au contraire l'effet inhibiteur de certaines drogues sur ces réactions rend compte des problèmes rencontrés dans ces maladies. (Morley J. 1985).

Les paramètres métaboliques utilisés pour évaluer la stimulation IgE dépendante des phagocytes mononucléés et des plaquettes sont basés sur les observations précédentes ; à savoir que les IgE induisent pour ces populations cellulaires une cytotoxicité anti-parasitaire vis-à-vis des helminthes. (Joseph M. 1983).

Avec les plaquettes, les IgE anti-parasitaires peuvent être remplacées par de l'IgE myelomateuse ou des IgE spécifiques de l'allergène contenues dans les sérums d'individus asthmatiques ou allergiques, si les IgE de surface sont capables de se lier aux allergènes ou aux anti-IgE. (Joseph M. 1986).

La cytotoxicité exprimée par les monocytes et les plaquettes corrèle avec les modifications métaboliques telles que la génération de radicaux oxygénés quantifiés par

chimioluminescence, induite dans les mêmes conditions que celles de la cytotoxicité.

Finalement, les macrophages alvéolaires produisent différents médiateurs de l'inflammation (Rankin J.A. 1984), en particulier le LTB_4 et le PAF-acether. (Arnoux B. 1980). Dans ce contexte, il a été démontré que les macrophages alvéolaires humains libéraient de façon concomitante de la B-glucuronidase et du PAF-acether, (Joseph M; 1983), et du facteur chimiotactique pour les neutrophiles. (Gosset P. 1984). Ainsi, même si la B-glucuronidase n'est pas directement impliquée dans les réactions d'hypersensibilité, ce test enzymatique peut être utilisé en corrélation avec la sécrétion de médiateurs par les cellules suivant la stimulation IgE dépendante. Utilisant à la fois des paramètres physiologiques et métaboliques décrits ci-dessus, nos investigations se sont portées sur les effets du nédocromil de sodium en système IgE dépendant vis-à-vis de phagocytes mononucléés et de plaquettes sanguines. La substance inhibe significativement l'activation IgE dépendante des monocytes et des plaquettes, mesurée par la cytotoxicité à l'encontre des larves de schistosomes. L'inhibition de cet effet cytocide est parallèle à l'inhibition de la chimioluminescence des deux types de populations cellulaires. Nous n'avons pas d'explication claire pour la différence entre la forte inhibition de la cytotoxicité plaquettaire obtenue avec 1 ng/ml de nédocromil de sodium et l'accroissement de peroxydes

d'hydrogène quantifiés par chimioluminescence avec la même concentration. Une cinétique d'incubation avec le nédocromil de sodium a été réalisée, il apparait que 30 min soit un temps suffisant à la fois pour la production de lumière et pour la cytotoxicité quelque soit la concentration de Tilade.

La libération d'enzymes lysosomiales par des macrophages alvéolaires dans des conditions physio-pathologiques de l'inflammation chronique du poumon peut être expliquée en partie à cause des dommages causés à l'épithélium lors de l'hyper-activité bronchique, et elle décroît réversiblement finalement lors de dommages permanents. La libération des enzymes lysosomiales est accompagnée de celle d'autres médiateurs comme les LTC₄ et LTD₄, du PAF-acether et des LTB₄.

L'inhibition de la libération de ces enzymes et des molécules cytocides par le macrophage alvéolaire peut expliquer l'efficacité du nédocromil de sodium dans le traitement des maladies obstructives telles que l'asthme. L'inhibition du médicament sur les plaquettes justifie plusieurs investigations, en particulier l'implication des plaquettes dans des réactions systémiques de certains syndromes hypersensitifs comme le confirme l'hypersensitivité aux venins d'hyménoptères (Joseph M. 1986).

Fig. 2

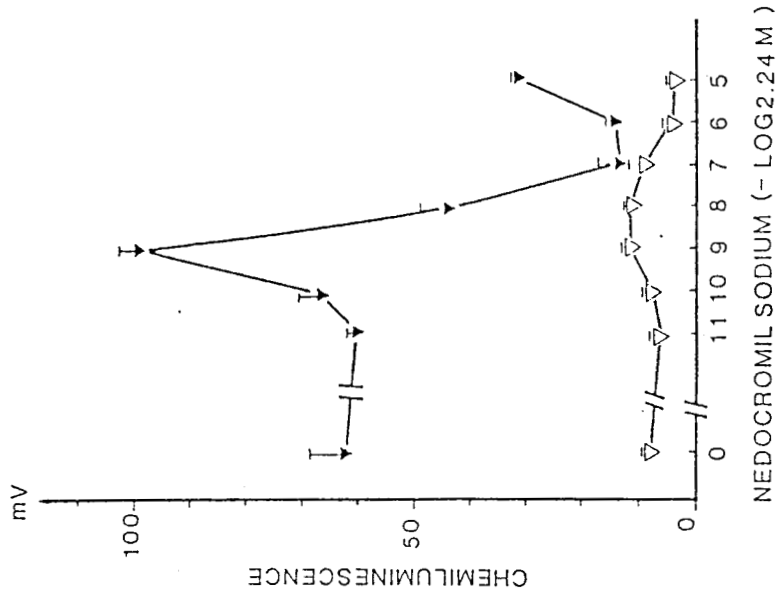


Fig. 1

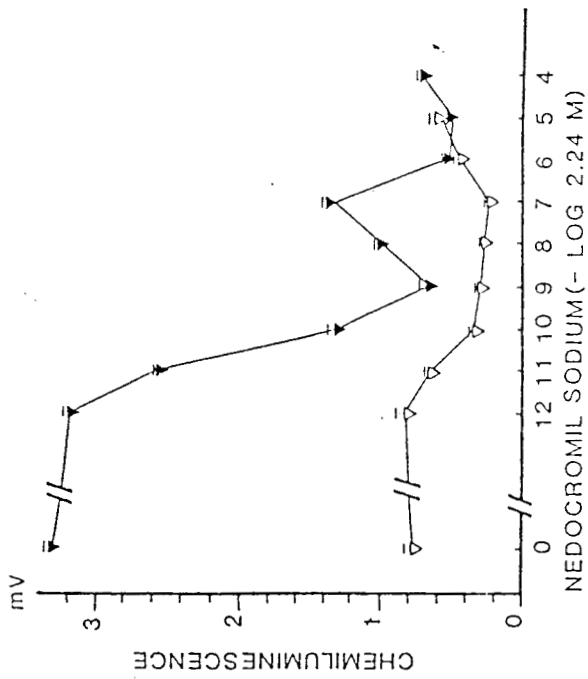
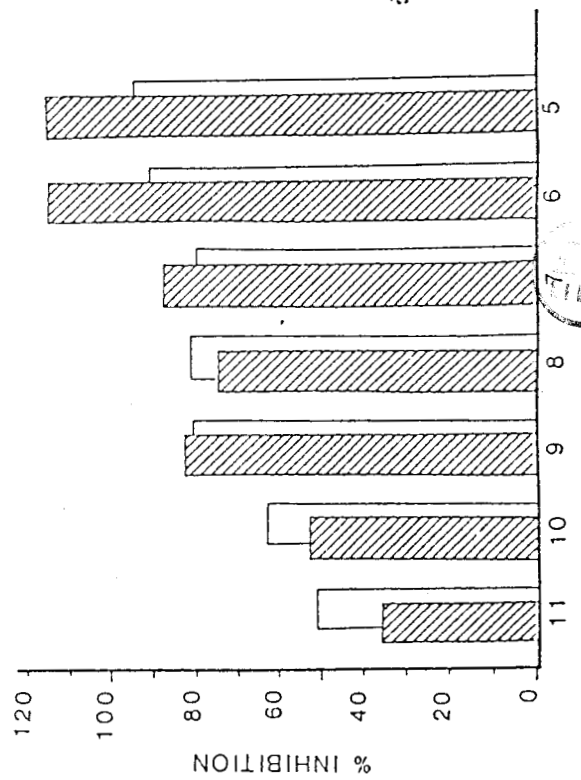


Fig. 3



Légende des figures :

fig.1 : Effet du nédocromil de sodium sur la production de métabolites de l'oxygène (essentiellement peroxydes d'hydrogène) quantifiés par chimioluminescence par des plaquettes humaines stimulées avec de l'anti-IgE. Le pic de lumière émise par des plaquettes de patients asthmatiques (▼) ou de donneurs sains (▽) est mesuré à 37 °C après 30 min de préincubation avec le nédocromil de sodium à la même température.

fig.2 : Effet du nédocromil de sodium sur la génération d'anions superoxydes par des monocytes humains stimulés par de l'anti-IgE.

