

L'ETUDE DE L'ACTION DES IMMUNODEPRESSEURS PAR LE TEST DE LA MIGRATION LEUCOCYTAIRE

A. Massoud*., F. Ala* F. Davatchi

I- INTRODUCTION

Dans ce cadre experimental, nous nous sommes attaché à vérifier l'influence et l'action globale sur le test de migration leucocytaire de divers immunodepresseurs et anti-inflammatoires sans étudier l'action spécifique de ces médicaments sur les cellules elles-mêmes. Notre choix s'est porté sur des médicaments dont l'usage est de plus en plus courant, avec la pensée d'étudier leur rôle possible dans le phénomène d'inhibition de migration des leucocytes.

Dans ce Travail, il nous a paru essentiel de n'utiliser que les leucocytes de séries de mêmes sujets pour l'ensemble des médicaments étudiés, ceci dans le but de disposer de lots biologiques homogènes et comparables.

II- MATERIELS ET METHODE

II-1- Matériel Leucocytaire Utilisé

Le test de migration des leucocytes a été réalisé chez 30 sujets

* Department de la Microbiologie Et Immunologie, Faculte de la Medecine
Universite de Tehran, Centre Transfusion Sanguine de Tehran

dont les caractéristiques sont les suivantes:

Sujets Temoins:

Ce groupe comprend 10 donneurs de sang du Centre de Transfusion Sanguine de Hotel Dieu de Lyon soumis à des contrôles cliniques et biologiques réguliers. Il s'agit de 7 femmes et 5 hommes dont l'âge moyen est de 46 ans (âges extrêmes de 28 à 59 ans).

Sujets malades:

20 malades atteints de Polyarthrite Rhumatoïde qui viennent de l'Hopitald, Edward Herriot de Lyon ont été examinés, 9 hommes et 11 femmes dont 15 d'entre eux ont une sérologie rhumatoïde positive (Waalser Rose et Latex) et 5 autres une sérologie négative.

11-2- Technique utilisée

La Technique utilisée à déjà été décrite (3,4) et dérive de celle de SOBORG et BENGIXEN (6), 20 ml de sang veineux sont prélevés stérilement sur Heparine pure (2000U) sans phénol ou sur Heparinate de calcium, et mis à sédimenter à 37° pendant une heure environ.

Le surnageant est aspiré jusqu'à la limite supérieure des hématies, centrifugé à 200g pendant 10 minutes dans des tubes en plastique de 10 ml.

On rejette le surnageant, on lave le culot cellulaire avec du liquide de Hanks, on centrifuge à la même vitesse pendant 10 minutes et on répète le lavage trois fois.

Le culot est repris par du milieu TC 199 additionné de 10% de sérum de poulain. La suspension est ajustée de manière à obtenir un minimum de 10^7 leucocytes par ml.

Par aspiration capillaire, cette suspension homogénéisée est introduite dans des tubes à microhématocrite jusqu'aux deux tiers du tube. On scelle l'extrémité la plus éloignée des cellules. Ces tubes sont alors centrifugés à 200g, pendant 10 minutes et sectionnés à l'interface cellules surnageant. Les portions de tubes contenant les cellules sont placées et fixées dans des chambres de migration (boîtes de Petri Plastiques stériles 35mm de diamètre) dans lesquelles on introduit imme-

diatement 1 ml. de milieu TC 199 additionné de 10% de serum de pou-
lain contenant ou non le médicament à étudier. Les chambres de
migration sont fermées puis placées dans une étuve de 37°C en
saturation d'humidité pendant 24 heures.

On effectue la lecture en projetant les surfaces de migration à
l'aide d'un agrandisseur et en mesurant par décalque sur film triacetate
et pesée de ces surfaces (précisions au 0,1mg).

Pour chacun des tests, on réalise 4 migrations en absence de médi-
cament et 4 en présence de chacune des doses du médicament. On
calcule la surface de migration moyenne pour chaque série.

L'index de migration est égal au rapport:

Surface de migration en présence d'un médicament = Index de Migration:
Surface de migration en absence d'un médicament.

On réalise une interprétation statistique des surfaces de migration.
Pour chaque série, on établit l'index de migration au dessous duquel
existe une différence statistique significative ($P < 0,01$) entre les surfaces
de migration obtenues en présence de médicament et celles obtenues en
absence de médicament.

III/ ETUDE DE L'ACTION DES IMMUNODEPRESSEURS.

III-1 Action des serums antilymphocytes. (SAL)

3- Nature des serums antilymphocytes utilisés.

