

**Réaction d'hypersensibilité cutanée chez le cobaye
consécutive à l'inoculation intra-dermique
d'un antigène chlamydien
(« virus » de l'avortement de la brebis)
purifié inactivé**

par P. FAYE, A. CHARTON, J. BRUGÈRE, Cl. LE LAYEC, M. SOLSONA,
C. LEFRANÇOIS et M. GUESLIN

La réaction immunitaire provoquée, chez l'animal d'expérience, par l'inoculation d'antigènes préparés à partir de la chlamydiacée responsable de l'avortement enzootique des petits ruminants, visualisée et mesurée par l'application d'une méthode sérologique, « in vitro » (déviation du complément, séro-neutralisation, micro-agglutination, immunofluorescence, etc...) se définit comme une réaction humorale, dans laquelle le rôle essentiel revient aux anticorps circulants. Est-il possible de mettre en évidence, à côté de cette réaction humorale, une réponse immunitaire de type cellulaire dont l'hypersensibilité retardée est considérée comme le modèle ?

MATÉRIEL ET MÉTHODES

— L'antigène utilisé ici est préparé à partir de l'une des souches de *Rakeia ovis* isolées au laboratoire de placenta de brebis avortée, directement en ovoculture et entretenues par passages successifs sur œuf embryonné. Concentration et purification de l'antigène sont obtenues par des méthodes de centrifugations différentielles et chromatographie déjà décrites. La concentration en « virus » est déterminée en fonction du titre limite au-delà duquel ne s'observent plus, à l'examen microscopique, de corps élémentaires dans un frottis coloré effectué avec 1/20 de millilitre de suspension diluée. L'inactivation est obtenue par l'action du formol et par la rupture des corps élémentaires dans l'appareil à ultra-sons en 20 minutes au maximum d'intensité. Le traitement aux ultra-sons permet, par ailleurs, de libérer cer-

taines, au moins, des fractions antigéniques internes que risque de masquer l'enveloppe des corps élémentaires (on sait qu'elle est extraordinairement résistante et de structure complexe). Cette inactivation est contrôlée par inoculation à l'œuf embryonné.

— Les cobayes utilisés comme « réactif » sont des cobayes Hartley albinos syngéniques, « pathogen-free », dont l'eau de boisson est additionnée d'acide ascorbique.

Les inoculations sensibilisantes comportent l'injection, dans le derme plantaire d'une patte postérieure, de 0,15 ml de l'antigène concentré défini plus haut et de 0,05 ml d'antigène complet de Freund. Les inoculations d'épreuve sont effectuées six jours plus tard, dans le derme de la peau du flanc du même côté, à un centimètre environ des ganglions précuraux, après tonte soignée de la région. Le transfert, de l'état d'hypersensibilité obtenu chez les sujets inoculés, au cobaye « neuf », est testé par injection intra-péritonéale chez ce dernier du surnageant, après simple décantation à froid, du broyat fin, aux ciseaux, des ganglions précuraux et poplités réactionnels prélevés au 6^e jour chez les cobayes sensibilisés : l'inoculation est de 1 ml, contenant 10^8 - 10^9 cellules/ml. La lecture des réactions d'épreuve est faite au cours des 72 heures qui suivent l'injection intra-dermique dans la peau du flanc. Cette lecture donne lieu à une appréciation semi-quantitative, selon les notations :

- léger érythème : +
- léger épaissement du derme avec érythème : ++
- épaissement (X 2 à X 4) du derme (papule érythémateuse) : +++
- même lésion, mais accompagnée de nécrose : ++++

— Le contrôle de la présence ou de l'absence d'anticorps circulants est effectué par déviation du complément, en présence du même antigène, selon une semi-micro méthode adaptée de la technique de Kolmer, utilisant pour chaque dilution de sérum (de 1/1 à 1/256) 2 unités d'antigène et 2 unités de complément.

— La désensibilisation est recherchée chez les sujets donnant une réaction positive, par inoculation intra-péritonéale, de 0,25 ml d'antigène concentré suivie, six heures plus tard, d'une injection intra-dermique dans la peau du flanc du même antigène (0,25 ml).

