

COMMUNICATIONS

Action de certains sérums hétérologues antithymus animaux sur les leucocytes de sujets normaux et leucémiques (*)

(Note préliminaire) (**)

par MM. Pierre GORET ***, Henri SALMON ****,
Bernard TOMA ***** et M^{lle} Colette HUGUET *****

A la faveur d'une expérimentation portant sur l'anémie infectieuse des Equidés, nous avons été amenés à préparer un sérum antilymphocytes de cheval que nous avons utilisé comme immunodépresseur, en vue de déclencher une « crise aiguë » chez des sujets chroniquement infectés (3). Un constat de demi-succès nous a incités à poursuivre cette recherche et à l'étendre à l'hypothétique activité dans ce domaine des anticorps antilymphocytes hétérologues.

* Travail subventionné, sous contrat de recherches, par les Laboratoires Albert ROLLAND.

** Nous tenons à exprimer nos remerciements aux Professeurs Jean BERNARD et JACQUILLAT (Hôpital St-Louis), LEVILLAIN et le Docteur LEFESVRE (Hôpital St-Michel), Daniel GERMAIN (Lyon), BOUSSER (Hôtel-Dieu) qui ont bien voulu nous procurer des sangs de malades.

Nous témoignons également notre gratitude au Professeur HALPERN et M^{lle} FREY (Hôpital BROUSSAIS), aux Docteurs TRIAU et FRESNEL, à M. PLAN et M^{me} LATOUR (Institut MERIEUX) au Docteur GOUERE et au Docteur-Vétérinaire BRIAT (Laboratoires Albert ROLLAND) pour l'aide technique et matérielle qu'ils nous ont accordée dans la réalisation de ces premiers essais.

*** Professeur, Ecole Vétérinaire, 94-Alfort.

**** Assistant (contrat de recherches), Ecole Vétérinaire, 94-Alfort.

***** Chef de travaux, Ecole Vétérinaire, 94-Alfort.

***** Technicienne Supérieure, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, détachée à l'Ecole d'Alfort.

Devant les difficultés de production des sérums antilymphocytes de plusieurs espèces, nous nous sommes résolus à la préparation de sérums antithymus animaux doués d'activité antilymphocytaire. Le titrage de ces sérums, le contrôle de leur spécificité vis-à-vis des lymphocytes animaux et humains et la recherche simultanée d'une très éventuelle activité des sérums de chevaux atteints d'anémie infectieuse sur les leucocytes d'homme affectés par divers types de leucémie, partant, la mise en œuvre de nombreuses réactions « témoins » ont abouti à des constatations dont il nous paraît intéressant de rendre compte dans cette note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des chevaux et des moutons sont hyperimmunisés par des injections répétées de suspensions de cellules thymiques — associées ou non à des adjuvants — de diverses espèces selon un protocole dont nous exposerons les détails dans un mémoire ultérieur. Nous avons jusqu'ici préparé et utilisé : deux sérums de chevaux antithymus de veau (S. C. A. V.), deux sérums de chevaux antithymus de porc (S. C. A. P.), un sérum et des gammaglobulines de mouton antithymus de porc (S. M. A. P.), un sérum et des gammaglobulines de mouton antithymus de cheval (S. M. A. C.). D'autres préparations dont nous disposons n'ont pas encore été éprouvées (mouton anti-veau ; lapin anti-poule ; mouton anti-bourse de Fabricius...).

Le choix des espèces donneuses d'antigènes et productrices d'anticorps permet d'éliminer, dans l'interprétation de nos essais, l'intervention des anticorps FORSSMAN. Le sérum obtenu des animaux hyperimmunisés — absorbé sur globules rouges de l'espèce donneuse des antigènes thymiques — est titré sur lymphocytes homologues par évaluation de la lymphocytotoxicité selon la technique d'ENGELFRIET (2), en utilisant un « pool » de compléments de lapins. Les titres obtenus sont variables et fonction réciproque des espèces productrices d'anticorps et de l'origine des thymus (activité aux dilutions variant de 1/800 à 1/4.000) ainsi que nous l'exposerons dans une autre publication. La recherche de la cytotoxicité est effectuée sur leucocytes séparés, classiquement sur fibre de nylon, d'un prélèvement de sang hépariné, pratiqué 1 à 2 h auparavant.