Les serums antilymphocytes utilisés ont été préparés sur cheval
à partir de lymphocytes humains, et purifiés par précipitation alcoolique
à froid (Serum antilymphocyte du canal thoracique et Thymocyte) et
par précipitation au Sulfate d'ammonium (Serum antilymphocyte
amygdale, rate et sang) (Institut Pasteur de Lyon Pr. CARRAZ).

Methodes de dilution

Une étude antérieure portant sur l'activité invitro du serum anti-
lymphocyte sur les leucocytes de sujets normaux met en évidence
l'intérêt que présente l'étude de dilution très poussées de serum
antilymphocyte. Nous avons donc choisi d'utiliser dans ce travail les
dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} pour les serums de

**Tableau 1 - RESULTATS ET ECARTS TYPE DE L'INDEX DE
MIGRATION DE LEUCOCYTES DE SUJETS NORMAUX
(Moyenne de 10 sujets) EN PRESENCE DE DIVERS
SERUMS ANTILYMPHOCYTES.**

	SAL-T Thymus	SAL-A Amygdoles	SAL-CT1 Thoracique	SAL-CT2 Thoracique	SAL-CT3 Thoracique	SAL-S Sang	SAL-R Rate	SAL-CT4 Tharacique
des SAL Dilutions	Index de migration Moyen							
10^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	
10^{-2}	0,37 + 0,16	0,26 + 0,05	0,20 + 0,05	0,29 + 0,05	0,41 + 0,06	0,19 + 0,04	0,15 + 0,02	5×10^{-2} - 0,54 ⁻⁷ + 0,08
10^{-3}	0,87 + 0,09	0,63 + 0,16	0,51 + 0,08	0,80 + 0,06	0,80 + 0,03	0,66 + 0,09	0,54 + 0,07	
10^{-4}	0,99 + 0,10	0,86 + 0,08	1,31 + 0,14	1,16 + 0,14	1,28 + 0,10	0,83 + 0,06	0,80 + 0,06	
10^{-5}	1,11 + 0,16	0,95 + 0,07	1,36 + 0,12	1,14 + 0,13	1,42 + 0,18	0,91 + 0,05	0,92 + 0,06	
10^{-6}	1,35 + 0,20	1,09 + 0,12	1,40 + 0,18	1,36 + 0,13	1,53 + 0,26	1,02 + 0,06	1,12 + 0,13	
10^{-7}	1,49 + 0,22	1,38 + 0,23	1,39 + 0,13	1,43 + 0,14	1,36 + 0,20	1,34 + 0,12	1,41 + 0,06	1,31 + 0,29

Tableau 2

	SAL 5×10^{-2}	SAL 10^{-7}
Sujets normaux	0,54	1,31
Mayenne de 10 sujets	$\pm 0,08$	$\pm 0,29$
Sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde	0,25	0,64
	$\pm 0,05$	\pm

canal thoracique (CT1, CT2, CT3), Thymus, Amygdale et sang, dans l'étude portant sur les leucocytes des sujets normaux.

D'autre part, les dilutions 5×10^{-2} et 10^{-7} , pour le serum de canal thoracique (CT4) dans l'étude comparative des leucocytes des sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide et des sujets normaux ces deux doses s'étant révélées respectivement inhibitrice et stimulatrice chez les sujets normaux. Les dilutions des différents SAL ont été réalisées dans du milieu TC 199.

III-1 Resultats

a) *Resultats obtenus avec les leucocytes de sujets normaux.*

Les SAL de différents dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} , donnent des effets dont les résultats sont très intéressants sur des leucocytes de sujets normaux, leurs actions sont soit inhibitrice (dilution 10^{-2} , 10^{-3}) soit stimulante (10^{-7}) de la migration. Les résultats figurent dans le tableau 1.

b) *Resultats obtenus avec des leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide.*

Nous avons étudié comme exemple le serum antilymphocyte CT4 (canal thoracique) aux dilutions 5×10^{-2} et 10^{-7} . Ces dilutions donnent des effets dont les résultats sont hautement significatifs sur des leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide. Leur action est inhibitrice aussi bien avec le dilution de 5×10^{-2} qu'avec le dilution 1×10^{-7} . Les résultats figurent dans le tableau 2. (P 0'001)

III/2 *Action des Immuno depresseurs chimiques*

III/2-1- *Nature des Immuno depresseurs chimiques*

Nous avons utilisé le produit pure d'Azathioprine (AZ) (Lot 4-047-73 Wellcome), cyclophosphamide (cy) (Lab. Lucien) chlorambucil

(CH) (Lab. Techni-pharma) aspirine injectable (AS) et l'hemo succinate de sodium de methyl Prednisolone (MP) (Lab. Upjohn).