— L'essai utilise neuf sujets « jumeaux », selon le protocole résumé dans le tableau ci-joint.

| Cobayes n° | Jours | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-----------------|-----------------|------------|----------|--------------------|--------------------|----------------|
| | J | J + 6 | J + 6 + 36 h | J + 6 + 72 h | J + 1 mois | | | | |
| | | | | | J' | J' + 6 h | J' + 6 h + 36 h | J' + 6 h + 96 h | J' + 1 SEM. |
| | X | | | | | | | | |
| Injection intradermique (cousinet plantaire) Antigène 0,15 ml + Freund 0,05 ml | X | | | | | X | ++ | ++ | ++ |
| Injection intradermique (cousinet plantaire) (Freund seul (0,05 ml) ... | | X | | | | X | ++ | ++ | ++ |
| En attente | X | | | | | | | | |
| Injection intradermique flanc (Anti- gène seul 0,25 ml) | | X | | | | | | | |
| Prélèvement des ganglions (précru- raux et popité) | | X | X | | | | | | |
| Injection intra-péritonéale de suspen- sion (Lymphocytes + Hanks : 1 ml) | | | (3) X | | | | | | |
| Prélèvement des lésions plantaires.... | (5) X | | | | | | | | |
| Lecture des réactions I. D. flanc. | | | | | | | | | |
| Injection intradermique flanc (Anti- gène seul 0,25 ml) | X | | | | X | | | | |
| Lecture des réactions I. D. flanc. | ♀ | | | | ++ | | | | |
| Prélèvement des lésions de la peau du flanc | | | | | X | | | | |
| Injection intra-péritonéale (Antigène seul) | | | | | X | | | | |
| Injection intradermique flanc 6 h + tard (Antigène 0,25 ml) | | | | | X | | | | |
| Lecture après 36 h | | | | | ++ | | | | |
| Lecture après 96 h | | | | | + | | | | |
| Lecture après 1 semaine | | | | | + | | | | |

RÉSULTATS

Les résultats de lecture des réactions intra-dermiques sont collectés dans le même tableau. Ils peuvent se résumer en cinq points :

a) La réaction, chez le cobaye sensibilisé, à l'injection intra-dermique d'épreuve est intense, se traduisant par l'apparition d'une papule dont l'épaisseur croît progressivement de la 12^e à la 36^e heure et se maintient ensuite jusqu'à 96 heures. La nécrose apparaît, à la surface de la lésion, le troisième jour. La réaction est encore lisible (cobayes 2 et 4) après un mois.

b) Sur tous les sujets, l'injection intra-dermique, dans la peau du flanc, entraîne l'apparition dès l'heure qui suit d'une réaction érythémateuse. Chez les sujets non sensibilisés, cette réaction est, cependant, légère et fugace (elle disparaît en moins de 24 heures).

c) L'injection intra-péritonéale, d'une suspension de lymphocytes, préparée à partir des ganglions (poplité et précuraux) du cobaye sensibilisé n° 3, en solution saline équilibrée, au cobaye « neuf » entraîne l'apparition, chez ce dernier, d'une réaction d'hypersensibilité « transférée » analogue dans son intensité (et identique dans sa nature) à celle du cobaye sensibilisé.

d) Chez les sujets sensibilisés recevant, 4 semaines après l'injection sensibilisante (intra-dermique, plantaire), une injection intra-péritonéale d'antigène, la réaction d'épreuve par inoculation intra-dermique (peau du flanc) ne diffère pas, pendant les 48 premières heures, de la réaction des témoins. Par contre, la réaction érythémateuse, chez les cobayes n° 1, 2, 4, au lieu de régresser et de disparaître en 4 à 5 jours comme chez le n° 8, augmente jusqu'au 6^e jour (+++) et atteint chez l'un des trois sujets le stade nécrose (limitée d'ailleurs au point d'entrée de l'aiguille).

e) L'injection sensibilisante dans le coussinet plantaire provoque l'apparition d'une lésion importante, durable, dans laquelle le rôle de l'antigène de Freund paraît prépondérant. Pour le cobaye n° 5 (inoculé au jour « J » avec l'antigène de Freund seul) on observe une infiltration de cellules mononucléées de type lymphocytaire entourant un large foyer nécrotique dans le derme. Chez le cobaye n° 3 s'observent de plus des suffusions hémorragiques entourées de cellules de type lymphocytaire.

Chez le cobaye n° 1 sensibilisé par inoculation intra-plantaire, la lésion provoquée par l'injection d'épreuve (peau du flanc) se caractérise par de l'œdème, avec infiltration lymphocytaire entourant des suffusions hémorragiques et ulcération. La lésion du cobaye n° 8, non sensibilisé par inoculation plantaire, mais par injection intra-péritonéale des lymphocytes du cobaye sensibilisé (n° 3) est analogue, mais sans nécrose.