RÉSULTATS

Les résultats concernant l'activité de ces sérums sur les cellules blanches humaines provenant de sujets sains ou leucémiques sont consignés dans les tableaux I et II. De l'examen de ces données encore fragmentaires, on peut néanmoins retirer :

1) Que les sérums de chevaux antithymus de veau et de porc ont une action cytotoxique décelable mais variable sur les lymphocytes

TABLEAU I

*Lymphocytotoxicité des sérums antithymus (S. A. T.) animaux pour les lymphocytes normaux.
Le sérum de mouton antithymus de veau (S. M. A. V.) a été utilisé ici*

Nature du S. A. T. / Groupes sanguins	A		O		B		AB	
	Titre moyen de lymphocyto- toxicité	Nbre de sangs	Titre moyen de lymphocyto- toxicité	Nbre de sangs	Titre moyen de lymphocyto- toxicité	Nbre de sangs	Titre moyen de lymphocyto- toxicité	Nbre de sangs
S. C. A. V. 1	32 (10-70)	5	30 (0-100)	4	15 (0-30)	2	30	1
S. C. A. V. 2	80 (40-120)	2	40	2	40 (30-50)	2		
S. C. A. V. 2, α *	25 (20-30)	2	30	1	10	1		
S. C. A. P. 1 . . .	40 (10-60)	4	20 (0-70)	4	0	2	15 (0-30)	2
S. C. A. P. 2 . . .	100	1	25 (25-30)	2	10 (0-20)	2		
S. C. A. P. 2, α *	10	1	10	1	0	1		
S. M. A. P. ** . .	0	5	0	5	0	3	0	1
S. M. A. V. ** . . .	0	1	0	1	0	2		
S. M. A. C. ** . .			0	2	0	2	0	1

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux taux extrêmes de dilution actifs.

* Absorbé sur G. R. humains de groupes correspondants.

** Gammaglobulines.

TABLEAU II. — *Cytotoxicité des sérums antithymus (S. A. T.) animaux pour les leucocytes de leucémiques*

Nature du S. A. T.	L. A. L.			L. A. M.			L. M. C.		
	Titre moyen de leucocyto- toxicité	Nbre de sangs	Groupe san- guin	Titre moyen de leucocyto- toxicité	Nbre de sangs	Groupe san- guin	Titre moyen de leucocyto- toxicité	Nbre de sangs	Groupe san- guin
S. C. A. V. 1	275 (150-400)	2	? ?	70 (40-100)	2	A+	20 (0-40)	2	A+ O+
S. C. A. V. 1, a* . . .				40	1	A+	0	1	A+
S. C. A. V. 2	400 (320-480)	3	B+ O+ O+	60 (40-80)	2	A+ O+	65 (10-120)	2	A- ?
S. C. A. V. 2, a* . . .	160	1	O+	0	1	A+	20	1	A-
S. C. A. P. 1	100 (0-200)	2	? ?	40	1	A+	0	2	O+ A+
S. C. A. P. 2	70 (40-100)	2	O+ B+	10	2	A+	15 (0-30)	2	A- ?
S. C. A. P. 2, a* . . .	40	1	O+	0	2	A+			
S. M. A. P. 1 **	400 (160-640)	2	O+ B+	10	1	O+			
S. M. A. P. 2 **	70 (50-80)	3	? ? ?	40 (10-70)	2	A+	0 (0-10)	3	O+ A+ A-
S. M. A. C. **	30 (10-50)	4	??? B+	0	1	O+	0	1	O+

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux taux extrêmes de dilution actifs.

* Absorbé sur G. R. humains de groupes correspondants.

** Gammaglobulines.

normaux des sujets appartenant aux groupes sanguins — reflétés par les leucocytes — A et O, plus faible ou nulle sur ceux des groupes B et AB, alors que les sérums de moutons antithymus de porc, de veau et de cheval sont sans action.

