

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



FACULTE DE PHARMACIE

THESE

année Académique : 1994-1995

N°

Présentée en vue de l'obtention du

**DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

INWOLEY KOKOU ANDRE

Interne des Hôpitaux d'Abidjan

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES
DE L'ADULTE IVOIRIEN PRESUME SAIN**

Soutenue publiquement le 28 Juillet 1995

COMPOSITION DU JURY :

Président : Monsieur le Professeur YAPO Abbé Etienne

Assesseurs : Monsieur le Professeur SOMBO Mambo François (Co-Directeur)

Monsieur le Docteur HURPY Richard (Co-Directeur)

Monsieur le Professeur Agrégé LOUKOU Yao Guillaume

Monsieur le Docteur WIKTOR Stefan

PRIERE POUR LA PAIX

Seigneur, fais de moi un instrument de ta paix

Là où est la haine.....que je mette l'amour

Là où est l'offense.....que je mette le pardon

Là où est la discorde.....que je mette l'union

Là où est l'erreur.....que je mette la vérité

Là où est le doute.....que je mette la foi

Là où est le désespoir.....que je mette l'espérance

Là où sont les ténèbres.....que je mette la lumière

Là où est la tristesse.....que je mette la joie

Oh Maître, que je ne cherche pas tant

A être consolé.....qu'à consoler

A être compris.....qu'à comprendre

A être aimé.....qu'à aimer

Car:

C'est en donnant.....qu'on reçoit

C'est en s'oubliant.....qu'on trouve

C'est en pardonnant.....qu'on est pardonné

C'est en mourant.....qu'on ressuscite à l'éternelle vie.

François d'Assise

SOMMAIRE

LISTE DE L'ADMINISTRATION ET DU PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE DE PHARMACIE	iii
DEDICACES ET REMERCIEMENTS	viii
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: BIBLIOGRAPHIE	4
I- LES LYMPHOCYTES	5
II- LES VALEURS DE REFERENCES	37
DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX PERSONNELS	46
I- LA METHODOLOGIE	47
II- LES RESULTATS	61
III- LA DISCUSSION	81
CONCLUSION	86
BIBLIOGRAPHIE	88
ANNEXES	95
TABLE DES MATIERES	105
SERMENT DE GALIEN	109

**LISTE DU PERSONNEL ADMINISTRATIF
ET DU PERSONNEL ENSEIGNANT
DE LA FACULTE DE PHARMACIE**

HONORARIAT

Directeurs Honoraires: Professeur FOURASTE Isabelle
Professeur RAMBAUD André

ADMINISTRATION

Doyen: Professeur YAPO Abbé Etienne
1^{er} Assesseur: Professeur Agrégé DANO Djédjé Sébastien
2^{ème} Assesseur: Docteur HURPY Richard
Secrétaire Principal: Monsieur ZON Emile
Secrétaire Principal Adjoint: Monsieur OUATTARA Julien M.
Comptable: Monsieur DJEGNA Ballo Blaise.

PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BAMBA Moriféré	Galénique
KONE Moussa	Parasitologie
MARCY René	Pharmacologie
OUATTARA LASSINA	Chimie thérapeutique
YAPO Abbé Etienne	Biochimie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. ATTINDEHOU Eugène	Chimie Analytique
DANO Dédjé Sébastien	Toxicologie
KABLAN Brou Jérôme	Pharmacologie
Mme KONE Bamba Diénéba	Matière médicale
MM. KOUADIO Kouakou Luc	Hydrologie
LOUKOU Yao Guillaume	Microbiologie
MALAN Kla Anglade	Chimie Analytique
MONNET Dagui	Biochimie

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	BRUNEL Jean-Frédéric	Botanique
	DIAFOUKA François	Biochimie
	HURPY Richard	Biologie de la reproduction
	YOLOU Séri Ferdinand	Chimie Minérale et Générale

MAITRES ASSISTANTS

Mme	CORALLO Palme Antoinette	Physiologie
MM.	FOUNGBE Siéko	Pharmacologie
	KONAN-WAIDHET Daniel	Biochimie

ASSISTANTS

MM.	ALLANDOUM Nambelbaye	Chimie Thérapeutique
	COULIBALY Sabali	Galénique
	KOUASSI Dinard	Hématologie
Mlle	SAWADOGO Gnénago Duni	Hématologie
	SIMAGA Dédéou	Matière médicale

ASSISTANTS STAGIAIRES

MM.	ADJOUNGOUA Attoli Léopold	Matière médicale
Mme	AGBESSI Epe KOUASSI	Microbiologie
Mme	AKE Michèle Epe KOJAME	Chimie Analytique
Mme	GBONON Sophie Epe ASSI	Matière médicale
Mme	HAUHOUOT Epe ATTOUMGBRE	Biochimie
MM.	KOUADIO Odi Didier	Biochimie
	NEBAVI N'guessan G.F.	Parasitologie
Mme	SIRANSY N'doua Epe KOUAKOU	Pharmacologie
MM.	VABE Franck Solmi	Galénique
	YAPO Achou Pascal	Galénique
	ZINZENDORF Nanga Yessé	Immunologie

PROFESSEURS CERTIFIES

M.	FOBO Todjila Gérard	Licence d'Anglais
Mme	CISSE Awa	Licence d'Anglais

IN MEMORIAM

Feu COMOE Léopold

Maître de Conférence Agrégé (1981-1992)

LISTE DES CHERCEURS

Mme BOGNON Cathérine
M. TCHAMRAN Meless

Attaché de Recherche
Attaché de Recherche

ENSEIGNANTS D'AUTRES FACULTES APPORTANT LEURS CONCOURS A LA FACULTE DE PHARMACIE

PROFESSEURS

MM. DEGNY Etchié
LOROUGNON Guédé J.

Chimie Organique (Sciences)
Botanique (Sciences)

MAITRES DE CONFERENCES

MM. AKE Sylvestre
EDOH Vincent
KOUAKOU N'zué
TEA Gokou
OYETOLA Samuel

Physiologie Végétale (Sciences)
Bactériologie-Virologie (Médecine)
Pathologie Médicale (Médecine)
Chimie Organique (Sciences)
Chimie minérale (Sciences)

MAITRES ASSISTANTS

Mme FANTODJI Agathe
MM. GUEU Kaman Pascal
TOURE Seiko Amadou
OCHIOU Abbé Delphin

Biologie Animale (Sciences)
Physique (Sciences)
Chimie Organique (Sciences)
Physique (Sciences)

ASSISTANTS

MM. FOFANA Siaka
GUISO Atchéle

Informatique (Sciences)
Physique (Sciences)

ENSEIGNANTS VACATAIRES

M.	APHANOU	Sécourisme (G.S.P.M. Indénié)
Mme	BONETO Rosa	Biochimie
MM.	DEMPAH Ano Joseph	Parasitologie-Zoologie
	GUEHI André	Sécourisme (S.A.M.U.)
	KOUAO AKA	Législation
	MAGBI Alain	Pharmacie Galénique
	NEMLIN Gnopo	Botanique(C.I.R.T.)
	N'GUETTA Augustin	Gestion (I.N.S.E.T.)
	OUATTARA Soungalo	Microbiologie
	TEBI Ambroise	Diététique (I.N.S.P.)

BIBLIOTHEQUE

M.	KOUASSI Koffi Lambert	Conservateur
----	-----------------------	--------------

MISSIONNAIRES

MM.	BADIANE Mamadou	Professeur de Chimie Thérapeutique Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar.
	BATAILLE Bernard	Professeur de Galénique Faculté de Pharmacie de Montpellier I.
	FAYE Boubacar	Professeur de Pharmacologie Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar.
Mme	FOURASTE Isabelle	Professeur de Pharmacognosie Faculté de Toulouse.
MM.	JACOB Maurice	Professeur de Pharmacie Galénique Faculté de Pharmacie de Montpellier I.
	TOURE Pierre	Professeur de Pharmacie Galénique Faculté de Pharmacie de Caen.

LES DEDICACES

Je dédie cette thèse.....

A NOTRE DIEU :

Père pour sa magnificence , sa sagesse et sa gloire

Fils qui nous a révélé en plénitude l'amour du Père

Esprit saint, notre paraclet et défenseur qui enseigne toutes choses.

Seigneur ce travail est ton oeuvre car tu règnes sur tous et agis par tous.

Pardonne moi mes entraves à la charité et aide moi à demeurer pour toujours dans la vérité et la justice. AMEN

A MON PERE .

Pour l'éducation que j'ai reçue et pour tes prières
Ce travail ne peut récompenser les sacrifices consentis pour la réussite de mes études. Que cette thèse qui couronne les études que tu as voulu que j'entreprenne, et que je ne regrette pas, soit le signe d'un pardon car je reconnais n'avoir pas été toujours aussi sage que tu l'aurais voulu.

A MA MERE

Que le Seigneur te garde et t'aide à toujours faire sa volonté .

A MA BELLE-MERE

Merci est un petit mot mais le seul que m'offre le vocabulaire Français pour t'exprimer ma filiale reconnaissance .

Que la grace du Seigneur soit avec ton esprit.

A MES FRERES ET SOEURS

Ce travail est le fruit de votre soutien moral et spirituel.

Continuons à nous supporter les uns les autres et revêtons par dessus tout l'amour qui est le lien parfait . (Col 3,13-14)

A MA TANTE, VEUVE GNANZOU

Je t'appelle affectueusement Maman, pour traduire que tu es une véritable mère pour moi.
Que le Seigneur te comble toujours de joie.