Des monocytes normaux sont successivement incubés à 37 °C pendant 30 min avec du sérum de patients infectés par *S.mansoni* riche en IgE (▼) ou du sérum de donneur sain (▽) et à la même période et même température avec du nédocromil de sodium.

La production de lumière médiée par la lucigénine, émise par ces cellules est enregistrée après leur stimulation par de l'anti-IgE et le pic de chimioluminescence est mesuré après 5 min.

fig.3 : Effet du nédocromil de sodium sur le relargage et la synthèse de B-glucuronidase de macrophages alvéolaires humains stimulés par de l'IgE. Les histogrammes hachurés (▨)

représentent l'inhibition de la synthèse enzymatique, les blancs (☐) le relargage enzymatique, des macrophages alvéolaires stimulés avec de l'IgE/anti-IgE après 30 min de préincubation avec le nedocromil de sodium.

L'activité enzymatique est exprimée en nanomoles de substrat hydrolysé (paranitrophényl glucuronide) pour 10^6 macrophages alvéolaires par heure, et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition comparé au maximum d'activité en absence de médicament sur des macrophages alvéolaires non stimulés.

II Modulation de l'activation plaquettaire spécifique par le nédocromil de sodium dans l'asthme à l'aspirine

L'asthme à l'aspirine se traduit par la survenue d'un bronchospasme sévère après l'ingestion d'aspirine ou d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui, bien que structuralement non apparentés à l'aspirine, partagent avec cette drogue la propriété d'inhiber la cyclo-oxygénase. (Szczeklik A. 1977). La physiopathologie de ce désordre, décrit au début du siècle reste mystérieuse. Cette intolérance médicamenteuse est retrouvée chez 5 à 10 % des asthmatiques et apparaît en général au cours de la troisième ou quatrième décennie. (Spector S.L. 1983). Bien que l'intolérance à l'aspirine ne soit qu'une facette de la maladie asthmatique de ces patients, de nombreux auteurs ont cherché le moyen d'inhiber le bronchospasme induit par l'aspirine, ceci dans un but thérapeutique et dans l'espoir d'élucider le mécanisme responsable de cette intolérance.

La prise d'aspirine est suivie chez les patients intolérants à l'aspirine d'une période réfractaire qui permet par la prise régulière d'une dose supérieure à 600 mg/jour d'acide acétyl salicylique, l'installation d'un état de tolérance (Pleskow W. 1982). Cependant l'évolution de la maladie asthmatique n'est pas sensiblement modifiée et l'état de tolérance à l'aspirine tend à s'estomper en quelques semaines. (Dankner R.E. 1983, Baldocchi G. 1983).

Deux "anti-allergiques" : le kétotifène anti-histaminique H₂, et le cromoglycate de sodium (DSCG) stabilisateurs mastocytaires ont été essayés sans grand succès. (Basomba 1976).

Le nédocromil de sodium, qui a un profil d'action similaire au DSCG mais qui possède une activité sélective vis-à-vis du mastocyte muqueux (Wells E. 1986), méritait d'être étudié dans l'asthme à l'aspirine.

En raison de réactions parfois très violentes (bronchospasme sévère, angio-oedème) observées lors du test de provocation à l'aspirine, nous avons étudié dans un premier temps les effets éventuels du nédocromil de sodium dans un modèle *in vitro* ; le test d'activation plaquettaire aspirine dépendante.

Le prétraitement des plaquettes par de l'aspirine inhibe l'activation des plaquettes dans le modèle IgE dépendant ; paradoxalement il est apparu que l'aspirine induisait à elle seule une activation plaquettaire chez les patients souffrant d'asthme à l'aspirine, activation par ailleurs similaire dans ses effets (libération de médiateurs cytotoxiques et de métabolites de l'oxygène), à l'activation induite par les stimuli IgE dépendants. Chez ces patients l'activation plaquettaire non IgE dépendante était observée aussi avec d'autres AINS, qui partagent avec l'aspirine la capacité d'inhibition de la cyclo-oxygénase, mais qui n'ont aucune parenté structurale avec l'aspirine.

Par ailleurs salicylate de sodium et salicylamide, bien que

structuralement proches de l'aspirine, mais dépourvus de toute activité inhibitrice de la cyclo-oxygénase sont incapables d'activer directement les plaquettes de patients intolérants à l'aspirine. Cette anomalie est restreinte aux plaquettes, les basophiles et les monocytes de ces patients restant cependant activables par des stimuli IgE dépendants. (Ameisen J.C. 1985, 1986).

Toute une série d'expérimentations a permis d'exclure l'intervention de mécanismes immuno-allergologiques dans l'activation aspirine-dépendante, cette activation anormale apparaît liée à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et peut de plus être prévue *in vitro* par l'adjonction d'endopéroxydes de prostaglandines ou par la préincubation des plaquettes avec le salicylate de sodium et le salicylamide (Ameisen J.C. 1985).

Sans préjuger de l'intervention exclusive de cette anomalie plaquettaire dans l'asthme à l'aspirine, ces découvertes ont un triple intérêt, diagnostique, physiopathologique et thérapeutique. Le diagnostic d'intolérance à l'aspirine chez les patients asthmatiques peut maintenant faire appel au test d'activation plaquettaire aspirine dépendant (jusqu'alors seul le test de provocation permettait de poser le diagnostic). Sur le plan physiopathologique ce modèle devrait permettre de mieux cerner le rôle de la plaquette dans le bronchospasme. Enfin ce modèle permet de tester la modulation de l'activation plaquettaire par différentes drogues utilisées dans le

traitement de l'asthme.

L'activation plaquettaire est mise en évidence par la libération de médiateurs cytotoxiques pour les larves de *S. mansoni* et la génération de métabolites de l'oxygène.

Utilisant ce modèle nous avons étudié la modulation exercée *in vitro* par le nédocromil de sodium sur l'activation plaquettaire aspirine dépendante. Conjointement la modulation du médicament exercée "ex vivo" a été réalisée au laboratoire par Charles-Hugo Marquette (travail soumis pour publication, Amsterdam 1987).

Etude comparée du nédocromil de sodium et du cromoglycate de sodium (DSCG) sur des plaquettes de patients présentant un asthme à l'aspirine

Dans une première série d'étude, le nédocromil de sodium a été utilisé en comparaison avec le DSCG montrant une action inhibitrice sur des plaquettes stimulées par l'IgE. Ici en système IgE indépendant nous montrons que le Tilade inhibe significativement la stimulation ultérieure par l'aspirine de plaquettes d'asthmatiques intolérants à l'aspirine. Ceci permet d'entrevoir d'une part un effet anti-inflammatoire du nédocromil de sodium sur des cellules exprimant un récepteur Fc RII (dont la plaquette) et d'autre part un effet inhibiteur des plaquettes sanguines présentant une anomalie aux AINS, dans la mesure où

ces éléments sanguins pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'asthme provoqué par l'aspirine.

1) Test de cytotoxicité aspirine dépendant

Les tests ont été réalisés *in vitro* sur des plaquettes sanguines de 30 patients hospitalisés (dans le service du Pr. Tonnel A.B., Calmette), chez qui l'ingestion d'aspirine provoque des crises bronchospastiques.