2) Que les mêmes sérums de chevaux antithymus exercent un effet cytotoxique régulier sur les leucocytes de malades atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (L. A. L.) à des taux très supérieurs à ceux enregistrés pour les cellules saines. L'absorption sur globules rouges (G. R.) humains du groupe correspondant diminue l'activité sans la supprimer. En revanche, ces sérums sont sans action significative — par rapport à celle exercée sur les lymphocytes normaux témoins — dans les cas de leucémie aiguë myéloblastique (L. A. M.) ou de leucémie myéloïde chronique (L. M. C.) en rémission ou acutisation.

3) Que les sérums de moutons antithymus de porc et de cheval, inactifs sur les cellules saines exercent un effet cytotoxique certain sur les globules blancs provenant de cas de leucémie aiguë lymphoblastique. En outre, le sérum de mouton antithymus de porc s'est révélé actif sur les leucocytes de malades atteints de leucémie myéloblastique aiguë (2 cas).

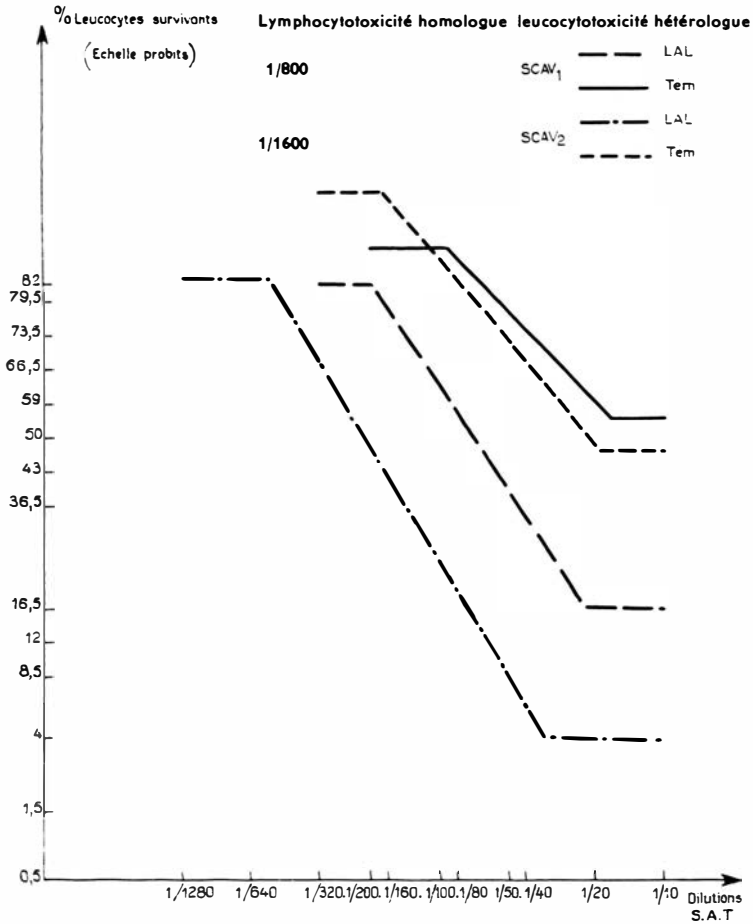
Représentation graphique et commentaires.

Une représentation graphique de l'activité comparée des divers sérums étudiés sur les lymphocytes normaux « témoins » et sur les cellules blanches de deux types de leucémies permet une meilleure interprétation des résultats figurés sur les tableaux. Le test de cytotoxicité repose sur le principe que, pour chaque cellule, existe une *dose-seuil* d'anticorps actif en dessous de laquelle la cellule survit. Cette dose-seuil n'est pas nécessairement la même pour chaque cellule.

Il apparaît logique, pour normaliser les distributions des doses-seuils, de les traduire par des points exprimant la valeur du logarithme des dilutions moyennes des différents sérums antithymus éprouvés. Par transformation en probits on peut, dès lors, ajuster une droite à partir des différents points inscrits sur des graphiques dont l'examen entraîne les constatations suivantes :

1) *Activité respective des S. C. A. V. sur les cellules de L. A. L. et sur les lymphocytes normaux témoins* (Graphique I).