DISCUSSION

L'ensemble des réactions observées ici comporte un double aspect. L'un est celui des effets irritants propres à l'antigène utilisé : l'inoculation intra-dermique provoque dans tous les cas une légère inflammation (notée selon notre schéma 0+ ou +) ; celle-ci disparaît, chez les témoins en 1 à 2 jours ; aux doses employées (0,25 ml d'une suspension titrant, avant rupture par l'action des ultra-sons, entre 10^{10} et 10^{11} corps élémentaires/ml), cette action irritative n'atteint, chez aucun témoin, le stade nécrose. Le deuxième aspect semble bien être d'ordre immunitaire : l'intensité de la réaction d'hypersensibilité cutanée, chez les cobayes sensibilisés activement ou passivement, qui contraste avec la légèreté de la réaction d'inflammation simplement due à l'action locale de l'antigène, s'explique difficilement autrement. Or, au moment où s'observe cette réaction, le titre des anticorps circulants ne peut qu'être très bas : les sujets utilisés dans cet essai n'ont subi que tard (un mois environ après l'injection intra-plantaire) la prise de sang destinée à fournir le sérum de contrôle. A cette date, le cobaye n° 1, ayant subi une première injection intra-plantaire (antigène + Freund) et une deuxième injection intra-dermique (antigène seul) avait, en déviation du complément, un titre de 1/16 ; les cobayes n° 8 et 9 (une injection intra-dermique d'antigène seul) un titre de 1/2. Ces titres sont, même pour le n° 1, peu ou non significatifs. Le titre d'anticorps fixant le complément 8 jours après l'inoculation intra-plantaire devait donc être, au plus, faible : la réaction semble, en conséquence être de type cellulaire et non humoral. C'est, d'ailleurs, ce qu'indique le résultat obtenu chez le cobaye n° 8, dont la seule source de sensibilisation était la réception, dans le péritoine, des lymphocytes du cobaye n° 3, préparé 6 jours auparavant par inoculation de l'émulsion Antigène + Freund.

Les résultats de l'essai de désensibilisation sont équivoques.

Sans doute eussent-ils été plus nets avec une dose d'inoculum intra-péritonéale plus forte. Une plus forte réaction s'observe, cependant, à la 36^e heure, chez le sujet non désensibilisé (n° 2). Par contre, au cours de la semaine suivante, les différences s'effacent alors que les réactions s'accroissent, atteignant chez deux sujets (n° 1 et 2), le creusement d'un point nécrotique de 1 mm de diamètre au point d'entrée de l'aiguille. Tout se passe comme si la « désensibilisation », dans les conditions de cet essai, n'était que passagère, n'excédant pas 48 heures. Enfin, chez les sujets n° 1, 2, 4, ayant reçu une première injection d'antigène chlamydien mélangé à l'antigène de Freund dans le derme plantaire, non seulement la lésion primitive (épaississement (X 2) du derme de la patte, rougeur, chaleur) persiste plus de six semaines, mais cette réaction locale s'accroît à chaque nouvelle injection intra-dermique dans la peau du flanc. Dans l'ensemble, ces réactions rappellent plus celles de l'hypersensibilité retardée que celle de l'anaphylaxie locale.

En conclusion de cet essai, on peut dire que :

Chez le cobaye, la réaction locale à l'inoculation intra-dermique de l'antigène chlamydien inactivé apparaît, alors que les anticorps circulants (fixant le complément) ne sont décelables qu'à un titre insignifiant : précoce (dès le huitième jour suivant l'injection intra-dermique sensibilisante) ; diphasique (une deuxième phase, évoluant de 12 h à 1 semaine, immunitaire, faisant suite à une première phase, simplement irritative) ; assez intense compte tenu de la faible valeur pondérale de l'antigène utilisé (10 à 50 microgrammes, environ, par injection, selon nos calculs) ; de type cellulaire prépondérant : Les lésions d'infiltration à cellules mononucléées de type lymphocytaire, avec nécrose de surface, sont plus celles des réactions d'hypersensibilité retardée que celles d'une anaphylaxie locale. S'il en est ainsi, l'on peut penser que l'antigène chlamydien utilisé ici constitue un modèle utile d'étude expérimentale de la réaction immunitaire par médiation cellulaire. Dans une optique plus « vétérinaire », sans doute ce mode de réponse immunitaire, ici expérimentalement provoqué chez le cobaye, n'est-il pas sans rapport avec celui des animaux (brebis, chèvre...) chez lesquels les chlamydiales jouent un rôle pathogène important : par rapport à celle de la réponse humorale, la part de la réponse cellulaire et son incidence, en pathogénie, comme en immunologie est probablement d'importance.

RÉSUMÉ

L'inoculation intra-dermique au cobaye syngénique d'un antigène chlamydien purifié, inactivé, mélangé à l'antigène complet de Freund, détermine un état d'hypersensibilité que révèle une deuxième injection intra-dermique pratiquée au sixième jour : La réaction obtenue ne fait pas intervenir d'anticorps circulants. L'état de sensibilité qu'elle traduit est transféré au cobaye neuf par injection intra-péritonéale d'une suspension en solution saline équilibrée d'un broyat de ganglions prélevés sur cobaye sensibilisé. L'intensité des réactions obtenues montre l'importance de la réaction cellulaire dans la réponse immunitaire du cobaye à l'injection de cet antigène.