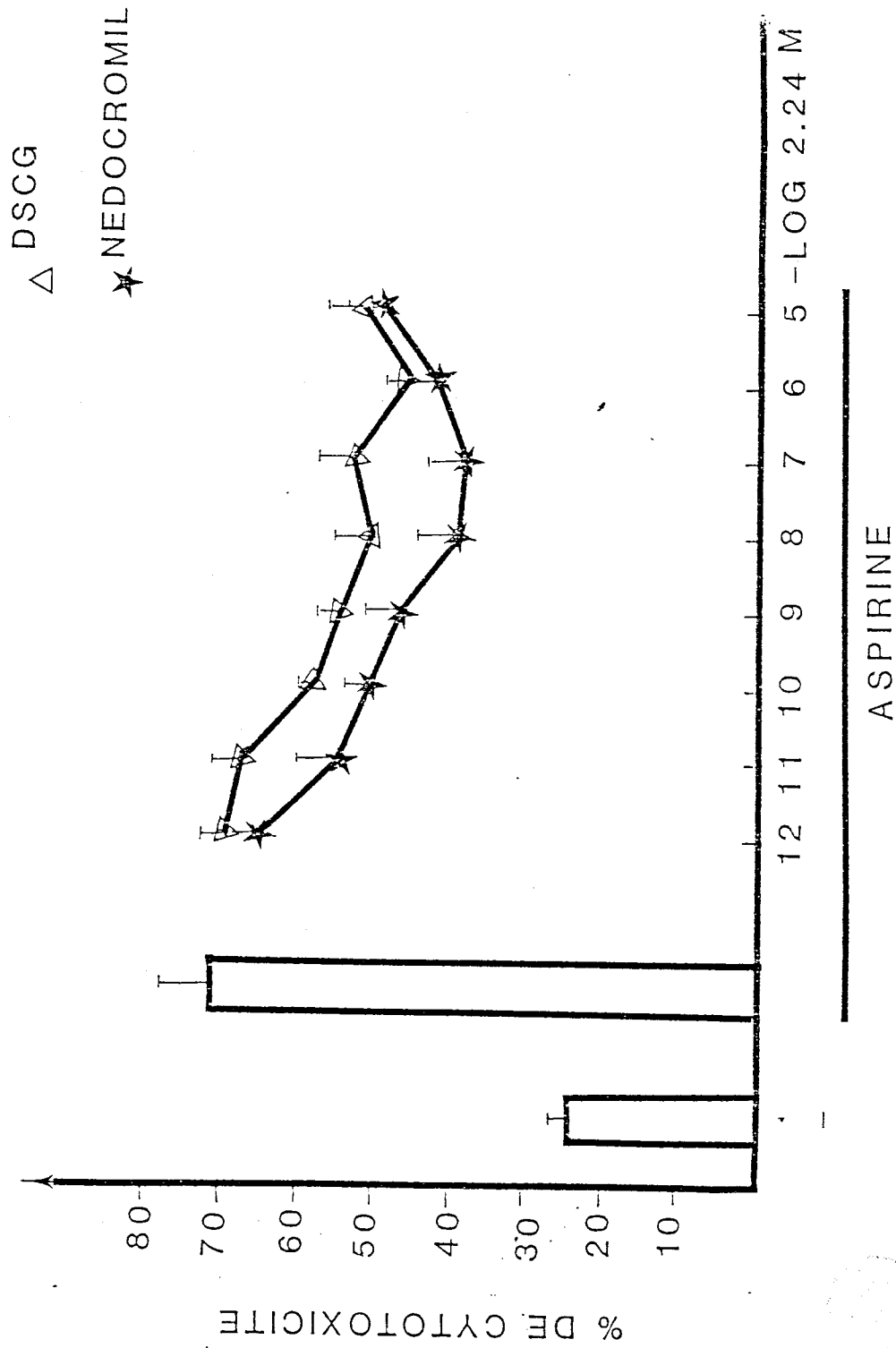
En présence d'aspirine 0,6 mM, les plaquettes de ces malades tuent *in vitro* les schistosomules. (68 à 72 % de cytotoxicité en présence d'aspirine par rapport à 20 à 22 % en présence du sérum du patient seulement).

Il apparaît que le nédocromil de sodium diminue fortement les propriétés toxiques de ces plaquettes avec une inhibition de 65 % pour la dose de $2,24 \cdot 10^{-7}$ M ($p = 2,89 \cdot 10^{-7}$) alors que les plaquettes de ces patients préincubées avec du DSCG sont beaucoup moins inhibées ($p = 4,77 \cdot 10^{-3}$) par rapport au test positif sans médicament.

La figure montre qu'il faut une concentration de DSCG 1000 fois plus forte ($2,24 \cdot 10^{-6}$ M) par rapport au nédocromil de sodium ($2,24 \cdot 10^{-9}$ M) pour obtenir une inhibition du même ordre de grandeur (50 % d'inhibition).

L'ensemble des résultats est présenté dans la figure et le tableau 1 .

Il apparaît que le nédocromil de sodium est plus efficace



Concentration de modulant	0	0	2.24 10 ⁻¹²	2.24 10 ⁻¹¹	2.24 10 ⁻¹⁰	2.24 10 ⁻⁹	2.24 10 ⁻⁸	2.24 10 ⁻⁷	2.24 10 ⁻⁶	2.24 10 ⁻⁵
Aspirine 0,6 mM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nédocromil de Sodium										
Moyenne en % de cytotoxicité	22,6	71,34	67,46	56,94	52,6	46,6	43,1	39,77	44,85	50,39
P (comparé au test positif *)		*	NS	<0,005	<5.10 ⁻⁴	<2.10 ⁻⁵	<2.10 ⁻⁶	<3.10 ⁻⁷	<10 ⁻⁵	<2.10 ⁻⁴
% d'inhibition effectif	30	30	13	16	17	21	26	30	26	19
			0,8	29,5	38,4	52,3	57,9	64,8	54,3	43,5
			13	16	17	21	26	30	26	19
Cromoglycate de Sodium										226
Moyenne en % de cytotoxicité	29,39	67,54	68,14	62,62	56,05	53,58	50,38	52,53	44,6	52,41
P (comparé au test positif *)		*	NS	NS	<0,03	<0,01	<10 ⁻³	<0,005	<10 ⁻⁴	<0,02
% d'inhibition effectif	26	26	12	15	15	20	22	26	22	15
comparaison Nédocromil/DSCG (valeur de p)			1,3	10,4	24,3	29,6	36,4	31,7	48,6	31,9
			12	15	15	20	22	26	22	15
			NS	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁷	NS	NS



Test de chimioluminescence dépendant de l'aspirine

	nombre de malades	chimioluminescence en mV ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
plaquettes en sérum autologue (sérum du patient)	6	$0,26 \pm 0,06$
plaquettes en sérum autologue + Aspirine 0,6 mM (déclencheur)	6	$1,06 \pm 0,44$
plaquettes en sérum autologue + Nédocromil de Sodium 2.10^{-7}M (30 min) + Aspirine 0,6 mM	6	$0,21 \pm 0,01$
plaquettes en sérum autologue + Nédocromil de Sodium 2.10^{-6}M (30 min) + Aspirine 0,6 mM	6	$0,30 \pm 0,11$

TABLEAU 2

que le DSCG *in vitro* . En effet, il inhibe à plus de 50 %, la stimulation ultérieure par l'aspirine de plaquettes de patients souffrant d'asthme à l'aspirine, sur une gamme de concentration allant de 10^{-9} M à 10^{-6} M avec un optimum à 10^{-7} M, alors que le cromoglycate atteint un peu plus de 48 % d'inhibition à la concentration de 10^{-6} M, soit une dose mille fois supérieure à celle qui donne une inhibition comparable avec le nédocromil de sodium.

2) Test de chimioluminescence dépendant de l'aspirine

Le nédocromil de sodium agit également sur les métabolites de l'oxygène produits par les plaquettes de patients présentant un asthme à l'aspirine après stimulation par l'aspirine (0,6 mM) quantifié par chimioluminescence (tableau 2).

A la dose de $2 \cdot 10^{-7}$ M le nédocromil de sodium inhibe la production des métabolites de l'oxygène à 86 % d'inhibition.

DISCUSSION

Le nédocromil de sodium et le DSCG inhibent tous deux de manière dose dépendante la cytotoxicité à l'encontre des larves de *S. mansoni* en présence d'aspirine 0,6 mM. Toutefois l'inhibition de 50 % de cette cytotoxicité est obtenue avec le

nédocromil pour des concentrations mille fois moindres que le DSCG.

Il serait intéressant de rechercher s'il existe une corrélation entre les taux plasmatiques de nédocromil de sodium et le degré d'inhibition plaquettaire obtenu. Il a déjà été constaté une similitude entre la courbe d'inhibition de la réactivité plaquettaire et celle des taux sériques de nédocromil de sodium obtenues après inhalation de 4 mg de cette drogue (DEA C.H. Marquette).

Le mécanisme d'action des cromones et du nédocromil de sodium en particulier n'est pas encore élucidé. L'action du DSCG sur le mastocyte semble passer par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire (Mazurek N. 1980) dont la caractérisation est en cours d'études et par la phosphorylation d'une protéine de PM 78000 (Wells E. 1983). L'intervention de la protéine kinase C est discutée (Kay A.B. 1987). Bien que le Tilade induise lui aussi la phosphorylation de la protéine mastocytaire de PM 78000 (Wells E. 1986) il n'est pas certain que les données concernant le DSCG puissent s'appliquer à cette molécule et encore moins à son action sur la plaquette, les relations structure activité observée pour les composés du groupe des cromones étant variables d'une molécule à l'autre. (Bronner C. 1985).

Sans préjuger du point d'impact du nédocromil de sodium sur le métabolisme plaquettaire il est intéressant de noter que l'activation aspirine dépendante des plaquettes prélevées 15 à

60 min après l'administration de Tilade est significativement inhibée en absence de médicament *in vitro* (les plaquettes lavées à double reprise étaient incubées en présence de sérum prélevé avant l'administration de nédocromil).