Les droites apparaissant parallèles et considérant la dilution des sérums active sur 50 p. 100 des cellules, celle-ci est de 1/20 pour les



Graphique I. — Activité respective des sérums de chevaux anti-thymus de veau sur les cellules de leucémie aiguë lymphoïde et sur les lymphocytes normaux témoins.

éléments témoins et 1/200 (soit 10 fois supérieure) pour les cellules leucémiques avec S. C. A. V.₂ et de 0 et 1/70 avec S. C. A. V.₁.

Comparativement, le fait que le S. C. A. V.₁ révèle un taux de lymphocytotoxicité homologue (lymphocytes de veau) inférieur (1/800) à celui du S. C. A. V.₂ (1/1600), constitue, conséquemment, un argument en faveur de l'existence de sites antigéniques — communs aux

thymocytes de veau et aux lymphocytes humains normaux — supplémentaires sur les cellules blanches humaines leucémiques.

On constate aussi l'existence d'une zone de saturation des anticorps aux faibles dilutions (jusqu'au 1/20) dans laquelle on compte 16,5 p. 100 de survie des lymphocytes leucémiques avec le S. C. A. V.₁ contre 4 p. 100 avec le S. C. A. V.₂. Il n'est pas interdit d'espérer obtenir une destruction complète des cellules en cause au fur et à mesure de l'hyperimmunisation des animaux producteurs de sérums.

Quant au niveau du plateau supérieur — fortes dilutions — il est fonction de la toxicité propre soit du S. C. A. V., soit du sérum de lapin (utilisé comme complément) soit des deux.

On sait que le sérum de lapin renferme des hétéro-anticorps actifs sur les cellules blanches de la lignée lymphoïde. Cette activité cytotoxique, d'ailleurs plus accusée vis-à-vis des lymphocytes leucémiques, peut être abolie soit par dilution à 1/2 du sérum de lapin, soit par absorption sur un pool de lymphocytes humains normaux. Elle est, en revanche, accrue si on utilise un sérum de lapin titrant 1 U. H. 100 (unité hémolytique 100 p. 100) à la dilution de 1/32, l'emploi de sérums titrant 1 U. H. 100 à la dilution de 1/20 étant couramment admis.

2) *Activité des S. M. A. P. sur les cellules de L. A. L.* (Graphique II).

On voit que — compte tenu de l'addition des actions cytotoxiques des sérums témoins — le S. M. A. P.₁ exerce une action manifeste alors que celle de S. M. A. P.₂ (de titre lymphocytotoxique homologue très inférieur) n'est peut-être pas significative malgré l'absence de toxicité pour les lymphocytes témoins (Tableau I).

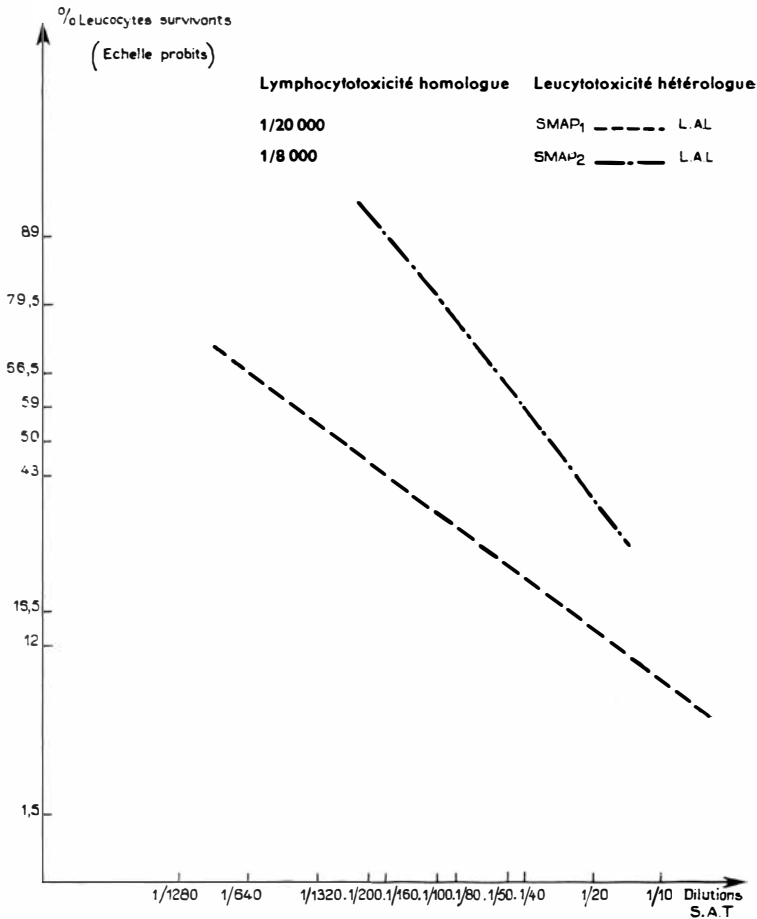
3) *Activité des S. C. A. P. sur les cellules de L. A. L. et de L. A. M.* (Graphique IV).