AUX FAMILLES INWOLEY, LOOKENSEY, GNANZOU

Oncles Tantes
Cousins Cousins

Merci pour votre assistance tout au long de ma formation

A MA GRANDÈ-MERE, FEU LOOKENSEY ELISABETH

Nanan, tu nous a quitté au moment où je rentrais à l'Université.
Là où tu te trouves, continue à prier pour que le Seigneur m'accorde la sagesse que tu as toujours
voulu pour moi et m'aide à être charitable comme tu l'as été.

A MA CHERIE, YOLANDE BLA

Rendons toujours grâce au Seigneur , d'avoir mis l'un sur le chemin de l'autre.

Merci pour ton humilité, ta douceur et ta franchise.

Que l'Esprit Saint nous aide à réaliser nos projets en respectant la volonté du Père, qu'il nous aide à cultiver l'amour et à le vivre tel qu'il nous l'enseigne dans 1Cor 13.

AUX FAMILLES AHIIBOII, ASSEMIEN, BINAN, BLA

Merci de m'avoir accepté comme un des vôtres.

A JOCELYNE ASSEMIEN

Merci pour tes prières et ta disponibilité.

Que le Seigneur t'aide à être toujours dévouée au service de la communauté et à communiquer aux autres cette grande joie de vivre qui t'anime.

AUX FRERES DE LA FRATERNITE SAINT DOMINIQUE

Merci pour votre assistance spirituelle et pour votre contribution à ce travail.

Que par l'intercession de la vierge Marie, l'Esprit Saint vous aide dans votre mission afin que la gloire de Dieu resplendisse dans notre Université .

A MES FRERES ET SOEURS EN CHRIST

DE LA C.C.E.A (Communauté Catholique des Etudiants)

Merci pour les responsabilités que vous m'avez confiées.
Ouvrons pour une communauté unie comme les différents membres d'un même corps.

D'EPIHATA

Ce travail est le fruit des prières montées vers Dieu.
Merci pour cette chaleur fraternelle qui a donné un nouvel élan à ma foi.

DE LA MAITRISE UNIVERSITAIRE

Nous nous sommes engagés à manifester la gloire de Dieu par les chants.
Que l'Esprit Saint nous comble de ses grâces pour pouvoir mieux réaliser cette mission.

CATECHISTES DU C.C.E.A.

Merci pour votre disponibilité et votre dévouement à l'enseignement de l'Évangile.
Que Jésus vous aide à persévérer dans cette mission pour aggrandir la famille des enfants de Dieu .

CATECHUMEN DU C.C.E.A.

Demeurez dans le chemin que vous avez choisi car, qui met sa vie et sa confiance dans le Seigneur ne sera jamais déçu .

A LA PROMOTION LEOPOLD COMOE

Merci de m'avoir fait confiance en me choisissant comme délégué pendant toutes ces années passées à la faculté.

Nous portons le nom d'un de nos illustres Maîtres.

Soyons de bons praticiens afin d'honorer sa mémoire .

AUX INTERNES DES HOPITAUX D'ABIDJAN

Restons toujours au service des malades et à l'écoute de nos Maîtres malgré toutes nos difficultés.

AU PERSONNEL DU SERVICE D'HEMATO-IMMUNOLOGIE DU CIU DE COCODY

Pour votre amitié et votre dévouement à la cause de la santé publique .

A MES AMIS (Binan, Isidore, Christophe, Okito, Caroline)

Pour la confiance que vous me portez .

Soyons tolérants et à l'écoute de l'autre pour que cette amitié perdure.

AUX DOCTEURS Mukadi, Djomand

Pour vos observations et conseils.

A TOUS CEUX QUE JE N'AI PAS PU CITER

Pardonnez-moi cette omission

SINCERES REMERCIEMENTS

AU PROJET RETRO-CI ET AU C.N.T.S.

Pour le soutien matériel à la réalisation de ce travail.

AUX DONNEURS DE SANG DU C.N.T.S.

Merci pour votre importante contribution à ce travail car vous avez accepté de vous faire piquer deux fois.

Que le Seigneur vous aide à toujours être disponible à faire don de votre sang pour sauver la vie de vos frères.

AU PERSONNEL DE LA BANQUE DE SANG

Merci pour votre collaboration

AU PERSONNEL DU PROJET RETRO-CI

Ce travail est en tout point, votre oeuvre.

Que Dieu vous aide à maintenir cette bonne ambiance dans laquelle vous travaillez .

AUX DOCTEURS SEKA , DASSE , SORHO

Pour vos critiques et suggestions

A TOUS CEUX QUI M'ONT INSTRUIT

En témoignage de ma gratitude.

A NOS MAITRES ET JUGES

Nous sollicitons votre indulgence

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY
Monsieur le Professeur YAPO ABBE ETIENNE

- Professeur titulaire de Biochimie
- Biologiste des Hôpitaux
- Doyen de la Faculté de Pharmacie d'Abidjan (Université de Côte d'Ivoire)
- Chef du département de Biochimie à la Faculté de Pharmacie
- Directeur du C.E.S. de Biochimie Clinique de l'Université de Côte d'Ivoire
- Chef du service de Biochimie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
- Chef du service des Urgences biologiques du C.H.U. de Cocody
- Officier des Palmes Académiques
- Chevalier de l'Ordre National de Madagascar
- Commandeur dans l'ordre de la santé publique de la Côte d'Ivoire
- Membre de plusieurs associations et sociétés savantes nationales et internationales

Cher Maître,

Vous nous honorez en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Ce travail s'inscrit dans l'un des axes de recherche de la Faculté, que vous avez initié.

Nous conservons un bon souvenir de votre enseignement et aussi de vos conseils lors des crises que notre Université a traversées.

Soyez assuré de notre reconnaissance et profonde admiration.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE
Monsieur le Professeur SOMBO MAMBO FRANCOIS

- Professeur titulaire d'Immunologie
- Chef du département d'Immunologie de la Faculté de Médecine
- Chef du Service d'Immuno-Hématologie du C.H.U. de Cocody

Cher Maître

Vous m'avez honoré en me confiant ce travail.

Vous êtes un grand Enseignant.

A votre côté, nous avons acquis le sens de la rigueur dans le travail et forgé l'humilité.

Trouvez ici l'expression de notre reconnaissance et de notre admiration les plus respectueuses.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE
Monsieur le Docteur HURPY RICHARD

- Maître de conférence, Chargé de cours de Cytologie, Histologie, Embryologie et cytogénétique à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan
- Biologiste de la reproduction
- Deuxième Assesseur à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan

Cher Maître ,

Toujours ouvert et accueillant, vous avez accepté sans hésitation de co-diriger ce travail. Nous avons appris à votre côté à avoir, l'amour d'un travail bien fait et, cultiver la joie dans les relations inter-humaines.

A NOTRE MAITRE ET JUGE
Monsieur le Professeur Agrégé LOUKOU YAO GUILLAUME

- Maître de conférence Agrégé de Microbiologie
- Chef du département de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan
- Directeur général de la santé et des affaires sociales au Ministère de la santé et des affaires sociales.

Cher Maître ,

Vous avez accepté spontanément de juger ce travail malgré vos multiples charges.
Nous gardons de vous l'image d'un enseignant minutieux.
Veuillez trouver ici, l'expression de notre respectueuse gratitude.

A NOTRE JUGE
Monsieur STEFAN Z. WITKOR, M.D., M.P.H.

→ Médecin Epidémiologiste

→ Directeur adjoint chargé des affaires scientifiques au Projet RETRO-CI

Cher juge ,

Vous avez accepté que votre Institution apporte son concours à la réalisation de ce travail.
Nous avons appris auprès de vous des notions d'épidémiologie et de promptitude dans le travail.
Soyez assuré de notre sincère gratitude.

ABREVIATIONS

CD: Antigène de différenciation leucocytaire

Ch50: Complément hémolytique 50%

Ex: Exemple

Fig: Figure

Ig: Immunoglobuline

Ly: Lymphocyte

Ly T4 ou Ly CD4: Lymphocyte T portant la molécule CD4

Ly NTNБ: Lymphocytes non-T et non-B

p: Page(s)

Tb: Tableau

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

Le rôle des analyses biologiques en médecine n'est plus à démontrer, car elles aident le clinicien à poser un diagnostic, à surveiller l'évolution d'une maladie voire à la prévenir.

L'interprétation des résultats d'analyse, repose sur la comparaison entre la valeur du paramètre mesuré chez un sujet donné et celles obtenues dans une population de référence sélectionnée selon des critères bien définis.

En Côte d'Ivoire, par défaut de normes biologiques propres aux populations Africaines en général et Ivoiriennes en particulier, pour certains paramètres, les biologistes et les cliniciens utilisent des normes Européennes ou Américaines qui ne sont pas toujours superposables à celles du continent Africain ; surtout pour des paramètres sujets à d'importantes variations biologiques et analytiques, tels que les taux des lymphocytes.

Les lymphocytes sont les cellules de l'immunité spécifique humorale et cellulaire et sont aussi responsables du maintien de l'homéostasie du système immunitaire.

L'immunophénotypage leucocytaire et surtout le typage lymphocytaire, initialement effectué en recherche fondamentale est, depuis l'avènement de l'infection à V.I.H. (Virus de l'immunodéficience humaine) caractérisée par une atteinte élective des lymphocytes T4, entré dans la pratique courante.