On peut envisager deux hypothèse :

- soit le nédocromil de sodium est capable d'induire très rapidement des modifications du métabolisme plaquettaire prévenant l'activation ultérieure de ces cellules par l'aspirine.
- soit le nédocromil est resté fixé sur un récepteur hypothétique (et malgré des lavages itératifs) et cette liaison rend les plaquettes réfractaires à l'activation par l'aspirine.

Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Quelle que soit l'explication de ce phénomène, l'inhibition ainsi obtenue reste de durée limitée (< 12 heures). Enfin ces résultats permettent d'exclure à priori un simple effet "scavenger" du médicament vis-à-vis des produits de l'activation plaquettaire (médiateurs cytotoxiques, métabolites de l'oxygène) soit de l'aspirine elle même.

Enfin, sans qu'il soit possible, par ces expériences, d'impliquer de manière plus précise les plaquettes dans la pathogénie de l'asthme aux AINS, il est intéressant de relever que le nédocromil de sodium est capable d'inhiber le seul élément cellulaire identifié à ce jour pour lequel on ait démontré une réactivité à l'aspirine.

CONCLUSION GENERALE

Les manipulations des mécanismes de défense anti-parasitaires et des fonctions effectrices des phagocytes mononucléés et des plaquettes sanguines par des immunomodulants exogènes, constituent une partie de la phase II des essais cliniques de médicaments avant leur autorisation de mise sur le marché (la phase I étant destinée à la pharmacologie et à la toxicologie du produit, la phase III représentant les tests cliniques à grande échelle).

Cette phase II représente donc l'épreuve des propriétés de l'immunomodulant *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

L'ensemble de ce travail sur les modificateurs exogènes de la réponse biologique montre qu'il existe parfois des effets paradoxaux, et que la distinction entre immunostimulants et immunosuppresseurs est quelque fois arbitraire.

Parmi les trois immunostimulants que nous avons testé, il apparaît que le LF 1695 sur les cellules accessoires comme les macrophages et les plaquettes amplifie à la fois *in vitro* et *in vivo* leur action cytocide à l'encontre des parasites de *S.mansoni*, en présence d'anticorps anaphylactiques, à des doses suboptimales. Cela implique que les mécanismes d'ADCC peuvent supporter, en partie, la potentialisation des différentes propriétés métaboliques des cellules effectrices, aussi bien dans le modèle expérimental qu'humain. D'autre part l'action du

LF 1695 *in vivo* stimule l'immunité humorale, principalement la production d'anticorps anti-parasitaires spécifiques. De plus l'augmentation d'IL1 renforce l'idée d'une action potentiellement auxiliaire de la substance sur la réponse immune.

Le Pind-Avi et l'Imuthiol n'ont subi que quelques "coups de sonde" dans différentes parasitoses, mais d'ores et déjà il semblerait que le PA 485 aurait une action dans la filariose de *B.Malayi*. L'action des deux immunostimulants sur des cellules Hela infestées par *T.gondii* semblerait elle aussi encourageante.

Le nédocromil de sodium, agent à potentialités anti-allergiques et aussi anti-inflammatoires, s'est révélé très prometteur, dans la mesure où nous avons trouvé les doses inhibitrices pour chaque type cellulaire vis-à-vis d'une activation liée à l'IgE, et une activité inhibitrice pour des plaquettes de patients présentant un asthme à l'aspirine.

L'immunopharmacologie engagée au laboratoire montre que les maladies parasitaires peuvent être une source d'études intéressante sur le plan physiopathologique. En effet ces modèles permettent de mieux cerner le rôle des cellules effectrices dans d'autres pathologies comme l'allergie, ou des tests d'activation cellulaire (comme le test d'activation plaquettaire aspirine dépendant) permettent de poser un diagnostic.

Par ailleurs le présent travail visant à rechercher une

éventuelle modulation de la réponse immune ou de la réponse biologique anormale de certaines maladies aboutit à exploiter les différents facteurs régulateurs des mécanismes d'action des différentes pathologies. C'est grâce à l'ouverture de ces "concepts originaux que nous apportons des débouchés nouveaux aux études immunopharmacologiques des immunomodulants, thématique ouvrant ainsi la voie à des perspectives diagnostiques et thérapeutiques nouvelles.

BIBLIOGRAPHIE

Afchain D., Fruit J., Petitprez A., Van Meirvenne V., Le Ray D., Bout D., Capron A. (1976).

Antigenic analysis of a variant specific component of *trypanosoma brucei brucei* I. Immunochemical purification by affinity chromatography.
Path. Biol. 24 : 615-617

Ameisen J.C., Capron A., Joseph M., Macclouf J., Vorng H., Pancre V., Fournier E., Wallaert B., Tonnel A.B. (1985).

Aspirin-sensitive asthma : abnormal platelet response to drugs inducing asthmatic attacks.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 78 :438-448

Ameisen J.C. (1986).

Aspirin-sensitive asthma : a model for a role of platelets in hypersensitivity reactions.
Ann. Inst. pasteur/Immunol. 137 D : 141-147

Ameisen J.C., Martineau J.B., Tonnel A.B., Macclouf J., Joseph M., Vargaftig B., Capron A. (1986).

Aspirin-sensitive asthma : role of endoperoxide receptors in the abnormal platelet response to NSAIDS.

6 th international congress to immunology Toronto juillet 1986, 660 n°53211

Ameisen J.C., Joseph M., Caen J.P., Kusnierz J.P., Capron M., Boizard B., Wautier J.L., Levy-Toledano S., Vorng H., Capron A. (1986).

A role for glycoprotein IIb/IIIa complex in the binding of IgE to human platelets and platelet IgE dependent cytotoxic functions.

British J. Haematol. 64 :21-32.

Anderson J., Fuglsang H., Marshall. T.F. (1976).

Effects of diethylcarbamazine on ocular onchocerciasis.
O.M.S. 76 : 122.

Anderson C.L., Spiegelberg H.L.(1981).

Macrophage receptors for IgE : binding of IgE to specific IgE Fc receptors on a human macrophage cell line U 937.

J. Immunol. 126 : 2470-2473

- Arnoux B., Duval D., Benveniste J. (1980).**
Release of platelet activating factor (PAF-acether) from alveolar macrophages by calcium ionophore and phagocytosis.
Eur. J. Clin. Invest. 10 : 437-441
- Ash L.R. (1973).**
Chronic *Brugia phagangi* and *Brugia malayi* infections in meriones unguiculatus.
J. Parasitol. 59 : 442-447.
- Auriault C., Joseph M., Tartar A., Bout D., Tonnel A.B., Capron A. (1985).**
Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of immunoglobulin G. I. Inhibition of rat and human macrophage activities.
Int. J. Immunopharmac. 7 (1) 73-79.
- Auty R.M. (1986).**
The clinical development of a new agent for the treatment of airway inflammation, nedocromil sodium (Tilade)
Eur. J. Respir. Dis. 69 (suppl.47) 120-131.
- Balloul J.M., Pierce R.J., Grzych J.M., Capron A. (1985).**
In vitro synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni*
Molecular and biochemical parasitology 17 : 105-114.
- Baldocchi G., Vervloet D., Charpin J. (1983).**
Acetyl-salicylic acid therapy in aspirin sensitive asthmatics.
J. Allergy Clin. Immunol. 71 : 148 (abstract).
- Basomba A., Romar A., Pelaerz A., Villalmanzo I.G., Campos A. (1976).**
The effect of sodium cromoglycate in preventing aspirin induced bronchospasm.
Clin. Allergy 6 : 269-275.
- Benveniste J. (1981).**
Platelet activating factor (PAF-acether).
Behring Inst. Mitt. 68 : 92-101.
- Bout D., Dupas H., Carlier Y., Afchain D., Capron A. (1977).**
High resistance induced by young live bacillus Calmette Guerin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice.
Ann. Immunol. (Inst.Pasteur) 128 C : 811-816.

Bout D., Joseph M., Pontet M., Vorng H., Deslee D., Capron A. (1986).

Rat resistance to schistosomiasis : platelet mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* 231 : 153-156.

Brener Z. (1973).

Live cycle of *Trypanosoma cruzi*.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 13 : 171-178.

Bronner C., Landry Y. (1985).

Kinetics of the inhibitory effects of flavonoids on histamine secretion from mast cells.

Agent Action 16 : 147-151.

Butterworth A.E. (1977).

The eosinophil and its role in immunity to helminth infection.

Current Topic. Microbiol. Immunol. 77 : 127-169.

Butterworth A.E., Vadas M.A., Wasson D.L. Dessein A., Morgan M., Sherry B., Gleich G.J., David J.R. (1979).

Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni* ; II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence.

J. Exp. Med. 150 : 1456-1471.

Butterworth A.E., Vadas M.A., Martz E., Sher A. (1979).

Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage.

J. Immunol. 122 : 1314-1321.

Capron A., Capron M., Dupas H., Bout D., Petitprez A. (1974).