Une solution mere pour chacun de ces Immunodepresseurs est effectué en milieu TC 199 additionné de 10% serum de poulain. La

solution-mère est diluée dans la même milieu de manière à obtenir les concentrations respectives de 0,5 ug et 10 ug per!ml pour l'azathioprine, 100 ug et 1000 ug/ml pour l'aspirine et 40 ug/ml et 400 ug de l'hémocuccinate de sodium de Methyl-prednisolone dans la chambre de migration. Ces deux doses représentent des doses approchées de celles que l'on peut observer chez l'homme au cours de traitement.

III/2-3- Resultats

Les résultats obtenus avec les leucocytes de sujets normaux et ceux atteints de Polyarthrite Rhumatoïde figurent dans le tableau (3).

Tableau 3 TABLEAU RECAPITULATIF DES IMMUNODEPRESSEURS CHIMIQUES ET DU SERUMOSNTILYMPHOCYTE CT4 CHEZ LES SUJETS NOMOUX ET LES SUJETS ATTEINTS DE POLYARTHRIRES RHUMATOIDES.

Sujets	AZ/ml		CY/ml		CH/ml		MP/ml		AS/ml		S.A.L./ml	
	0,5 ug	10 ug	100	1000	0,5	10	40	400	250	10000	10 ⁻⁷	5x10 ⁻²
Nor- moux	0,87 ±0,07	0,70 ±0,04	0,85 ±0,05	0,78 ±0,05	0,89 ±0,05	0,80 ±0,04	0,87 ±0,05	0,83 ±0,02	0,90 ±0,08	0,48 ±0,05	1,31 ±0,29	0,54 ±0,08
Polyarthrite Rhumatoïde	0,86 ± 0,12	0,60 ±0,09	0,95 ± 0,11	0,80 ±0,12	0,93 ± 0,18	0,60 ±0,08	0,95 ±0,12	0,60 ±0,12	0,79 ± 0,20	0,36 ±0,08	0,64 ±0,07	0,25 ± 0,05

V/ DISCUSSION

Suivant la définition que nous avons donnée de l'Index de migration, nous pouvons constater que l'Index de migration est égal à «1» lorsque le médicament introduit dans le système n'a pas d'effet.

C'est sur cette base que nous avons analysé les résultats de l'action des médicaments sur l'index de migration sans antigène.

Action des serums antilymphocytes sur l'index de migration

En analysant les résultats moyens de 10 sujets normaux, (Tableau 1), nous constatons une perturbation variable de l'index de migration en présence de différentes dilutions des divers serums antilymphocytes.

Cette perturbation va dans le sens:

- d'une action inhibitrice de la migration, hautement significative jusqu'à la dilution 10^{-3} ($P = 0,01$), des divers serums antilymphocytes, quelle que soit leur provenance. Ces activités inhibitrices des SAL ont été exprimées sur un graphe (Fig. 1)

C'est à partir de la dilution 10^{-4} , que l'on observe une dissociation dans l'action stimulante. Les serums Canal Thoracique, Thymus; Amygdales et Rate; se sont montrés plus stimulants que le serum antilymphocyte du sang.

Il ne semble pas qu'il y ait de relation entre l'activité inhibitrice ou stimulante des serums antilymphocytes et leur activité lymphocytoxytante, l'activité d'inhibition de rosettes, et l'activité de prolongation de greffe de peau chez le singe Rhesus.

On pourrait penser que l'action stimulante de la migration due aux serums antilymphocytes soit liée à un certain chimiotactisme des polynucléaires vis-à-vis des protéines cheval de ces serums. Il n'en est rien, car en présence de serum de cheval normal aux mêmes dilutions, l'index de migration est voisin de «1» tant chez des sujets normaux que chez des sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde. (Tableaux 5 et 6).

En analysant comparativement les résultats obtenus par l'action du serum antilymphocyte du Canal Thoracique (CT4) sur l'index de

Tableau no 4 - CARACTERISTIQUES DES SERUNG ANTILYMPHOCYTES UTILISES.