La découverte des anticorps monoclonaux, leur essor et la mise au point de techniques d'analyses rapides et plus fiables telles que la cytométrie en flux permettent de nos jours une réalisation du typage lymphocytaire et son application à de nombreux domaines de la médecine.

L'objet de ce travail est d'établir grâce à la technique du typage lymphocytaire, des valeurs de référence des populations lymphocytaires, chez l'Ivoirien adulte présumé sain, afin d'aider d'une part à l'interprétation des bilans immunitaires et d'autre part à la comparaison de ces valeurs Ivoiriennes à celles d'autres populations ailleurs en Afrique et dans le Monde.

PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

I - LES LYMPHOCYTES

Ce sont les cellules responsables de la défense immunitaire spécifique humorale et cellulaire. Elles sont ubiquitaires mais on les retrouve en plus grand nombre dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, et les organes annexés aux muqueuses).

A - MORPHOLOGIE DES LYMPHOCYTES

La structure observée varie en fonction de l'appareillage utilisé.

1- Au microscope optique

L'observation d'un frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa permet de visualiser deux types de cellules.

1-1 Les petits lymphocytes

Ils représentent la majorité des lymphocytes du sang et du canal thoracique. Ils ont un diamètre de 7 à 8 microns et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le noyau rond ou légèrement réniforme a une chromatine en motte, et laisse un liséré cytoplasmique basophile.

1-2 Les moyens et grands lymphocytes

Ils ont un diamètre de 9 à 15 microns et un rapport nucléo-cytoplasmique moins important que celui du petit lymphocyte. La chromatine est moins condensée, le cytoplasme plus abondant possède des granulations azurophiles représentant les lysosomes. Cette structure leur vaut l'appellation de "large granular lymphocyte" (L.G.L.).

2- Au microscope à contraste de phase

L'observation des deux types cellulaires permet de mieux apprécier l'aspect réniforme du noyau et certaines inclusions cytoplasmiques: Appareil de golgi, mitochondries, etc ...

On observe aussi l'absence d'étalement et d'adhésion au verre mais une possibilité de déplacement par émission de pseudopodes, réalisant plusieurs aspects dont celui de "miroir à manche".

3- Au microscope électronique

On peut visualiser le noyau et les organites intracytoplasmiques (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc...).

4- Au microscope électronique à balayage

On observe la surface des cellules qui révèle une dualité morphologique :

- Des cellules hérissées de microvillosités ou cellules à surfaces villeuses.
- Des cellules à contours lisses ou cellules chauves.

Cette observation a permis d'émettre l'ancienne hypothèse de l'existence de deux familles de lymphocytes:

- + Les lymphocytes T correspondant aux cellules chauves.
- + Les lymphocytes B étant les cellules à surfaces villeuses ou cellules chevelues.

Mais c'est l'étude des marqueurs de surface et des fonctions qui a permis d'affirmer qu'il existe trois grandes populations de lymphocytes avec pour chacune d'elles, la possibilité d'identifier des sous populations :

- Les lymphocytes T, caractérisés par leur récepteur spécifique pour l'antigène, le T.C.R.(T cell receptor), sont responsables de la réponse immunitaire

cellulaire spécifique.

- Les lymphocytes B possédant des immunoglobulines de surfaces correspondant à leur récepteur spécifique pour l'antigène: B.C.R., (B cell receptor), sont responsables de la réponse immunitaire humorale spécifique.
- La troisième population lymphocytaire qui était appelée "lymphocytes nuls" car ne possédant ni T.C.R. ni B.C.R.

De nos jours ces lymphocytes ne sont plus appelés "nuls" parce que bien identifiés. Il s'agit d'une population hétérogène regroupant :

- + Les cellules K (Killer cell).
- + Les cellules N.K. (Natural Killer).
- + Les cellules L.A.K. (Lymphokine Activated Killer).

Ces cellules réalisent une réponse immunitaire cellulaire non spécifique.

B- LA MATURATION DES LYMPHOCYTES

Les lymphocytes T et les lymphocytes B proviennent d'une même cellule souche lymphoïde (c.s.l.) issue du mésoderme embryonnaire et qui se différencie dès la cinquième semaine de la vie intra-utérine dans le foie fœtal, ensuite dans la moelle osseuse à partir du troisième mois chez le fœtus puis chez l'enfant et l'adulte, en précurseurs lymphocytaires pré-T et pré-B.

Ces précurseurs vont se différencier et acquérir leur maturation dans les organes lymphoïdes centraux respectifs que sont le thymus pour les lymphocytes T et la moelle osseuse pour les lymphocytes B chez les mammifères.

1- La maturation des lymphocytes T

La maturation des lymphocytes T se réalise dans le thymus.

Ceci a été mis en évidence en 1962 par Miller et coll., qui ont montré qu'une thymectomie néonatale ou une agénésie thymique chez la souris et chez l'Homme faisaient apparaître une immunodéficiência sévère.

Le thymus est à la fois le lieu de différenciation hématopoïétique et de maturation fonctionnelle des lymphocytes T.

1-1 La différenciation hématopoïétique

Une cellule souche lymphoïde de la moelle osseuse, issue de la cellule pluripotente, donne naissance à des précurseurs T ou prothymocytes qui colonisent le thymus aux environs de la douzième semaine de la vie intra-utérine.

Là, sous l'influence du micro-environnement thymique fait d'hormones thymiques (thymosine, thymuline, thymopoïétine), de cytokines, et des cellules épithéliales, ces précurseurs vont donner des thymocytes immatures puis des thymocytes matures aboutissant aux lymphocytes T.

Toutes ces cellules ne présentant pas de grandes différences morphologiques, c'est l'étude de la cinétique d'apparition des marqueurs de surfaces et plus particulièrement des antigènes de différenciation qui a permis de mieux identifier les différentes étapes de cette différenciation, figure 1.

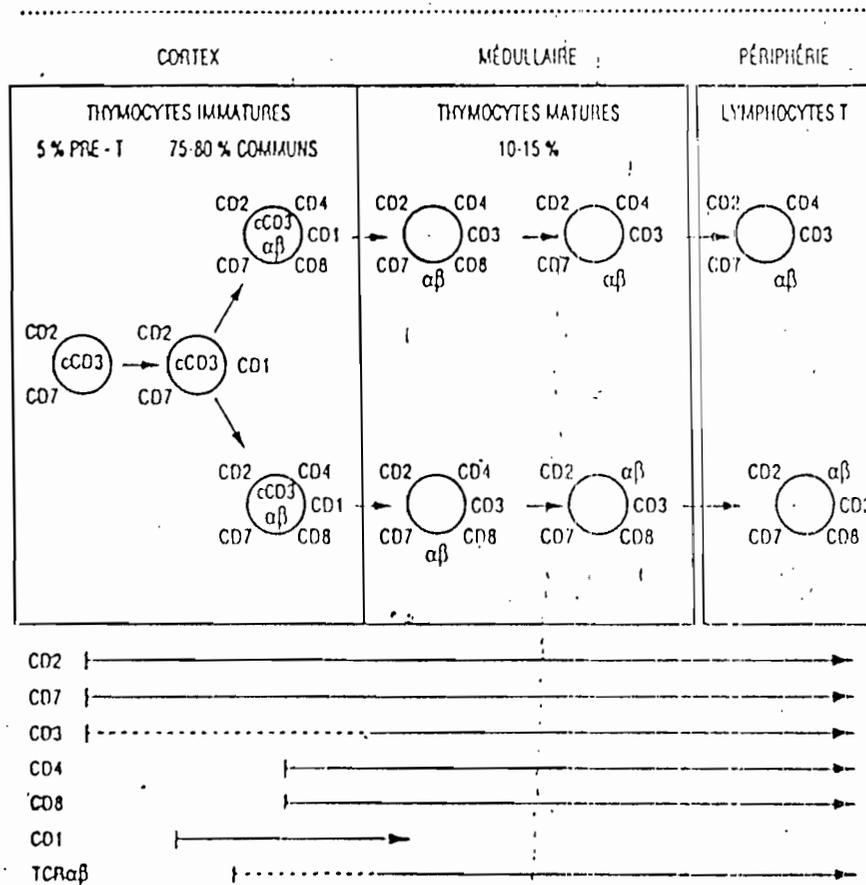


Fig 1 : Les étapes de la différenciation des lymphocytes T

(Genetet Noëlle, 1993)

1-2 La maturation fonctionnelle

Elle consiste à l'acquisition de molécules de surface et à la sélection des clones de lymphocytes T fonctionnels. Cette maturation thymique qui a lieu pendant la vie intra-utérine, en l'absence d'antigènes étrangers, aboutit à des lymphocytes T quiescents qui vont achever leur maturation dans les organes lymphoïdes périphériques au contact des antigènes pour donner des lymphocytes fonctionnels.

1-2-1 Les molécules de surface

Elles sont très nombreuses et variées; c'est pourquoi nous les aborderons en les classant en trois groupes:

- Les antigènes de différenciation
- Les récepteurs de surface
- Les autres molécules

a - Les antigènes de différenciation

La notion de classe de différenciation (en Anglais:cluster of differentiation) a été proposée et définie lors du premier atelier international sur les antigènes de différenciation leucocytaire à Paris en 1981.

" Une classe de différenciation (CD) est définie par l'ensemble des anticorps monoclonaux antileucocytaires étudiés par un atelier international et dont la réactivité n'a pu en terme de distribution tissulaire , être dissociée." (A. Bernard, 1993).

La molécule reconnue par l'anticorps monoclonal CDx sera nommée molécule CDx ou antigène CDx.