Etudes *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immuns sérums sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*.

Int. J. Parasit. 4 : 1613.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Bazin H. (1975).

Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni*.

Nature, 253 : 474.

Capron A., Dessaint J.P. (1977).

IgE and cells in protective immunity.

Path. Biol. 25 : 287.

Capron A., Dessaint J.P., Haque A., Capron M. (1982).

Antibody dependent cell mediated cytotoxicity against parasites.

Progress in Allergy, 31, 234-267.

Capron A., Grzych J.M. (1983).

Les hybridomes et leurs applications.

Santé du monde (Immunology) Nov., 18-21.

Capron A., Ameisen J.C., Joseph M., Auriault C., Tonnel A.B., Caen J. (1985).

New functions for platelets and their pathological implications.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 77 : 107-114.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M. (1985).

Role of IgE in immune defense.

Proceeding of the XII international congress of Allergology and Clinical Immunology, Oct.85 Washington.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Joseph M., Ameisen J.C., Tonnel A.B. (1986).

From parasites to allergy : the second receptor for IgE (Fc γ RII).

Immunol. Today 7 : 15-18.

Capron A., Joseph M., Ameisen J.C., Capron M., Pancre V., Auriault C. (1987).

Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions.

Int. Arch. Allergy appl. Immun. 82 : 307-312.

Capron M., Bazin H., Joseph M., Capron A. (1981).

Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils.

J.Immunol. 126 1764.

Capron M., Capron A., Goetzel E.J., Austen K.F. (1981).

Tetrapeptides of eosinophil chemotactic factor anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor.

Nature 289 (5793) 71-73.

Capron M., Capron A., Abdel-Hofez S.K., Bazin H., Joseph M., Phillips S.M. (1983).

Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody dependent mechanism of resistance.

J. Immunol. 131 : 1475-1480.

Capron M., Capron A., Joseph M., Verwaerde C. (1983).

IgE receptors on phagocytic cells and immune response to shistosome infection.

Monogr. Allergy 18 : 33-34.

Capron M., Jouault T., Prin L., Joseph M., Ameisen J.C., Butterworth A.E., Papin J.P., Kusnierz J.P. Capron A. (1986).

Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor of eosinophils, platelets and macrophages (Fc γ R2).

J. Exp. Med. 164, 72-89

Capron M., Capron A. (1986).

Rats, mice and men models for immune effector mechanisms against schistosomiasis.

Parasitology 2 (3) : 69-75.

Carrière V. (1984).

Effet de la cyclosporine A sur la production des IgE.

D.E.A. de BIOLOGIE.1984.

Cesbron J.Y., Capron A., Boris B., Vargaftig M., Lagarde Pincemail J., Braquet P., Taelman H., Joseph M. (1987).

Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae.

Nature 325 (6104) 533-536.

Charley B. (1986).

Activité des immustimulants sur les propriétés des macrophages alvéolaires.

Congrès d'Alfort-Paris mars 1986. Immunostimulants : stratégie d'études.

Chedid L., Audibert F., Jolivet M. (1986).

Role of muramyl peptide for the enhancement of synthetic vaccines.

Develop. Biol. Standard. 63 : 133-140.

Chouaib S., Fradelizi D. (1982).

The mechanism of inhibition of human IL2 production.

J. Immunol. 129 : 2463-2468.

Clegg J.A., Smither S.R., Terry R.S. (1971).

Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*.

Nature 232 : 653-654.

Clegg J.A., Smithers S.R. (1972).

The effect of immune rhesus monkey-serum on schistosomula of *schistotoma mansoni* during cultivation *in vitro*.

Int. J.Parasitol. 2, 79-80.

Dankner R.E., Wedner H.J. (1983).

Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthma, failure to obtain maintain a desensitized state during prolonged therapy.

Am. Rev. Respir.Dis. 128 : 953-955.

Darcy F., Santoro F., Charif H., Deslee D., Hacot C., Capron A. (1987).

Toxoplasma gondii excreted-secreted antigens : first characterization and immunogenicity in human and experimental infections.
Immunology 173 : 241-242.

De Guchi H., Suemura M., Ishizaka A., Ozaki Y., Kishimoto S., Yamamura Y., Kishimoto T. (1983).

IgE class-specific suppressor T cells and factors in humans.
J.Immunol. 131 : 2751-2756.

Dessaint J.P., Capron M., Bout D., Capron A. (1975)

Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (*S. mansoni* or *S. haematobium*).
Clin. Exp. Immunol. 20 : 427-436.

Dessaint J.P., Torpier G., Capron M., Bazin H., Capron A. (1979).

Cytophilic binding of IgE to macrophage.I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat.
Cell. Immunol. 46 : 12-23.

Dessaint J.P., Capron A. (1986).

Interaction of phagocytic cells with immune complexes of anaphylactic antibodies.
The Reticuloendothelial system. A comprehensive treatise : Phillips S.M, Escobar M.R. (Eds).
Vol 9, Livre I, p 103-124.

Dubremetz J.F., Rodriguez C., Ferreira E. (1985).

Toxoplasma gondii : redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion.
Experimental Parasitology 59 : 24-32.

Eady R.P., Greenwood B., Jackson D.M., Orr T.S.C., Wells E. (1985).

The effect of nedocromil sodium and sodium cromoglycate on antigen-induced bronchoconstriction in the *Ascaris*-sensitive monkey.
Brit. J. Pharmacol. 85 : 323-325.

Feldmann M. (1985).

Lymphokines and interleukines emerge from the primeval soup.
Nature, 313 (6001) : 351-353.

Fidler J.I. (1981).

The *in situ* induction of tumoricidal activity in alveolar macrophages by liposomes containing Muramyl dipeptide is a thymus-independent process.

J. Immunol. 127 (1) : 1719-1720.

Ford-Hutchinson A.W. (1985)

Leukotrienes : their formation and role as inflammatory mediators.

Fed. Proc. 44 (I) : 25-29.

Frenkel J.K., Dubey J.P., Miller N. (1969).

Toxoplasma gondii : fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*.

Science. 168 (3878) : 432-433.

Fung M.C., Hapel A.J., Yner S., Cohen D.R., Johnson R.M., Campbell H.D., Young I.G. (1984).

Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3.

Nature 307 : 233-237.

Gleich G.J., Frigas E., Filley W.v., Loegering D.A. (1984).

Eosinophils and bronchial inflammation.

In Kay, Austen, Lichtenstein, Asthma : physiology, immunology, and treatment p.195-210.

(Academic Press London).

Gonzales-Molina A., Spiegelberg H.L. (1977).

A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE.

J. Clin. Invest. 59 : 616-624.

Gosset P., Tonnel A.B., Joseph M., Prin L., Mallart A., Charon J., Capron A. (1984).

Secretion of a chemotactic factor for the neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients.

J. Allergy Clin. Immunol. 74 : 827-834.

Grove D., Sahneider J. (1981).

Arm lymphedema associated with Filariasis.

Arch. Intern. Med. 141 : 137.

Haque A., Joseph M., Ouaisi M.A., Capron M., Capron A. (1980).

IgE antibody mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* *in vitro*.

Clin. Exp. Immunol. 40 : 487-495.

Haque A., Capron A. (1982).

Transplacental transfer of rodent microfilariae induces antigen-specific tolerance in rats.

Nature 299 (5881) : 361-363.

- Hirashima M., Yodoi J., Ishizaka K. (1980).**
Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. III. IgE-specific suppressive factor with IgE-binding activity.
J. Immunol. 125 : 1442-1448.
- Hirashima M., Yodoi J., Ishizaka k. (1980).**
Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. IV. Formation of IgE-binding factors in rats treated with complete Freund's adjuvant.
J. Immunol. 125 : 2154-2160.
- Hirashima M., Yodoi J., Ishizaka K. (1981).**
Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes III. Mechanisms of selective formation of IgE potentiating factors by treatment with *Bordetella pertussis* vaccine.
J. Immunol. 127 : 1804-1810.
- Hirashima M., Yodoi J., Huff T.F., Ishizaka K. (1981).**
Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. III. Mechanisms of selective formation of IgE suppressive factors by treatment with complete Freund's adjuvant.
J. Immunol. 127 : 1810-1816.
- Hoare C.A. (1964).**
Morphological and taxonomic studies on mammalian Trypanosomes. X. Revision of the systematics.
J. Protozool. II : 200-207.
- Hudson K.M., Freeman J.C., Byner C. Terry R.J. (1975).**
Immunodepression in experimental african Trypanosomiasis.
Trans. R; Soc. Trop. Med. Hyg. 69 : 273.
- Hudson K.M., Byner C., Freeman J., Terry R.J. (1976).**
Immunodepression, high IgM levels and evasion of immune response in murine Trypanosomiasis.
Nature 264 (5583) : 256-258.
- Huff T.F., Yodoi J., Uede T., Ishizaka K. (1984).**
Presence of an antigenic determinant common to rat IgE-potentiating factor, IgE-suppressive factor, and Fc receptors on T and B lymphocytes.
J. Immunol. 132 : 406-412.
- Hurley J.V (1983).**
Acute inflammation .
2nd edition. Churchill Livingstone.
Ch.1 : the nature of inflammation p. 1-7.