Abreviations	Origine des lymphocytes	µng Protéines /ml IgG 95%	Titre Lymphocyt- otoxicité	Titre Inhibition Rosette	Prolong. Grefe Peou Singe
CT1	Canal thoracique	72	1/4096	1/16000	+
CT2	Canal, thorocique	52	1/2048	1/8000	+
CT3	Canal thorocique	78	1/2048	1/8000	+
CT4	Canal thorocique	51	1/4096	1/16000	+
T	Thymus	61	1/4096	1/8000	+
A	Amygdales	70	1/512	1/2000	+
R	Rate	50	1/1024	1/4000	non fait
S	SAng	59	1/2048	1.8000	non fait

Tableau 5 - INDEX DE MIGRATION DES SUJETS NORMAUX EN
PRESENCE DE SERUM DE CHEVAL NORMAL.

Noms	ABD ...	TAC ...	MAJ ...	LAF ...	BER ...	Moyenne Ecart Type
Dilutions						
10^{-2}	0,99	0,89	0,98	0,93	1,01	0,96 ± 0,04
10^{-3}	0,93	0,99	0,93	0,84	0,90	0,91 ± 0,05
10^{-4}	0,95	0,93	0,96	0,94	0,89	0,93 ± 0,2
10^{-5}	0,99	0,89	1,02	0,93	0,99	0,96 ± 0,05
10^{-6}	0,87	0,99	1,03	1,05	1,01	0,99 ± 0,07
10^{-7}	0,89	1,02	1,01	1,02	1,05	0,99 ± 0,06

**Tableau 6 - INDEX DE MIGRATION DES SUJETS ATTEINTS DE
POLYARTHRITE RHUMATOIDE EN PRESENCE DE
SERUM DE CHEVAL NORMAL.**

Noms	HAL ...	BAN ...	SER ...	MIK ...	MON ...	Moyenne Ecart Type
Dilutions						
10^{-2}	0,99	0,87	0,96	0,95	0,99	0,95 ± 0,04
10^{-3}	1,03	0,94	0,93	0,93	1,06	0,97 ± 0,06
10^{-4}	1,02	0,96	0,93	0,90	0,85	0,93 ± 0,06
10^{-5}	1,01	1,03	0,99	0,96	0,87	0,97 ± 0,06
10^{-6}	0,90	0,99	1,02	1,03	0,96	0,99 ± 0,03
10^{-7}	0,89	0,96	1,01	1,02	0,97	0,97 ± 0,05

migration de leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde (moyenne de 10 sujets), nous constatons un fait important (Tableau 2): le serum antilymphocyte exerce une action inhibitrice sur les leucocytes des sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde, index de migration inférieur à «1» quelle que soit la dose (5×10^{-2} et 10^{-7}); par contre, il exerce une action accélératrice de la migration à partir de 10^{-4} et hautement significative à 10^{-7} sur les leucocytes normaux. (Tableau 1).

Ce fait nous semble donc particulièrement important, si l'on considère le comportement différent des leucocytes de sujets normaux ou de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde.

Comment pouvons-nous expliquer ces inhibitions ou ces stimulations de la migration des leucocytes de sujets normaux sous l'influence des serums antilymphocytes?

On peut penser qu'en ce qui concerne l'inhibition, elle est liée à l'activité antileucocytaire (anti-polynucléaires ou anti-macrophage) des serums antilymphocytes. En effet, tous les serums antilymphocytes présentent de telles activités car il est pratiquement impossible de préparer des serums à partir de lymphocytes qui ne soient pas associés à des polynucléaires ou des macrophages. On peut penser également que le serum antilymphocyte joue le rôle d'antigène stimulant des lymphocytes présents qui vont inhiber la migration par la sécrétion de facteurs inhibant la migration de macrophage ou de leucocyte (MIF ou LIF).

Certains auteurs ont déjà signalé que le serum anti-lymphocyte, en agissant sur les lymphocytes, produisait du facteur d'inhibition de la migration des macrophages ou MIF (2 et 9).

PEKAREK confirme le travail de SVEJCAR (7). Il pense que le serum antilymphocyte, sans doute par une action opsonisante sur les petits lymphocytes circulants du sang, peut inhiber la migration des leucocytes à faible dilution de serum antilymphocyte (5).

En ce qui concerne l'action anti-macrophage SVEJCAR a démontré que cette action était spécifique d'espèce (9, 10). Il relie l'action anti-macrophage à la présence d'anticorps «cytophiliques» sur la surface des macrophages, présomption vérifiée par des études

d'absorption d'anticorps (1) et d'autre part, par le traitement du macrophage avec la Trypsime qui diminue l'effet du serum antilymphocyte sur les macrophages (8).