Lors des ateliers internationaux de Boston 1984, Oxford 1986 et Vienne 1989, de nombreux anticorps monoclonaux ont été testés sur des cellules hématopoïétiques ou non, normales ou pathologiques, aboutissant au recensement en 1989 de 78 CD.

Les CD sont des glycoprotéines dont l'intérêt découle du fait que:

- Ils permettent de distinguer aisement les lymphocytes T des lymphocytes B et d'établir des sous populations lymphocytaires T.
- Il existe une corrélation entre la repartition des CD et les fonctions des populations lymphocytaires.
- Ils permettent d'étudier la différenciation et la maturation des lymphocytes.

→ Ils contribuent au diagnostic de certaines hémopathies.

Nous décrivons brièvement certains CD ayant un rôle important lors de la réponse immunitaire et lors des analyses biologiques, une liste exhaustive étant donnée en annexe; ANNEXE 1.

a -1 CD2

Elle est encore appelée LFA2 (leukocyte function antigen-2).

C'est une molécule de 50 Kd qui est retrouvée sur l'ensemble des lymphocytes T (d'où le nom pan T), mais aussi sur les cellules NK.

Elle a la propriété de pouvoir se lier :

- + Aux globules rouges de mouton, entraînant la formation de rosettes par les lymphocytes T.

- + A la molécule CD58 ou LFA3 des cellules présentant l'antigène, jouant ainsi un rôle important lors de la reconnaissance antigénique.

a-2 CD3

C'est une molécule de 20-25 Kd composée de 5 chaînes polypeptidiques synthétisées dès le stade de prothymocyte mais qui ne sont exprimées qu'à partir du stade de thymocytes matures.

La molécule CD3 est complexée au T.C.R. et intervient dans la transduction du signal d'activation (Tsoukas et coll., 1984). Elle ne se retrouve que sur les cellules T.

a-3 CD4

C'est une glycoprotéine monocaténaire de 60 Kd apparaissant au stade de thymocyte commun en même temps que le CD8 puis à partir du stade de thymocyte mature, l'expression des deux molécules est exclusive définissant ainsi deux sous-populations lymphocytaires T.

Le CD4 se retrouve à forte densité sur les lymphocytes T auxiliaires, et à des taux faibles, sur les monocytes-macrophages.

La portion extramembranaire du CD4 est capable de se lier à la partie constante des molécules d'histocompatibilité de classe II des cellules présentant l'antigène, afin de reconnaître ce dernier et transmettre le signal d'activation au lymphocyte T4 (Schrezenmeier H. et Fleisher B. 1988).

La molécule CD4 est aussi le récepteur de la glycoprotéine 120 (gp 120) du virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.) selon Dalgleish et coll., 1974.

Cette observation permet de comprendre le tropisme du V.I.H. pour le lymphocyte T4.

a-4 CD8

C'est un homodimère $\alpha\alpha$ ou hétérodimère $\alpha\beta$ contemporain du CD4 et qui est essentiellement exprimé sur la sous-population des lymphocytes T cytotoxique ou des lymphocytes T suppresseurs.

On trouve aussi le CD8 en faible proportion sur les cellules NK.

Comme le CD4, la portion extra-membranaire du CD8 peut se lier à la partie monomorphe des molécules d'histocompatibilité de classe I des cellules présentant l'antigène.

a-5 CD45

Encore appelé LCA (Leucocyte-common antigen), c'est une molécule composée d'une chaîne polypeptidique isomorphe existant sur tous les leucocytes mais à des densités variables (Loken et coll., 1990).

On peut citer les formes présentes sur les lymphocytes T:

- CD45RA se retrouve sur les lymphocytes T n'ayant pas encore rencontré un antigène (lymphocytes T vierges ou naïfs).
- CD45RO retrouvé sur les lymphocytes T mémoires constituant la majorité des lymphocytes recirculants.

b- Les récepteurs de surface

b-1 Le récepteur du lymphocyte T pour l'antigène T.C.R.

C'est une molécule formée de deux chaînes polypeptidiques $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ codées par des gènes polyalléliques. Chaque chaîne est composée d'une partie variable et d'une partie constante reliées par des ponts disulfures.

L'assemblage des parties variables des deux chaînes constitue la zone d'interaction spécifique avec l'antigène et les parties polymorphes des molécules d'histocompatibilité.

Les chaînes du TCR sont synthétisées dès le stade de thymocyte immature mais sont exprimées à partir du stade de thymocyte commun.

Chaque lymphocyte T possède un seul type de TCR dont l'ensemble constitue le répertoire immunologique des lymphocytes T.

Le TCR de type $\alpha\beta$ est retrouvé sur la majorité des lymphocytes T. Associé au CD3 et au CD4 ou CD8, ce T.C.R. permet la restriction allogénique lors de la reconnaissance de l'antigène. En effet les lymphocytes T8 ou T4 ne reconnaîtront l'antigène que s'il leur est

présenté associé respectivement aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou de classe II du soi, (Dembic et coll., 1986), **figure 2**.

Le T.C.R. de type $\gamma\delta$ existe chez 5% des lymphocytes T. Ces derniers ont des propriétés cytotoxiques sans restriction allogénique, (Brenner et coll., 1986).

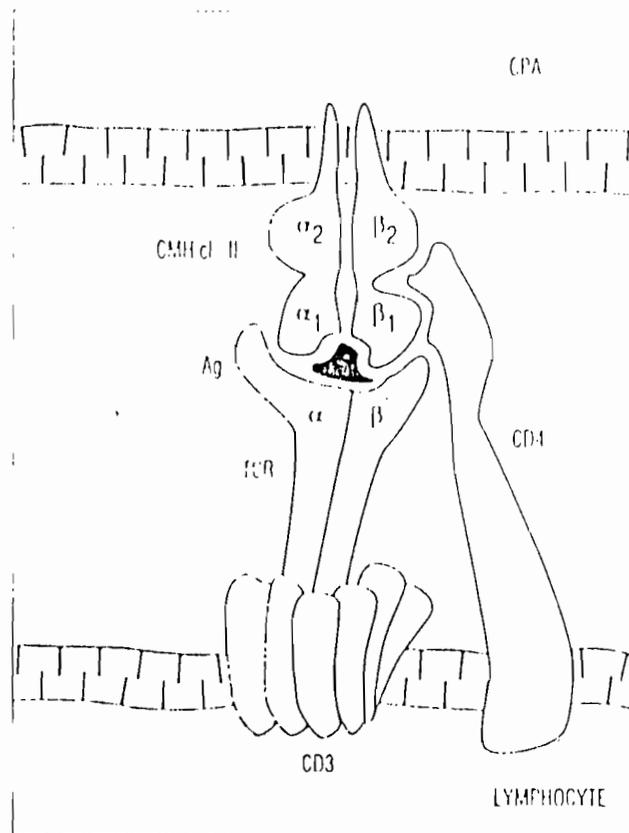


Fig 2 :Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T4

(Genet et Noëlle, 1993)

b-2 Les autres récepteurs de surface

Notons que parmi ces récepteurs on retrouve plusieurs antigènes de différenciation. Nous les présenterons en tenant compte de leurs fonctions.

→ Les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines.

→ Les récepteurs pour les fractions du complément.

Ex: CD35 est le récepteur de C3b (CR1)

→ Les récepteurs des cytokines.

Ex: CD25 est le récepteur de IL2 (interleukine 2)

→ Les récepteurs pour des substances telles que l'histamine, les stéroïdes, les prostaglandines ,etc...

→ Le récepteur pour l'endothélium particulier des veinules des organes lymphoïdes:

Homing receptor, (Jalkanen et coll., 1986).

Ce récepteur reconnu par l'anticorps monoclonal CD44 permet le

Compartimentage des lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes périphériques et leur recirculation (c'est le phénomène de Homing).

→ Les molécules d'adhésion qui renforcent la liaison entre le lymphocyte T et les autres cellules.

Ex: le CD2 peut se lier au LFA-3 (ou CD58) des cellules présentant l'antigène.

c- Les autres molécules de surface

Nous pouvons citer:

→ Les molécules d'histocompatibilité (H.L.A.: Human leukocyte antigen) de classe I retrouvées sur tous les lymphocytes.

- Les molécules d'histocompatibilité de classe II présentes uniquement sur les lymphocytes T activés.

1-2-2 La sélection clonale

Les cellules T subissent lors de leur passage dans le thymus, une véritable éducation faisant que seulement 10% des thymocytes donnent des lymphocytes T fonctionnels et 90% d'eux demeurent dans le thymus où ils finissent par mourir.

Cette sélection clonale revêt deux aspects (Von Boehmer , 1986) :

- Une sélection positive: dans le cortex, seuls les thymocytes communs dont le TCR ayant une affinité pour les molécules HLA du soi présentées par les cellules épithéliales thymiques, poursuivront leur maturation. Les autres sont éliminés.
- Une sélection négative: dans la médulla, les clones sélectionnés ayant rencontré des auto-antigènes lors de leur maturation, seront détruits par apoptose ou mort programmée.

Les cellules filles successives issues des clones sélectionnés ne pourront reconnaître un antigène que si ce dernier est associé aux molécules HLA ayant servi à cette sélection. Notons que cette restriction allogénique n'est valable que pour les lymphocytes T ayant un TCR de type $\alpha\beta$.

2- La maturation des lymphocytes B

Chez les oiseaux, la maturation des lymphocytes B se réalise dans la bourse de Fabricius.