Hutchinson W.M., Dunachie J.F., Work K. (1968).

The fecal transmission of *Toxoplasma gondii*.
Acta path. microbiol. Scand. 74 : 462-464.

Hutchinson W.M., Dunachie J.F., Siim J.C., Work K. (1970).

Cocidian-like nature of *Toxoplasma gondii*.
Brit. Med. 142-144.

Iwaka M., Huff T.F., Uede T., Munoz T., Ishizaka K. (1983).

Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. II. Physiochemical properties and cell sources of glycosylation-enhancing factor.
J.Immunol. 130 : 1802-1808.

Iwaka M., Munoz J.J., Ishizaka K. (1983).

Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. IV. Identification of glycosylation enhancing factor as kallikrein like enzyme.
J. Immunol. 131 : 1954-1960.

Ishizaka K., Jardieu P., Akasaki M., Iwata M. (1987).

T cell factors involved in the regulation of the IgE synthesis.
Int. Archs.Allergy appl. Immun. 82 : 383-388.

Jacobs L., Melton M.L. (1965).

Toxoplasma cysts in tissue culture.
Progress Protozool. Intern. Cong. Protozool.
Excerpta Medica Found. 187-188.

Joseph M., Dessaint J.P., Capron A. (1977).

Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes.
Cell. Immunol. 34 : 247-258.

Joseph M., Capron A., Butterworth E.A., Sturrock R.F., Houba V. (1978).

Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro* : induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens.
Clin. Exp. Immunol. 33 : 45-56.

Joseph M., Auriault C., Capron A., Vorng H., Viens P. (1983).

A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes.
Nature 303 : 810-812.

Joseph M., Ameisen J.C., Kusnierz J.P., Pancre V., Capron M., Capron A. (1984).

Participation du récepteur pour l'IgE à la toxicité des plaquettes sanguines contre les schistosomes.
C.R.Acad.Sc.Paris 298 Série III n°3, 55-60.

Joseph M., Auriault C., Capron M., Ameisen J.C., Pancre V., Torpier G., Kusnierz J.P., Ovlaque G., Capron A. (1985).

Mechanism of cell-mediated cytotoxicity.II. Ed. by Nenkart P. Martz E. ; Plenum publishing corporation.New York , p23-33.

Livre série: Advances in experimental Med. and Biol. Vol. 184

Joseph M., Capron A., Ameisen J.C., Capron M., Vorng H., Pancre V., Kusnierz J.P., Auriault C. (1986).

The receptor for IgE on blood platelets.

Eur. J. Immunol. 16 : 306-312.

Joseph M., Capron A., Ameisen J.C., Caen J.P., Tsicopoulos A., Tonnel A.B. (1986).

The IgE dependant participation of platelets to cellular mechanisms in allergy.

Proceedings of the XII international congress of allergology and clinical immunology.

Oct. 85 Washington p 135-139.

Katz D.H., Bagatze R.F., Bogowictz C.A., Katz L.R. (1979).

Regulation of IgE antibody production by serum molecules. IV. Complete Freund's adjuvant induces both enhancing and suppressive activities detectable in the serum of low and high responder mice.

J. Immunol. 122 : 2184-2190.

Katz D.H., Bargatze R.F., Bogowitz C.A., Katz L.R. (1979).

Regulation of IgE antibody production by serum molecules. V. Evidence that coincidental sensitization and imbalance in normal damping mechanism results in "allergic breakthrough".

J. Immunol. 122 : 2191-2197.

Katz D.H. (1980).

Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man.

Immunology 41 : 1-21.

Kay A.B. (1987).

The mode of action of anti-allergic drugs.

Clin. Allergy 17 : 153-164.

Khalife J., Capron M., Capron A., Grzych J.M., Butterworth A.E., Dunne D.W., Ouma J.M. (1986).

Immunity in human *Schistosomiasis mansoni* regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies.

J. Exp. Med. 164 : 1626-1640.

Kuehl F.A., Egan R.W. (1980).

Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation.
Science 210 : 978-984.

Lagrange P.H., Burtrel B., Pascal M. (1985).

In vivo effects of LF 1695 on murine resistance against *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* (BCG) infections.
Int. J. Immunopharmacol. 7 (3) : 315.

Lal S., Malhotra S., Gribben D., Hodder D. (1984).

Nedocromil sodium : a new drug for the management of bronchial asthma.
Thorax 39 : 809-812.

Leung K.B.P., Flint K.C., Brostoff J., Hudspith B.N., Johnson N. McI., Pearce F.L. (1986).

A comparison of nedocromil sodium and sodium cromoglycate on human lung mast cells obtained by bronchoalveolar lavage and by dispersion of lung fragments.
Eur. J. Respir. Dis. 69 (suppl.147) : 223-226.

Lewis R.A., Austen K.F. (1981).

Mediation of local homeostasis and inflammation by leucotrienes and other mast cell-dependent compounds.
Nature 293 : 103-108.

Mackenzie C.D., Jungery M., Taylor P.M., Ogilvie B.M. (1981).

The *in vitro* interaction of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surfaces in the presence of complement or antibodies.
J. Pathol. 133 : 161-175.

Magnusson C.G.M., Cesbron J.Y., Djurup R., Capron A., Johansson S.G.O. (1986).

Raised serum IgG4 levels in patients with atopy and Filariasis : application of an automated particule-counting immunoassay using monoclonal antibody.
Int. Archs. allergy appl. Immun. 81 : 238-244.

Massicot J.G., Ishizaka K. (1986).

Workshop on measurement of *in vitro* IgE synthesis and regulation of IgE synthesis.
Allergy Clin. Immunol. 77 : 544.

Mayr A., Kalcher K. (1960).

Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenvirus in der Zellkultur.
Arch. Ges. Virusforsch 10 : 72.

Mayr A., Malicki K. (1966).

Attenuierung von virulentem Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und eigenschaften des attenuierten Virus.

Zbl. Vet. Med. B 13 : 1.

Mayr A. (1986).

Use of paramunization in raising pigs.

Tierärztliche Praxis 14 (2) : 237-244.

Mazingue C., Walker C., Domzig W., Capron A., De Weck A., Stadler B.M. (1987).

Effect of schistosome derived inhibitory factor on the cell cycle of T lymphocytes.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 83 : 12-18.

Mazurek N., Berger G., Pecht I. (1980).

A binding site on mast cells and basophils for the anti-allergic drug cromolyn.

Nature 286 : 722-723.

Messer R. (1984).

Notions récentes sur la 2 microglobuline.

J.Lab. Clin. Med. 104 (2) : 141-145.

Metzger H. (1983).

The receptor on mast cells and related cells with high affinity for IgE.

Contemp.Top. Mol. Immunol. 9 : 115.

Metzger H., Kinez J.P., Perez P., Montfort B., Rivay Wank S.A. (1986).

A tetrameric model for the structure of the mast cell receptor with high affinity for IgE.

Prog. Immunol. 5 : 493.

Miles M.A. (1980).

Cloning *Trypanosoma cruzi*.

Trans. R; soc. Trop. Med. Hyg. 68 : 256.

Morley J. (1976).

Prostaglandins as regulators of lymphoid cell function in allergic inflammation : a basis for chronicity in rheumatoid arthritis.

Infection and immunology in the rheumatic diseases.

Dumond Dc. ed. (livre I 172) p.511-517.

Morley J., Page G.P., Mazzoni L., Sanjar S. (1985).

Anti-allergic drugs in asthma.

Triangle 24 : 59-70.

Morley J., Page C.P., Mazzoni L., Sanjar S. (1986).

Effects of ketotifen upon responses to platelet activating factor : a basis for asthma prophylaxis. From the preclinical research Sandoz Ltd, CH-4002 Basle Switzerland.
vol.56 Annals of Allergy.

Muller-Brunecker G., Erfle V., Mayr A. (1986).

Comparison of the effect of viral paramunity inducers Pind-Avi and Pind-ORF with that of BCG, *corynebacterium parvum* and levamisole on the grow of radiation-induced murine osteosarcoma.
Zentralbl Veterinarmed B 33 (3) : 188-195.

Muller Peddinghaus R. (1984).