III/2- Action des Immunodepresseurs chimiques:

Si nous comparons les resultats de divers immunodepresseurs chimiques dans leur action dans le test de migration des leucocytes pratiqué avec des leucocytes de sujets normaux (moyenne sur 10 sujets) et également sur des leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide (moyenne sur 20 sujets) (Tableau 3), nous constatons une action inhibitrice generale des immunodepresseurs chimiques aussi bien pour les leucocytes normaux que pour les leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide et quelles que soient les doses utilisées, c'est-à-dire voisines des doses therapeutiques. C'est l'aspirine qui manifeste la plus grande activité (10000 mg/u1) et cette action est voisine de celle de serum antilymphocyte canal thoractique CT4 à la dose de 10^{-1} , 5×10^{-2} .

Par contre, nous ne trouvons jamais d'activité stimulante pour les immunodepresseurs chimiques utilisés.

Nous constatons que vis-à-vis des immunodepresseurs chimiques, les leucocytes de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide ont sensiblement le même comportement que les leucocytes normaux, ce qui n'étaient pas le cas pour les serums antilymphocytes.

Les seuls faits signalés concernant l'actions des Immunodepresseurs, l'ont été par MOULIAS qui a étudié en particulier l'action de: l'asparaginase, l'hydroxyure, le methotrexate et le cyclophosphamide, substances qui, à doses faibles, d'après cet auteur, augmentent la migration des leucocytes aussi bien en presence d'antigene reactif qu'en absence d'antigene. (5)

V/ RESUME

L'étude de l'action des immunodepresseurs sur le test de migration des leucocytes pratiqué avec les leucocytes de sujets normaux et de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoide, nous a permis de

CONSTATS :

- 1) Un comportement différent des leucocytes de sujets normaux et des sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde, vis-à-vis de serum antilymphocyte d'origine différente. Par contre, ce comportement est analogue lorsqu'on utilise des immunodépresseurs chimiques (Azathioprine, cyclophosphamide, chlorambucil, Methyl Prednisolone, Aspirine).
- 2) Une action différente sur le test de migration des leucocytes de serums antilymphocytes suivant les doses utilisées: une inhibition significative de la migration aux doses fortes (5×10^{-2}) des leucocytes de sujets normaux et de sujets atteints de Polyarthrite Rhumatoïde, et une accélération significative de la migration aux doses faibles (10^{-7}) des leucocytes de sujets normaux uniquement.

BIBLIOGRAPHIES

- 1) BARNETT (K)- PEKAREK (J)- JOHNOVSKY (J). Evaluation of the anti-macrophage effect of anti-lymphocyte, anti-macrophage and anti-IgG sera by a new invitro test. Transplantation 1972, 3, 44.
- 2) MAC LAURIN (B.P.), HUMM (J.A). Macrophage specificity of anti-serum against thymus lymphocytes. Immunol 1970, 6, 125-136.
- 3) MASSOUD (A). Contribution à l'étude du test de migration leucocytaire, These d'Etat 1974 n° 101 Lyon FRANCE.
- 4) MASSOUD (A). Etude de la migration des leucocytes en presence de IgG non denturées dans la Polyarthrite Rhumatoïde Iranien. J. Public Health 1975 Vol. 4, n° 2, 154-161.
- 5) MOULIAS (R) GOUST (J.M) MULIER-BERAT (E.M).
Le test de migration des leucocytes du sang périphérique; un nouveau test de hypersensibilité chez l'homme II-utilisation dans les affections auto-immunes. Resultats préliminaire et interprétation.
Press. Med 1970, 78-2315.

- 6) PEKAREK (J)- SVEJCAR (J)- JOHANOVSKY. The inhibition of formation inhibition factor by various anti-lymphocyte sera. Immunol 1971, 20, 895-900.
- 7) PEKAREK (J)- SVEJCAR (J)- NOUZA (K)- and JOHANOVSKY (J). Effect of Immunosuppressive on an in vitro correlate of CMI Immunology 1976, 31, 773-74.
- 8) SOBORG (M)- BENDIXEN (G). A leucocyte Migration Technique for in vitro-detection of cellular (delayed-type) Hypersensitivity in man. Dan. Med. Bull. 1969, 16, 1.
- 9) SVEJCAR (J) - PEKAREK (J) JOHNOVSKY (J). The effect of various antilymphocyte sera (ALS) on the migration of spleen fragment cells. Immunol 1971 21, 45-49.
- 10) SVEJCAR (J) - JOHNOVSKY (J) - PEKAREX (J). In-vitro Technique of the cell Migration from the spllen and for artificial fragments in-vitro methods in cell Mediated Immunity. Academic Press 1971 a.