Chez l'Homme et les autres mammifères, elle s'opère dans la foie foetal (de la huitième

à la quatorzième semaine de la vie intra-utérine) puis dans la moëlle osseuse hématopoïétique.

2-1 Les étapes de la maturation

Les facteurs influençant la lymphopoïèse B sont méconnus, mais on peut suivre les différentes étapes en observant la cinétique de synthèse et d'expression des molécules de surface, figure 3.

La cellule souche lymphoïde issue de la cellule pluripotente va donner des précurseurs B qui vont se différencier en cellules B immatures puis en lymphocytes B. Ces lymphocytes B quittent la moëlle osseuse pour aller coloniser les organes lymphoïdes secondaires où sous l'effet de la stimulation antigénique et de certaines cytokines ils vont donner des plasmocytes.

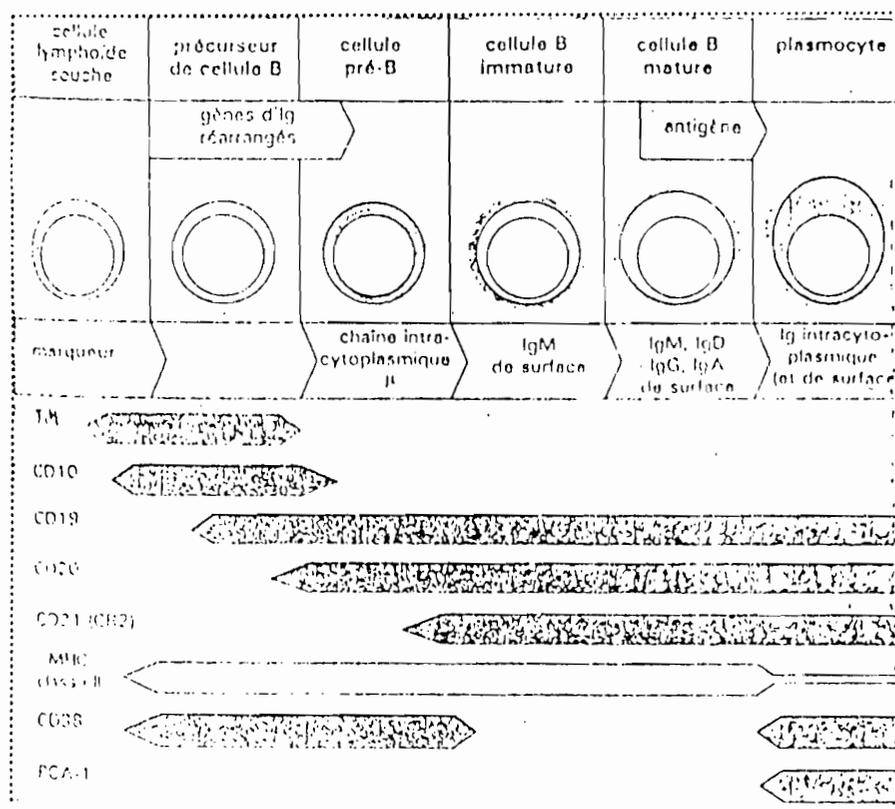


Fig 3 : La Maturation des lymphocytes B

(Roitt, Brostoff, Male, 1989)

2- 2 Les molécules de surfaces

Elles sont aussi variées que chez le lymphocyte T

2-2-1 Les antigènes de différenciation

Nous présentons ici certains CD dont la mise en évidence a un intérêt en pratique courante.

a- CD5

C'est une molécule retrouvée sur tous les lymphocytes T mais seulement sur une sous population de lymphocytes B.

Elle joue un rôle dans la pathogénie de certaines maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et dans la leucémie lymphoïde chronique.

b- CD19

Molécule monocaténaire de 95 Kd exprimée exclusivement sur les lymphocytes B.

C'est un marqueur précoce qui disparaît lors de la différenciation en plasmocytes.

c- CD21

C'est une molécule de 140 Kd restreinte à certaines cellules lymphocytaires B.

Elle est le récepteur de la fraction C3d du complément et du virus d'Epstein-Barr jouant ainsi un rôle dans la pathogénie de la maladie de Burkitt.

2-2-2 Les récepteurs de surface

a- Le récepteur du lymphocyte B pour l'antigène (B.C.R)

C'est une immunoglobuline de surface , acquise lors de la maturation.

Elle a une structure analogue à celle des immunoglobulines circulantes mais possède, en plus, au niveau de la partie C-terminale de la chaîne lourde, une zone transmembranaire

permettant son ancrage, et une zone intra-cytoplasmique permettant la transmission des signaux d'activation.

Les parties hypervariables des chaînes lourdes et légères du BCR portent la propriété de reconnaissance spécifique de l'antigène par le lymphocyte B. Cette reconnaissance n'est pas allorestreinte.

b- Les autres récepteurs

→ Les récepteurs pour le Fc des immunoglobulines.

Ex: CD32 est le récepteur pour le Fc des immunoglobulines d'isotype G.

→ Les récepteurs pour le complément.

→ Les récepteurs pour les cytokines.

2-2-3 Les autres molécules de surface

Ce sont les molécules d'histocompatibilité (HLA) de classe I et II qu'on retrouve sur tous les lymphocytes B.

3- La maturation de la troisième population lymphocytaire

Ce sont les cellules K, NK et LAK.

On les rattache aux lymphocytes T car elles possèdent le CD2, mais leur maturation qui est peu connue, est indépendante du thymus.

Ces lymphocytes possèdent d'autres marqueurs de surface tels que CD16, CD56 ou HNK et des récepteurs pour le Fc des immunoglobulines.

C- Le devenir des lymphocytes

Les lymphocytes matures issus des organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse et thymus) sont des cellules quiescentes qui vont circuler à travers les circuits sanguins ou lymphatiques et les tissus, particulièrement les organes lymphoïdes périphériques.

Là sous l'effet de la stimulation antigénique, ils vont se différencier en sous populations fonctionnelles actives pour le système immunitaire.

Notons que les lymphocytes ayant quitté les organes lymphoïdes centraux n'y retournent plus.

1- Les populations fonctionnelles des lymphocytes T

1-1 Les lymphocytes T effecteurs

→ Les lymphocytes T cytotoxiques. Ils ont généralement le CD8 et sont donc appelés lymphocytes CD8+ (Ly T8). Fonctionnellement, on peut rattacher à ce groupe, la troisième population lymphocytaire dont les membres ont une activité cytotoxique non spécifique de l'antigène et ne sont pas tous pourvus du CD8.

→ Les lymphocytes T producteurs de lymphokines qui sont CD4+ ou CD8+.

Ces cellules synthétisent plusieurs cytokines ayant des fonctions diverses.

On peut citer : Les interleukines (IL) 2, IL5, IL6, l'interféron γ , les TNFa et TNFb
(TNF : Tumor necrosis factor)

1-2 Les lymphocytes T régulateurs

→ Les lymphocytes T auxiliaires (ou helper, inducteur, amplificateur), ils sont CD4+.

→ Les lymphocytes T suppresseurs qui sont CD8+.

1-3 Les lymphocytes T mémoires

Regroupe des lymphocytes généralement CD4+ , CD45RO. Ce sont des lymphocytes à vie longue et responsable de la réponse immunitaire secondaire.

2- Les populations de lymphocytes B

2-1 Les lymphocytes B quiescents

Ce sont des lymphocytes B n'ayant pas encore rencontré l'antigène spécifique. Ils ont une durée de vie très courte.

2-2 Les plasmocytes

Ce sont des cellules issues d'une transformation morphologique et fonctionnelle des lymphocytes B. Elles sont spécialisées pour la synthèse d'immunoglobulines et caractérisées par l'absence de BCR.

2-3 Les lymphocytes B mémoires

Ils ont une durée de vie plus longue que les autres lymphocytes B, mais courte comparativement aux lymphocytes T mémoires .

D- Les fonctions des lymphocytes

1- Les fonctions des lymphocytes T

Ces fonctions sont hétérogènes, mais nous les aborderons en trois parties.

1-1 La fonction cytotoxique

a- La cytotoxicité allorestreinte

Les lymphocytes T cytotoxiques ayant un TCR de type α sont capables de reconnaître spécifiquement la cible antigénique si et seulement si cette dernière est présentée associée aux molécules HLA.

L'antigène ainsi identifié sera détruit par cytolysse, par une action directe après contact ou après synthèse de facteurs lytiques.

La majorité de ces cellules sont CD8+, HNK-, mais on trouve aussi des cellules qui sont CD4+.

b- La cytotoxicité non allorestreinte

Les cellules K, NK, et LAK ont des effets cytolytiques sur des antigènes reconnus sans intervention des molécules HLA mais très souvent par des phénomènes faisant intervenir les anticorps; on parle de cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps ou ADCC (Antibody dependant cellular cytotoxicity) ou activité NK.

Certains lymphocytes CD8+, ont une "activité NK", ils sont alors CD16-, HNK. Quelque soit leur phénotype, ces cellules ont l'aspect de lymphocytes granuleux au microscope optique.

1-2 La régulation de la réponse immunitaire

C'est l'action amplificatrice ou suppressive de sous populations différentes de lymphocytes T, sur la réponse immunitaire, qu'elle soit, humorale ou cellulaire, spécifique ou non spécifique en mettant en jeu plusieurs lymphokines.