In vitro determination of phagocytes activity by luminol and lucigenin amplified chemiluminescence.
Int. J. Immunopharmacol. 6, 455-466

Nacy C.A., Fortier A.H., Melzer M.S., Buchmeer N.A., Schreiber R.D. (1985).

Macrophage activation to kill *Leishmania major* : activation of macrophages for intra cellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon and non interferon lymphokines.
J. Immunol. 135 : 3505-3511.

Naylor P.H., Friedman-Kien A. Herish E., Erdos M., Goldstein A.L., (1986).

Thymosin 1 and thymosin 18 in serum : comparison of normal, cord, homosexual and AIDS serum.
Int. J. Immunopharmac. 8 (7) : 667-676.

Othmane O., Touraine J.L., Sanhadji K., Blanc N., Pascal M. (1985).

Effect of long term treatment with LF 1695 on murine lupus.
Int. J. Immunopharmacol. 7, (3) 317.

Pancre V., Auriault C., Joseph M., Cesbron J.Y., Kusnierz J.P., Capron A. (1986).

A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions.
J. Immunol. 137 : 585-595.

Pascal M., Desnoyers P., Majoie B. (1982).

Evaluation of an immunomodulator LF 1695 on murine immune function.
Int. J. Immunopharmac. 4 : 288.

Pascal M., Derrepas P. (1986).

Increased IL1 and modulation of IL2 production by murine macrophages and lymphocytes treated with LF 1695.

Int. J. Immunopharmac. 8 (5) : 499-508.

Patscheke H. (1981).

Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate.

Haemostasis, 10, 14-15.

Perrin L., Perez A., Chizzolini C. (1984).

Malaria : immunity, vaccination and immunodiagnostics.

Experimentia 40 (12) : 1343-1350.

Perrin D., Garbang-Chenon A., Dutartre P., Pascal M., Bricout F., Nicolas F.C. (1985).

Effect of the LF 1695 on herpes simplex virus infection on mice.

Int. J. Immunopharmac. 7(3) : 314

Phillips J.H., Babcock G.F., Nishioka K. (1981).

Tuftin : a naturally occurring immunopotentiating factor. I. *In vitro* enhancement of murine natural cell-mediated cytotoxicity.

J. Immunol. 126 (3) : 915-921.

Phillips S.M., Bentley A.G., Ginette G., Doughty B.L., Capron M. (1983).

The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance.

J. Immunol. 131 : 1466-1474.

Pleskow W.W., Stevenson D.D., Mathison D.A., Simon R.A., Schatz M., Zeiger R.S. (1982).

Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthmatic patients : clinical manifestations and characterization of refractory period.

J. Allergy Clin. Immunol. 69 : 1119.

Pompidou A., Schramm B. (1971).

Identification of thymic-dependent lymphocytes.

Lancet 7718 : 245.

Pompidou A., Lang J.M., Telvi L., Delseaux M.C., Sarin P. (1986).

Influence des immunomodulateurs sur la différenciation des lymphocytes T et la résistance à l'infection par le virus LAV/HTL VIII.

Congrès d'Alfort-Paris mars 1986.

Immunostimulants : stratégie d'études.

Rankin J.A., Askenase P. W. (1984).

Potentiel role of macrophages as a source of pathogenic mediators in allergic asthma.

In Kay, Austen, Lichtenstein, Asthma : Physiology, Immunopharmacology, and treatment.p. 157-171.
(Academic Press, London).

Renoux G., Renoux M., (1973).

Lien entre les événements immunologiques et le contrôle génétique de l'activité enzymatique des macrophages et des lymphocytes.

CR Acad.Sci. 276 D : 861-865.

Renoux G., Bizière K., Renoux M., Gyenes L., Degenne D., Guillaumin J.M., Bardos P., Lebranchu Y. (1980).

Effects of the ablation of the left cerebral cortex on T-cell number and cell-mediated responses in mouse.

Internat. J. Immunopharmacol. 2 : 156.

Renoux G. (1982).

Immunopharmacologie et pharmacologie du diéthylldithiocarbamate (DTC).

J. Pharmacol.13 (suppl.I) : 95-134.

Renoux G., Wybran J. (1982).

Effects of LF1695 on immune fonction *in vitro* and *in vivo*.

Advances in immunopharmacology, Pergamon Press, p.815.

Riley P.A., Mather M.E., Keogh R.W., Eady R.P. (1987).

The activity of nedocromil sodium in mast cells dependent reactions in rat.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 52 : 108-110.

Robinson M.R. (1985).

BCG in the management of superficial bladder cancer. Prog. Clin. Biol. Res. 1858 : 161-166.

Sanderson C.J., O'Garra M., Warren D.J., Kaus G.G.B. (1986).

Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity, proposed name interleukine 4 PNAS 83 : 437-440.

Schleich T., Stickl H. (1986).

Effect of Pind-Avi on various ratios of helper and suppressor T lymphocytes.

Klinische Wochenschrift 64 (22) : 1192-1197.

Scott M.T., Bahr G., Moddaber F., Afchain D., Chedid L. (1984).

Adjuvant requirement for protective immunization of mice using a *Trypanozoma cruzi* 90 K cell surface glycoprotein.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 74 : 373-377.

Sher A., Hall B.F., Vadas M.A. (1978).

Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*.

J. Exp. Med. 148 : 46-57.

Smith K.A. (1987).

The two chain structure of high affinity IL2 receptors.

Immunology Today 8 : 11-13.

Smithers S.R., Terry R.J. (1965).

Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in rhesus monkey (*Macaca mulatta*).

Parasit. 55 : 701-710.

Smithers S.R., Terry R.J. (1969).

Immunity in schistosomiasis.

Ann.N.Y. Acad.Sci. 160 : 826-840.

Spector S.L., Fanr R.S. (1983).

Aspirin idiosyncrasy, in Middleton E, Reed C.E., Ellis E.F. (eds).

Allergy principles and practice.

Saint Louis, CV Mosby Co, p. 1249-1273.

Spiegelberg H.L., O'Comor R.D., Simon R.A., Mathison D.A. (1979).

Lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors in patients with atopic disorders.

J. Clin. Invest. 64 : 714-720.

Spreafico F. (1985).

Problems and challenges in the use of immunomodulating agents.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 76(suppl.1) 108-118

Stadler B.M. (1987).

Immunoregulation in allergy.

Congrès d'Allergologie et d'Immunologie à Genève avril 1987.

Staib F., Seeliger H.R.P., Cura J. (1966).

Preliminary investigations for the formation of antibodies sensitive and resistant to 2-mercapto-ethanol in experimental Toxoplasmosis.

Ztschr. Med. Mikrob. Immunol. 153 (1) : 20-30.

Suemura M., Yodoi J., Hirashima M., Ishizaka K. (1980).

Regulatory role of IgE-binding factors from rat lymphocytes. I. Mechanism of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor.

J. Immunol. 125 : 148-154.

Szasz G. (1967).

Die Bestimmung der glucuronidase aktivität in serum mit p-nitrophenyl-glucuronic.

Clin. Chimica Acta, 15, 275.

Szczeklik A., Gryglewski R.J., Czerniawska-Mysik G. (1977).

Clinical patterns of hypersensitivity to non steroidal anti-inflammatory drugs and their pathogenesis.

J. Allergy Clin. Immunol. 60 : 276-284.

Tada M., Hinuma S., Abo T., Kumagai K. (1980).

Murine antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity failure to detect effector cells equivalent to human K cells.

J. Immunol. 124 : 1929-1936.

Takashima T., Collins F.M. (1987).

Immunosuppressive effect of cyclosporine A on *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice.

Infect. Immun. 55 (7) 1701-1706.

Tibayrenc M., Breniere F., Barnabe C., Lemesre J.L., Echalar L., Desjeux P. (1985).

Isozymic variability of *trypanosoma cruzi* : biological and epidemiological significance.

Ann. Soc. Belge Med. Trop. 65 : suppl. I 59-61.

Tonnel A.B. (1986).

F_C R positive cells and monitoring of inflammatory reaction.

12^{eme} forum d'Immunologie.

Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 137C : 367.

Touraine J.L. (1986).

Evaluation clinique des immunomodulants chez l'homme hors cancerologie.

Congrès d'Alfort-Paris mars 1986.

Immunostimulants : stratégie d'études.

Tsicopoulos A. (1987).

Effect of disodium cromoglycate on inflammatory cells bearing the F_C epsilon recepteur type II

(F_C RII).