Si cette activité apparaît assez significative surtout pour le S. C. A. P.₂ elle est cependant inférieure à celle des S. C. A. V., la dilution encore active sur 50 p. 100 des lymphoblastes n'étant que de 1/40.

En fait, la cytotoxicité propre habituelle de ces sérums ne permet pas de conclusion formelle.

4) *Activité des S. C. A. V., S. M. A. P.* (Graphique III) *et S. C. A. P.* (Graphique IV) *sur les cellules de L. A. M.*

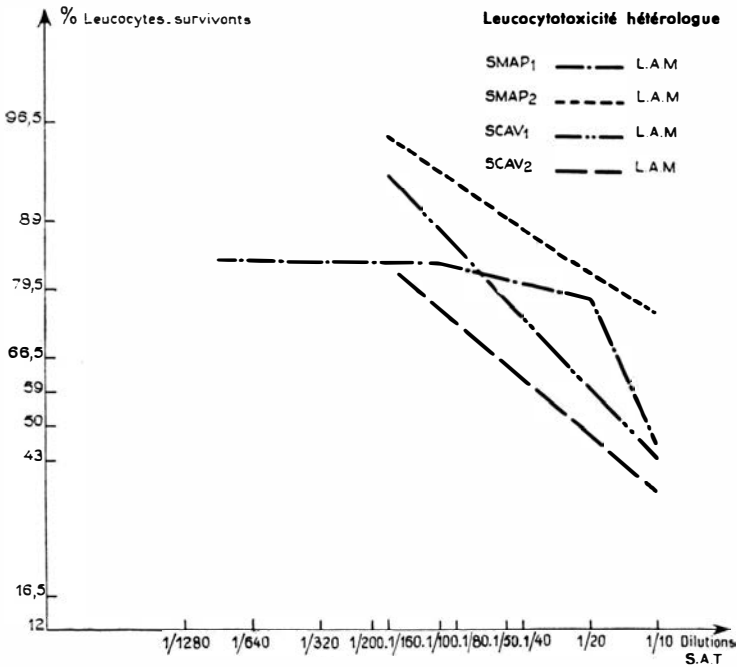
Les courbes sont presque superposables à celles traduisant l'activité sur les cellules « témoins ».