Ces deux effets permettent de maintenir l'homéostasie du système immunitaire.

a- L'effet amplificateur ou effet helper

Par la synthèse de IL2, IL5, IFN γ les lymphocytes T CD4+, jouent un rôle prépondérant dans le déroulement de la phase effectrice de toutes les cellules de l'immunité (lymphocytes, macrophages, granulocytes), **figure 4**.

b- L'effet suppresseur

C'est le fruit de l'action des lymphocytes T généralement CD8+. C'est un effet miroir de l'effet helper permettant d'éviter une réponse immunitaire exagérée ou inadéquate.

1-3 La régulation de l'hématopoïèse

Les lymphocytes T sont capables d'influencer la différenciation et la maturation de plusieurs lignées hématopoïétiques grâce à l'action des cytokines qu'ils synthétisent.

Ex: IL3 a une action sur la différenciation des cellules souches pluripotentes.

IL4 intervient dans la maturation des lymphocytes B et lors de leur différenciation en plasmocytes.

E- Le phénotypage des populations lymphocytaires

C'est la mise en évidence de marqueurs de surface généralement, ou de marqueurs intracytoplasmiques quelques fois, permettant d'identifier les différentes populations lymphocytaires pour des applications diverses.

1- Les techniques utilisées

Nous aborderons les différentes techniques en présentant pour chacune d'elles, le principe, les avantages et les inconvénients.

1-1 La technique des rosettes

1-1-1 Le principe (Bach et coll., 1974)

Les lymphocytes T de l'homme possèdent des récepteurs pour les globules rouges de mouton. Ainsi lorsqu'au moins trois érythrocytes de mouton se fixent à la surface du lymphocyte T, les rosettes formées sont faciles à identifier au microscope.

Chaque rosette correspondant à un lymphocyte T, on détermine le pourcentage de lymphocytes T par rapport aux autres cellules, en comptant deux cents (200) cellules.

1-1-2 Les avantages

- C'est la première technique de numération des lymphocytes T.
- La réalisation est facile, ne nécessite pas de gros moyens techniques et par conséquent, peu onéreuse.

1-1-3 Les inconvénients

- L'utilisation des anticorps monoclonaux a montré que le récepteur des globules

rouges de mouton est le CD2 qui est aussi retrouvé sur les cellules NK mettant ainsi à nu le caractère non spécifique de cette technique.

→ Ce test ne permet pas l'étude des sous populations de lymphocytes T.

1- 2 Les techniques d'immunofluorescence

1-2-1 Le principe

L'immunofluorescence permet de révéler un complexe antigène-anticorps par l'observation et/ou la quantification de la fluorescence donnée par un fluorochrome préalablement fixé sur :

→ L'anticorps réagissant avec l'antigène : C'est l'immunofluorescence directe .

ou

→ Une antiglobuline (anticorps spécifique de l'anticorps réagissant avec l'antigène)

C'est l'immunofluorescence indirecte .

Dans le cas du phénotypage lymphocytaire :

→ L'antigène est généralement un marqueur de surface.

→ L'anticorps est de type monoclonal ou polyclonal.

→ L'appréciation de la fluorescence se fait au microscope à fluorescence ou au cytomètre en flux.

1-2-2 Les marqueurs de surface utilisés

a- Les antigènes ou classes de différenciation (CD)

Depuis l'avènement des anticorps monoclonaux et leur identification par les ateliers internationaux, les CD sont les marqueurs les plus utilisés pour le phénotypage

lymphocytaire. Ceux qui sont couramment identifiés sont : Le CD3 , CD4 , CD8 .

b- Les immunoglobulines de surface IgS

Avant l'utilisation des anticorps monoclonaux, les IgS étaient les seuls marqueurs permettant d'identifier les lymphocytes B, (Froland et coll., 1971).

De nos jours, ils sont moins utilisés mais pas abandonnés car du fait de la possibilité d'utiliser les anticorps polyclonaux, leur mise en évidence est moins coûteuse.

c- Les autres molécules de surface

Ce sont principalement le TCR et les molécules HLA qui sont rarement utilisés en analyse de routine pour un phénotypage lymphocytaire.

1-2-3 Les anticorps utilisés

a- Les anticorps polyclonaux

a- 1 Définition

Ce sont des anticorps synthétisés par plusieurs clones de lymphocytes B et dirigés contre des épitopes différents d'une même molécule antigénique. Ils sont généralement produits par immunisation d'un animal.

a-2 Utilisation

Ils peuvent servir à l'identification des IgS après avoir été marqués par un fluorochrome mais généralement on les utilise comme révélateur (après marquage), lors des techniques indirectes d'immunomarquages.

Ils ont l'avantage d'être moins chers que les anticorps monoclonaux.

b- Les anticorps monoclonaux

b-1 Définition

Ce sont des anticorps produits au laboratoire, par un seul clone cellulaire c'est à dire par des cellules filles issues d'une même cellule mère.

Ils sont strictement spécifiques d'un épitope donné d'une molécule antigénique.

b-2 La production des anticorps monoclonaux

Il existe trois (3) techniques de production des anticorps monoclonaux:

La transfection, l'immortalisation et la fusion ou hybridation cellulaire.

Cette dernière technique, qui est la plus utilisée, consiste à fusionner des cellules myélomateuses d'un animal avec des cellules spléniques d'un autre animal préalablement immunisé avec l'antigène contre lequel l'on veut préparer l'anticorps.

Les hybridomes ainsi obtenus sont sélectionnés de sorte à produire indéfiniment, les anticorps monoclonaux désirés.

C'est en 1975 que Köhler et Milstein ont mis cette technique au point, leur valant ainsi le prix Nobel de médecine en 1984.

Mais c'est en 1979 que Goldstein G. et Kung P. Chercheurs à Ortho Diagnostic System produisent les premiers anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface des lymphocytes : Les OKT3, OKT4, OKT8 (Kung, Goldstein et coll., 1979) .

b-3 Applications des anticorps monoclonaux

Les applications des anticorps monoclonaux sont très variées.

→ Au laboratoire, ils permettent le phénotypage lymphocytaire et le diagnostic de certaines maladies par différentes techniques.

- En thérapeutique, ils sont utilisés en cancérologie, lors des greffes de moelle osseuse, et dans certaines maladies auto-immunes.

1-2-4 L'observation de la fluorescence

Elle consiste à évaluer:

- Les signaux de fluorescence émis par les cellules ayant fixé le conjugué (couple anticorps-fluorochrome). L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la densité de conjugué à la surface de la cellule. En effet les fluorochromes sont capables de donner des signaux de fluorescence en émettant une partie de l'énergie qui a servi à leur excitation.
- Les signaux de diffusion de la lumière incidente dont deux sont généralement utilisés:
 - + La diffusion à petit angle 1-15° qui dépend de la taille de la cellule.
Elle est appelée en anglais: Forward -scattered light (FSC).
 - + La diffusion à angle droit 90° qui dépend de la granularité de la cellule.
Elle est appelée en anglais: Side-scattered light (SSC).

Les deux types d'appareils utilisés, microscope à fluorescence et cytomètre en flux permettent d'observer ces deux types de signaux mais ont des principes de fonctionnement différents.

a- Le microscope à fluorescence

a-1 Le principe de fonctionnement

Après avoir identifié les cellules à typer en mode "normal", par leur taille et leur granularité, on détermine le pourcentage de ces cellules présentant une fluorescence

après excitation par des rayons ultra-violet, en mode "fluorescence".

a-2 Les avantages

Le coût est relativement faible.

- Il est possible de voir la partie de la cellule qui émet la fluorescence.
- L'analyse peut être réalisée sur des coupes cellulaires.
- L'examen des populations cellulaires faibles ($\leq 5\%$) est possible.

a-3 Les inconvénients

- La quantification de la fluorescence est globale (concerne toutes les cellules) et subjective (elle dépend de la qualification de l'opérateur).
- L'analyse est lente et fastidieuse.
- Le nombre total de cellules examinées est faible.
- L'observation des signaux de diffusion et des signaux de fluorescence est alternative
- Très souvent, on ne peut utiliser qu'un seul type de fluorochrome.

b- Le cytomètre à flux

b-1 Le principe de fonctionnement figure 5

La préparation à observer, en suspension, est entraînée par un système fluidique permettant aux cellules, de passer une à une devant un faisceau lumineux de laser. Les signaux de diffusion et de fluorescence émis par chaque cellule sont dissociés par des filtres et miroirs, puis transformés en signaux électriques par des photodétecteurs. Un système informatique permet en fonction des paramètres sélectionnés d'obtenir des histogrammes ou des cytogrammes.