Int. J. Immunopharmac. (Soumis)

- Uede T., Hirata H., Hirashima M., Ishizaka K. (1983).**
Modulation of the biologic activities of IgE-binding factors. I. Identification of glycosylation inhibiting factor as a fragment of lipomodulin.
J. Immunol. 130 : 878-884.
- Urban J.F., Ishizaka T. (1977).**
IgE formation in the rat following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. III. Soluble factor for the generation of IgE-bearing lymphocytes.
J. Immunol. 119 : 583-590.
- Urban J.F., Ishizaka K. (1978).**
IgE-B cell generating factor from lymphocytes cells of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. II. Effector mechanisms of IgE-B cell generating factor.
J. Immunol. 121 : 199-203.
- Urban J.F., Ishizaka T., Ishizaka K. (1978).**
IgE-B cell generating factor from lymphocytes cells of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. I. Source of IgE-B cell generating factor.
J. Immunol. 121 : 192-198.
- Vargaftig B., Benveniste J. (1983).**
Plaquettes et inflammation : rôle des médiateurs. Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et ses dérivés.
Masson Ed. 102-111.
- Verwaerde C., Joseph M., Capron M., Pierce R.J., Damonville M., Velge F., Auriault C., Capron A. (1987).**
Functional properties of rat monoclonal IgE antibody specific for *S.mansoni*.
J. Immunol. 138 : 4441-4446.
- Watanabe N., Ovary Z. (1977).**
Suppression of IgE antibody production in SJL mice. III. Characterization of a suppressor substance extracted from SJL spleen cells.
J. Exp. Med. 145 : 1501-1510.
- Wells E., Mann J. (1983).**
Phosphorylation of a mast cell protein in response to treatment with anti-allergic compounds.
Biochem. Pharm. 32 : 837-842.

Wells E., Jackson C.G., Harper S.T., Mann J., Eady R.P. (1986).

Characterisation of primate broncho alveolar mast cells.II. Inhibition of histamine, LTC₄, and PGD₂ release from primate broncho alveolar mast cells and a comparison with rat peritoneal mast cells.
J.Immunol. 137 : 3941-3945.

White Head T., Thorpe G., Calter T., Groucutt C., Kricka L. (1983).

Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxylase labelled conjugates in immuno-assay.
Nature, 305, 158-159.

Williams J.F., Lowitt S., Szentivanyi A. (1980).

Endotoxin depression of hepatic mixed function oxidase system in C3H/HeJ and C3H/HeN mice.
Immunopharmacol. 2 : 285-291.

Williams A.J., Cole P.J. (1981).

Investigation of alveolar macrophage function using lucigenin dependent chemiluminescence.
Thorax 36 : 866-869.

Williams A.J., Cole P.J. (1981).

The onset of polymorphonuclear leucocyte membrane-stimulated metabolic activity.
Immunology, 43, 733-739.

Yodoi J., Ishizaka K. (1979).

Lymphocytes bearing F_C receptors for IgE.I. Presence of human and rat T lymphocytes with F_C receptors.
J. Immunol. 122 : 2577-2583.

Yodoi J., Ishizaka K. (1980).

Lymphocytes bearing F_C receptors for IgE. IV. Formation of IgE-binding factor by rat T lymphocytes.
J. Immunol. 124 : 1322-1329.

Yodoi J., Hirashima M., Ishizaka K. (1981).

Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. V. Effect of tunicamycin on the formation and IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor by Con A-activated lymphocytes.
J.Immunol. 126 : 877-882.

Yodoi J., Hirashima M., Bloom B.R., Ishizaka K. (1981).

Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocyte. I. Induction of IgE binding factors by poly I:C and interferon.

J. Immunol. 127 : 1579-1585.

Yodoi J., Hirashima M., Ishizaka K. (1982).

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T Lymphocytes. V. The carbohydrate moieties in IgE-suppressive factors.

J. Immunol. 128 : 289-295.

PUBLICATIONS	6
RESUME	6
INTRODUCTION	11
GENERALITES	12.
A) MECANISMES DE DEFENSE ANTI-PARASITAIRES ET INTERVENTION DES IGE DANS CERTAINS MODELES.	18
I Mécanismes anti-parasitaires.	19
a Immunité humorale.	24
b Immunité à médiation cellulaire.	25
- Bilharziose	25
- Toxoplasmose	26
- Maladie de Chagas	31
- Filarioses	39
c Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps.	45
II Les Immunoglobulines E.	50
1) Rôle de l'IgE et de son récepteur Fc ϵ RII dans la cytotoxicité.	50
2) Biosynthèse des IgE et leur régulation.	54
B) PARTICIPATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES DANS L'ALLERGIE ET L'INFLAMMATION.	65
I Cellules de l'inflammation.	66
II L'inflammation.	69
a Facteurs de la réaction inflammatoire.	71
b Médiateurs de l'inflammation.	86
C) LES IMMUNOMODULANTS.	96
I Les Immunostimulants.	96
II Les Immunosuppresseurs.	105

MATERIEL ET METHODES	113
LES IMMUNOMODULANTS.	113
1) LF 1695.	113
- Utilisation <i>in vitro</i> .	113
- Utilisation <i>in vivo</i> .	115
2) Pind-Avi.	117
3) Imuthiol.	117
4) DSCG.	119
5) Nédocromil de Sodium.	119
LES PARASITES.	121
A <i>S. mansoni</i> .	121
1 Les cercaires.	121
2 Les schistosomules.	121
B <i>B. malayi</i> .	122
C Toxoplasmose.	123
- Souche chronique.	123
- Souche virulente.	123
D <i>T. cruzi</i> .	123
LES HOTES MAMMIFERES.	123
A Rats Fischer.	124
B Souris Balb/c.	124
C Mastomys.	124
LES CELLULES.	124
1) Les macrophages.	124
- Origine.	124
- Isolement et préparation.	125

2) Les monocytes humains.	128
- Méthode au dextran.	128
- Méthode au ficoll.	129
3) Les plaquettes.	130
- Origine.	130
- Isolement et préparation.	131
TESTS FONCTIONNELS DE CYTOTOXICITE IN VITRO	133
VIS-A-VIS DES SCHISTOSOMULES.	
I Dépendant des IgE.	133
1) Macrophages.	133
2) Plaquettes.	134
II Dépendant de l'aspirine.	134
a) Plaquettes d'asthmatiques sensibles à l'aspirine.	134
b) Test de cytotoxicité aspirine dépendant.	135
PARAMETRES METABOLIQUES.	135
I Chimiluminescence.	135
- Réactifs.	136
- Protocole.	137
a Chimiluminescence en luminol - luciférine.	137
b Chimiluminescence en lucigénine.	138
II Dosage de la β-glucuronidase.	139
1) Activation des macrophages.	139
2) Dosage de la β -glucuronidase.	140

VISUALISATION DES TOXOPLASMES DANS LES CELLULES HELA.	141
MESURE DE LA PRODUCTION D'IL1 PAR DES MACROPHAGES STIMULES PAR LE LF 1695.	142
RESULTATS	144
A) LES IMMUNOSTIMULANTS.	145
I Le LF 1695.	146
1) Cytotoxicité anti-parasitaire.	147
2) Stimulation de l'immunité humorale.	153
3) Stimulation de l'immunité acquise.	155
4) Enzymes lysosomiales (β glucuronidase).	159
5) Sécrétion d'IL1.	161
6) Potentiation du métabolisme oxydatif.	161
Discussion.	164
II Imuthiol et Pind-Avi.	167
a Imuthiol.	167
- infection à <i>T. cruzi</i> .	167
- infection à <i>B. malayi</i> .	171
- toxoplasmose.	174
b Pind-Avi.	176
- infection à <i>B. malayi</i> .	178
- maladie de Chagas.	180
- toxoplasmose.	184
Discussion.	190

B) LES IMMUNOINHIBITEURS.	192
I Le Nédocromil de Sodium : modulateur de la réponse IgE.	192
1) Régulation des fonctions anti-parasitaires IgE dépendantes de macrophages et de plaquettes de rats.	193
a Cytotoxicité anti-parasitaire.	193
b Viabilité cellulaire.	194
c Chimiluminescence.	198
d Enzymes lysosomiales.	202
Discussion.	203
2) Inhibition par le Nédocromil de Sodium de l'activation IgE dépendante de phagocytes mononucléés et de plaquettes humaines dans l'allergie.	206
a Cytotoxicité anti-parasitaire.	208
b Chimiluminescence.	208
c Activité sur les enzymes lysosomiales.	213
Discussion.	213
II Modulation de l'activation plaquettaire spécifique par le Nédocromil de Sodium dans l'asthme à l'aspirine. Etude comparée avec le Cromoglycate de Sodium.	220
1) Test de cytotoxicité aspirine dépendant.	224
2) Test de chimiluminescence dépendant de l'aspirine.	228
Discussion.	228

CONCLUSION GENERALE	231
BIBLIOGRAPHIE	234
TABLE DES MATIERES	255