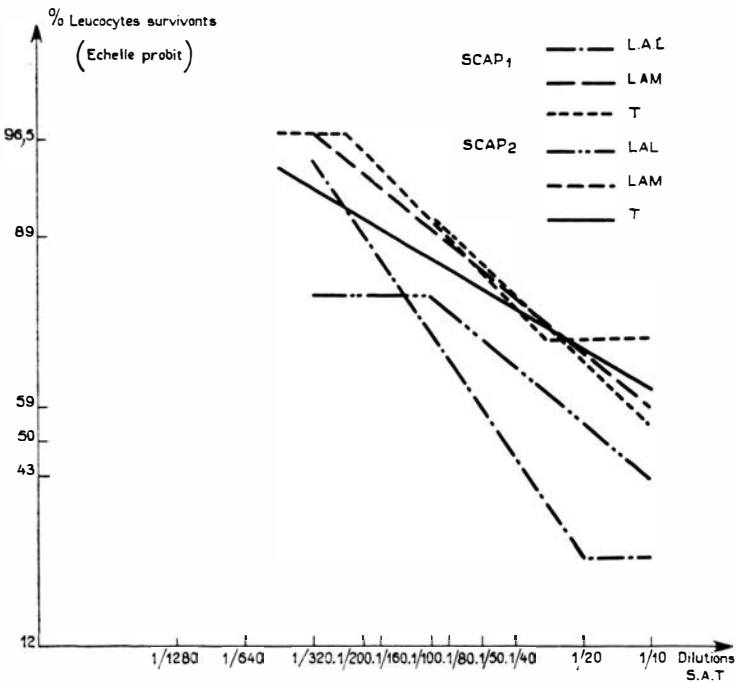
Graphique II. — Activité des sérums de moutons antithymus de porc sur les cellules de leucémie aiguë lymphoïde.

On est frappé de la grande homogénéité de l'action des S. C. A. V. et S. C. A. P. comparée à celle des S. M. A. P. Pour ces derniers l'action cytotoxique n'est pas absolument convaincante si l'on considère la cytotoxicité du sérum de lapin pour les myélocytes neutrophiles (SCHREK (9 bis)).

L'hétérogénéité constatée pour S. M. A. P. peut s'expliquer par l'existence d'un plateau au milieu de la courbe (d'allure sigmoïde si l'on porte en ordonnée les taux en p. 100 au lieu des probits).



Graphique III. — Activité des sérums de moutons antithymus de porc et des sérums de chevaux antithymus de veau sur les cellules de leucémie aiguë myéloïde.



Graphique IV. — Activité des sérums de chevaux antithymus de porc sur les cellules de leucémie aiguë lymphoïde et de leucémie aiguë myéloïde.

Il est admissible comme semblent déjà le démontrer quelques essais que le S. M. A. P. exerce une action anticytotoxique sur le sérum, de lapin aux faibles dilutions.

DISCUSSION

La cytotoxicité des sérums hétérologues *antithymus* animaux, vis-à-vis des leucocytes humains normaux ou leucémiques, n'a pas fait jusqu'ici, à notre connaissance, l'objet d'investigations. En revanche, l'action des sérums *antilymphocytes de chien* sur ces cellules et la plus grande activité de ces sérums sur les éléments leucémiques, ont été mises en évidence par R. SCHREK (8) (9) dans les leucémies lymphoïdes chroniques (selon une technique différente de recherche de la lymphocytotoxicité (5)) et confirmée par J. DUCOS et coll. (1) dans les leucémies aiguës lymphoblastiques.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour fournir une explication à ce phénomène : ou les cellules blanches leucémiques présentent une plus grande fragilité que les leucocytes normaux, ou elles supportent des antigènes communs aux cellules thymiques animales.

1) La plus grande sensibilité des cellules leucémiques à l'action cytotoxique des sérums normaux de lapin et de cobaye a été soulignée par SCHREK (5) tandis que plusieurs auteurs (1) ont observé l'activité, sur ces cellules, de divers sérums doués d'activité anti-leucocytes humains. DUCOS et coll. (1) écrivent que « leurs résultats mettent en lumière la plus grande fragilité des cellules de la lignée lymphocytaire chez les sujets atteints de leucémie aiguë lymphoblastique ». Or, nos résultats indiquent : d'une part, l'absence d'activité, sur les cellules normales, des sérums ou gammaglobulines de moutons *antithymus* de porc et de cheval, et leur cytotoxicité pour certaines cellules leucémiques ; d'autre part, les taux élevés de cytotoxicité des sérums de chevaux *antithymus* de veau et de porc pour les lymphocytes de leucémie aiguë lymphoblastique par rapport aux taux de cytotoxicité pour les cellules normales « témoins » (SCHREK (9) par sa méthode, n'observe pas de différence d'activité des sérums de chevaux *antilymphocytes* de chien pour les cellules normales et pour celles de malades atteints de leucémie lymphoïde chronique).