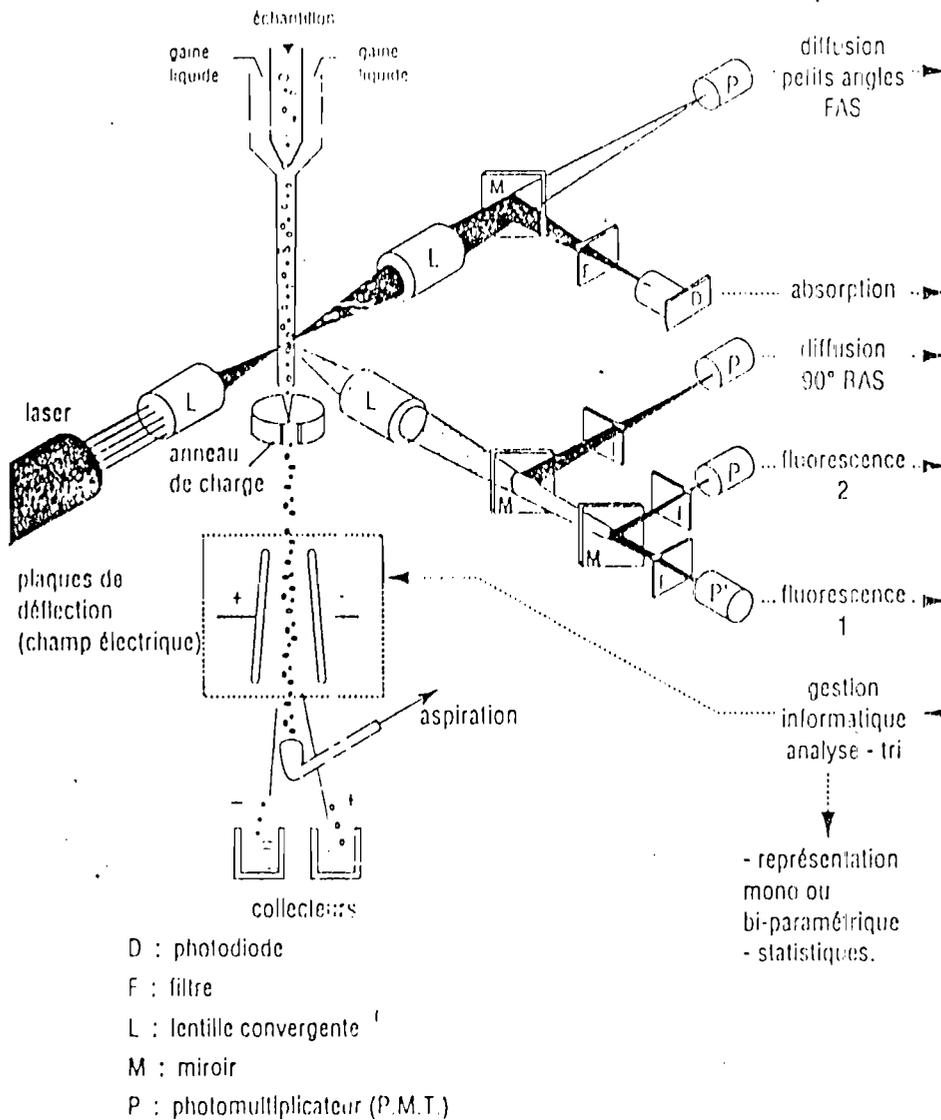


Fig 5 : Schéma du principe d'un cytofluorimètre

(Picot C., 1993)

b-2 Les avantages

→ La majorité des cytomètres permettent une analyse multiparamétrique par l'observation simultanée de quatre à cinq paramètres:

- + Deux (2) signaux de diffusion: FSC et SSC
- + Deux (2) ou trois (3) signaux de fluorescence différents.
- Il est possible d'établir une corrélation entre les différents paramètres.
- Ainsi on peut écrire un programme de telle sorte que la(es) fluorescence(s) d'une cellule ne soit(ent) prise(s) en compte que si les signaux de diffusion correspondent à une morphologie particulière, par exemple celle des lymphocytes.
- La manipulation est facile car la lecture est automatisée.
- L'analyse est rapide:
 - + Environ 500 à 4000 cellules sont visualisées par seconde.
 - + On peut travailler directement sur le sang total concernant la détermination de certains CD (Renzi P., Ginns L.C., 1987).
- Le nombre total de cellules analysées est élevé.
- La quantification des signaux de fluorescence est excellente.
- Certains cytomètres permettent des tris cellulaires car les cellules analysées sont viables.

b-3 Les inconvénients

- Le coût élevé des cytomètres et des réactifs.
- Les cellules analysées doivent impérativement être en suspension.
- Il est impossible de visualiser la partie de la cellule qui présente la fluorescence.
- On ne peut pas analyser les cellules représentant moins de 5% de la population étudiée.
- La présence de cellules anormales telles que les cellules blastiques provoque des interférences.

1-3 Les autres techniques

1-3-1 Les techniques immunoenzymatiques

Elles ont le même principe que l'immunofluorescence mais ici, à la place du fluorochrome on a une enzyme qui va après l'ajout d'un substrat approprié, donner une coloration dont l'intensité est proportionnelle au nombre de cellules portant le marqueur identifié (Lisse et coll., 1990) .

1-3-2 La technique des cytosphères (Landay et coll., 1993)

Les lymphocytes sont mis en présence de particules de latex de taille donnée liées à un anticorps monoclonal spécifique du marqueur à identifier.

Les cellules possédant ce marqueur vont se fixer à ces particules de latex pour donner au microscope une image caractéristique, semblable à l'image des rosettes.

Cette technique est simple, facile à réaliser et peu coûteuse.

2- Quelques valeurs de référence des populations lymphocytaires

Il n'existe pas de valeurs de référence données par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) pour les populations lymphocytaires.

Les valeurs retrouvées dans la littérature sont des valeurs intra ou inter-laboratoires.

Ces réalités sont liées au fait que les taux des sous populations lymphocytaires sont soumis à des variations analytiques et biologiques quelques fois importantes.

Le tableau I présente certains résultats retrouvés dans la littérature.

Population	Technique	Ly T4	Ly T8	Auteurs
Afrique de l'ouest	E.L.I.S.A.	41,8 ± 8,7 %	26,4 ± 7,6 %	Lisse et coll., 1990
Californie	Cytométrie	30 -60 %	11 - 38 %	Reichert et coll., 1991
Los angeles	Cytométrie	44,4 ± 8,2 % 890 ± 317 cellules/μl	629 ± 267 cellules/μl	Fahey et coll., 1990
Angleterre	Cytométrie	35 - 62 % 440 - 1754 cellules/μl	18 - 45 % 275 - 1498 cellules /μl	Spira et coll., 1993
Angleterre	Cytométrie	775 - 1385 cellules/μl	390 - 785 cellules/μl	Weiss et coll., 1992
Paris	Cytométrie	660 ± 250 cellules/μl	470 ± 180 cellules/μl	Martini E., Roquin H. et coll., 1988

Tb I : Intervalles de référence des populations lymphocytaires

3- Les applications du phénotypage lymphocytaire

3-1 Le bilan du système immunitaire

Les réactions immunitaires se déroulent dans les organes lymphoïdes périphériques et le sang ne contient que 2% des lymphocytes de l'organisme (Westermann et coll., 1990). Cependant, le maintien de l'homéostasie du système immunitaire est tel qu'en dehors des variations biologiques, la numération des populations lymphocytaires du sang périphérique est stable d'un sujet à un autre.

On peut ainsi apprécier les anomalies immunologiques congénitales ou acquises. Nous rapportons ici les altérations lymphocytaires retrouvées au cours de l'infection à VIH, qui est de nos jours, le principal domaine d'application du phénotypage lymphocytaire.

Se basant sur l'immunopathogénie de l'infection à VIH, (Pantaleo et coll., 1993 ; Schnittman et coll., 1991), plusieurs travaux ont montré que l'infection à VIH se caractérise par:

→ Une diminution du taux des lymphocytes CD4+. (Fahey et coll., 90).

Cela fait du CD4, un marqueur important pour :

+ Suivre l'évolution de la maladie chez les séropositifs asymptomatiques chez qui il est préconisé une numération des CD4+ chaque 6 mois selon les travaux de Pantaleo et coll., 1993.

+ Classer les sujets infectés par le VIH:

Plusieurs travaux ayant montré l'existence d'une relation entre la mortalité et le taux de CD4+ des sujets infectés par le V.I.H., le CDC (centers for disease control) a établi une classification prenant en compte le taux relatif et le taux absolu des lymphocytes CD4+ (CDC, 1992).

+ Débuter un traitement antiretroviral ou prévenir certaines affections opportunistes, (Collier A. C., 1992)

→ Une variation du cycle circadien des lymphocytes CD4+ précédant la lymphopénie, (Martini E., Muller J.Y. et coll., 1988).

→ Une augmentation des lymphocytes CD8+ suivi plus tard d'une diminution du taux absolu du fait de l'installation de la lymphopénie^T, (Constans J. et coll., 1992).

→ L'inversion de l'indice d'immunorégulation (rapport CD4+/CD8+) qui est caractéristique de l'infection à VIH pour laquelle elle constitue aussi un bon marqueur, (Fahey J. et coll., 1984).

→ Une augmentation du pourcentage des lymphocytes B, (Martinez-Maza et coll., 1987).

3-2 Le diagnostic des hémopathies malignes

La présence de certains marqueurs de surface et l'absence d'autres, assignent le clone cellulaire anormal à une lignée et à un niveau de différenciation cellulaire donné.

L'examen est réalisé sur les cellules du sang périphérique ou du suc médullaire.

3-3 Les autres applications du typage lymphocytaire

→ La recherche d'anticorps anti-HLA avant les greffes ou les transplantations.

→ L'analyse des cycles cellulaires.

II - LES VALEURS DE REFERENCE

A - LE CONCEPT DE VALEURS DE REFERENCE

Selon Sachs C. et coll., 1981 B, les valeurs de référence sont les résultats d'analyses d'un paramètre donné, obtenus à partir d'une population d'individus soigneusement décrite constituant la population de référence;

Toutes les étapes de la production de ces valeurs doivent aussi être bien décrites.

L'ancienne appellation, valeur normale, a été abandonnée à cause de l'ambiguïté du terme " normal " qui peut faire penser à la fois à : habituelle , garante de bonne santé ou répartition normale.