Au surplus, il apparaît que les lymphocytes leucémiques ne sont pas tous également sensibles aux mêmes anticorps.

2) La présence de différents antigènes dans les tissus leucémiques

a été soulignée par plusieurs auteurs (8) (10). SCHREK et BATRA (7) ont insisté sur le fait que les lymphocytes leucémiques sont du type T. (rat) et que les réactions *in vitro* les révèlent semblables aux thymocytes. GRABAR (4) a souligné le fait que les thymocytes possèdent des antigènes spécifiques. J. YATA et coll. (11) décèlent un antigène particulier présent à la fois dans les extraits de tissus leucémiques et les thymocytes normaux.

Nos quelques essais, bien qu'en nombre insuffisant, et compte tenu de la toxicité propre des sérums animaux sur les leucocytes normaux, nous incitent à envisager la présence éventuelle dans les cellules thymiques animales d'antigènes communs, avec au moins certaines cellules blanches leucémiques, ou la plus grande richesse de ces cellules leucémiques en antigènes communs déjà présents dans les leucocytes humains normaux.

Nous tentons de poursuivre et compléter nos recherches dans cette voie, en nous attachant également à préciser l'importance et la signification de la présence dans les sérums étudiés d'anticorps anti-homme ou en rapport avec les antigènes spécifiques des groupes sanguins humains.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les sérums antithymus de veau et de porc préparés sur le cheval exercent sur les leucocytes de sujets atteints de leucémie aiguë lymphoblastique, une activité cytotoxique nettement supérieure à celle constatée sur les lymphocytes normaux de donneurs appartenant aux groupes sanguins A et O. Les sérums antithymus de porc et de cheval préparés sur le mouton sont sans effet sur les lymphocytes de sujets sains mais ont une action sur les leucocytes de malades atteints de leucémie aiguë lymphoblastique. Le sérum de mouton antithymus de porc se montre également actif sur les leucocytes de malades atteints de leucémie aiguë myéloblastique. S'ajoutant à la fragilité accrue des cellules malades, la présence ou la plus grande abondance d'antigènes communs aux cellules thymiques animales et à certains leucocytes « leucémiques », dans l'interprétation du phénomène, est discutée.

(Laboratoire de la Chaire de Maladies
Contagieuses, Législation Sanitaire.
Zoonoses, Ecole Vétérinaire,
94-Alfort.)

BIBLIOGRAPHIE

1. DUCOS (J.), OHAYON (E.) et COLOMBIES (P.). — *C. R. soc. Biol.*, 1970, **164**, 667.
 2. ENGELFRIET. — Cytotoxic Antibodies Against Leucocytes in Histocompatibility Testing, 1965, p. 245, 250 Munksgaard, Copenhagen.
 3. GORET (P.), TOMA (B.), LUKA ISKANDER (G. E.) et BIND (J. L.). — *Rec. Med. Vet.*, 1969, **145**, 1213.
 4. GRABAR (P.). — *Bull. Ac. Med.*, 1969, **153**, 166.
 5. SCHREK (R.). — *Nature*, 1968, **182**, 724.
 6. SCHREK (R.). — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1966, **37**, 649.
 7. SCHREK (R.) et BATRA (K. V.). — *Lancet*, 1966, ii, 444.
 8. SCHREK (R.) et PRESTON (F. W.). — *Lancet*, 1967, ii, 1366.
 9. SCHREK (R.), PRESTON (F. W.) et DIETZ (A. A.). — *Blood*, 1969, **33**, 555.
 - 9a. SCHREK (R.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, **120**, 789.
 10. VIZA (D.) DAVIES (D. A. L.), TODD (R.), ORA BERNARD DEGANI, BERNARD (Cl.) et HARRIS (R.). — *Presse Med.*, 1970, **78**, 2259.
 11. YATA (J.), KLEIN (G.), KOBAYASHI (N.), FURUKAWA (T.) et YANAGISAWA (M.). — *Clin. Exp. Immunol.*, 1970, **7**, 781.
-