Tout paramètre biologique étant soumis à des variations analytiques et biologiques plus ou moins importantes, les valeurs de référence sont présentées toujours sous forme d'intervalles obtenus par des méthodes statistiques.

B - LES MOYENS D'OBTENTION DES VALEURS DE REFERENCE

L'établissement de valeurs de référence demande un protocole nécessitant une collaboration entre cliniciens, biologistes et statisticiens, (Sachs et coll., 1981 A).

Suivant les différentes possibilités à la disposition des biologistes, les valeurs de référence seront obtenues par deux méthodes :

- Le tri a posteriori des valeurs d'une population importante (> 1000 sujets).
- La mesure directe du paramètre sur une petite population bien triée a priori, (50 à 150 sujets).

Les étapes de production des valeurs de référence sont globalement communes mais leur succession dans un protocole diffère selon que l'une ou l'autre de ces méthodes est utilisée.

Nous présentons ici les étapes à suivre pour un tri a priori (méthode la plus utilisée) .

1- L'établissement de la liste des facteurs de variations biologiques

Cette liste est établie après une étude bibliographique et une analyse des données expérimentales . Le tableau II donne un aperçu des facteurs incriminés qui sont nombreux mais peuvent être repartis en trois groupes.

1-1 Les facteurs pathologiques

Ce sont toutes les maladies ayant un lien avec le paramètre étudié. Par exemple, les lymphocytes sont sujets à des variations lors des maladies infectieuses, qu'elles soient bactériennes, virales ou parasitaires, mais aussi lors de certaines hémopathies et maladies auto-immunes.

1-2 Les facteurs pharmacologiques

Ce sont les médicaments dont certains tels que les corticoïdes, affectent la numération des lymphocytes, (Bast et coll., 1983).

1-3 Les facteurs physiologiques

On distingue :

- Les facteurs de variations intra-individuelles liés au rythme biologique et à la croissance propre à chaque individu.

→ Les facteurs de variations inter-individuelles dûs à des différences génétiques, de sexe, de taille, etc....

Age	Médicaments
Aliments	Ménopause
Climat	Menstruation
Effort musculaire	Obésité
Environnement	Position debout
Grossesse	Race
Groupe sanguin	Repas
Immobilisation couchée	Rythme circadien et saisonnier
Jeûne	Sexe
Masse et surcharge pondérale	Tabac

Tb II : Les facteurs de variations biologiques des examens de laboratoire (Bretaudiere et coll.,1979)

2- Décider les critères de partition et les critères d'exclusion

Parmi les facteurs de variations biologiques, certains sont maîtrisables (ex : Age, sexe) d'autres ne le sont pas (ex : les aliments, le biorythme).

Il est important de les identifier par un questionnaire bien élaboré, pour établir des critères de choix des individus de référence.

2-1 Les critères de partition

Ils regroupent les facteurs de variations biologiques maîtrisables et les facteurs de variations analytiques. Ces critères permettent de répartir les individus choisis en sous-ensembles homogènes.

2-2 Les critères d'exclusion

Ce sont les facteurs de variations biologiques non maîtrisables car entraînant un biais inter-individuel incontournable. Ainsi, en pratique, on exclut généralement:

- Les sujets atteints d'affections pathologiques.
- Les sujets prenant un médicament ou consommant de façon excessive et régulière le tabac et/ou l'alcool.
- Les sujets qui sont dans des états physiologiques particuliers :Grossesse, stress, état post-prandial, effort physique important.
- Les sujets présentant des facteurs à risque.

Ex.: Les homosexuels ou les drogués lors d'une étude réalisée chez des séronégatifs pour l'infection à VIH.

3- La préparation des individus de référence

Selon Sachs C. et coll., 1980, les individus de référence doivent avant le prélèvement, obéir à certaines conditions:

- Etre totalement à jeûn depuis 10 à 12 heures.
- Eviter toute activité physique intense 12 heures avant le prélèvement.
- Ne pas modifier les habitudes alimentaires la veille du prélèvement.
- Ne pas fumer entre le moment du réveil et celui du prélèvement.

- S'abstenir de la consommation de café, thé, alcool, la veille au soir du prélèvement.
- Dormir au moins 7 heures pendant la nuit précédant le jour du prélèvement.
- Etre tranquilisé avant et au moment du prélèvement.

4- Les modalités de prélèvement et de conservation du spécimen

biologique

L'exactitude et la précision d'un résultat d'analyse dépendent aussi des conditions de prélèvement et de conservation des échantillons,(Sachs C. et coll., 1980).

C'est pourquoi, il faut respecter les recommandations suivantes:

- Faire le prélèvement généralement entre 7 heures et 10 heures, le matin.
- Le sujet doit observer un repos d'au moins 15 minutes, assis, avant le prélèvement.
- Le prélèvement veineux est effectué au pli du coude après désinfection à l'alcool.
- Proscrire les massages ou les contractions des muscles de l'avant-bras.
- Respecter le rapport volume de sang / quantité d'anticagulant, si ce dernier est utilisé.
- Observer les précautions de conservation et d'acheminement de l'échantillon.

Pour le typage lymphocytaire, ces facteurs ont été étudiés par Paxton et coll. en 1993 et les recommandations repertoriées dans un guide élaboré par le CDC en 1994.

5- Effectuer l'analyse par une technique d'exactitude et de

précision connue

La méthode d'analyse utilisée doit être scientifiquement reconnue et définie au point de vue exactitude et précision.

5-1 L'exactitude

L'exactitude ou justesse d'une méthode, est la qualité de l'accord existant entre la valeur mesurée et la valeur vraie d'un paramètre donné.

Elle peut être déterminée par deux procédés:

- Utilisation d'un étalon de contrôle dont la valeur vraie est connue.
- Comparaison de la méthode utilisée à une méthode de référence dont l'exactitude est reconnue.

5-2 La précision

La précision ou fidélité d'une méthode, est l'accord existant entre plusieurs valeurs mesurées d'un paramètre contenu dans un même spécimen.

Elle reflète la dispersion des résultats obtenus.

La précision est évaluée par la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode:

- La répétabilité est la précision lorsque les mesures sont effectuées simultanément sur le même échantillon, par la technique considérée et par une même personne, au cours de la même série d'analyses.
- La reproductibilité est déterminée à partir des résultats obtenus avec des fractions d'un même échantillon distribué:
 - + Au hasard dans différentes séries de dosages réalisés au sein du laboratoire (reproductibilité intra-laboratoire).
 - + A plusieurs laboratoires utilisant la même méthode d'analyse (reproductibilité inter-laboratoire).

Dans tous les cas, la précision est appréciée par l'écart-type et par le coefficient de variation. Plus ceux-ci sont faibles, plus la méthode est précise.

Notons enfin que la précision d'une méthode dépend aussi de la nature et du taux du paramètre analysé .

C - LE TRAITEMENT STATISTIQUE DES VALEUR DE REFERENCE

Les résultats issus de l'analyse des spécimen biologiques prélevés chez les individus de référence constituent les valeurs de référence.

Ces dernières doivent être traitées statistiquement en vue de déterminer leur distribution, puis les limites de l'intervalle de référence après avoir éliminé les valeurs aberrantes.

Le choix de la méthode statistique dépend de la nature de la distribution des valeurs de référence . Ainsi trois types de méthodes sont proposées, (Sachs et coll., 1983):

- Les méthodes paramétriques.
- Les méthodes non paramétriques.
- Les méthodes intuitives.

1- Les méthodes paramétriques

Elles sont utilisées lorsque la distribution des valeurs de référence suit une loi statistique telle que la loi normale (ou loi de Gauss-Laplace), directement ou après transformation logarithmique.

On détermine alors la moyenne (m) et l'écart-type (σ).

L'intervalle de référence qui renfermera 95% des valeurs de référence est défini par les limites de référence : $m \pm 1,96 \sigma$.

2- Les méthodes non paramétriques des quantiles

Elles sont appliquées lorsque la distribution des valeurs de référence ne suit aucune loi statistique. En pratique, on range les valeurs par ordre croissant, puis on élimine 5% des valeurs totales: 2,5% des valeurs basses et 2,5% des valeurs hautes.

L'intervalle de référence ainsi obtenu, contient 95% des valeurs de référence.

Les intervalles obtenus par cette méthode sont proches de ceux des méthodes paramétriques, mais sont moins larges.

3- Les méthodes intuitives

Lorsque le nombre des valeurs de référence est très faible, chaque situation est un cas particulier et il n'y a pas de règle générale.

On peut utiliser les méthodes sus-mentionnées, mais très souvent, on fait appel à l'intuition et on peut présenter les résultats de plusieurs manières :

- En communiquant les valeurs extrêmes.
- En établissant la liste complète des valeurs de référence par ordre croissant.
- En donnant la valeur centrale: moyenne ou médiane.

D- UTILISATION DES VALEURS DE REFERENCE

Selon Sachs C. et coll., 1982, l'intervalle de référence a plusieurs applications:

- Interpréter des résultats d'analyses médicales.

C'est l'application la plus connue qui consiste à comparer la valeur obtenue chez un sujet, avec l'intervalle de référence. Il est possible d'affirmer (avec un risque de 5%), l'absence ou l'existence d'une anomalie selon que la valeur du sujet se trouve

à l'intérieur ou à l'extérieur de l'intervalle de référence.

Cela permet d'établir un diagnostic, de suivre l'évolution de maladies et de prévenir certaines affections.

- Sélectionner les variables les plus caractéristiques d'une affection donnée.

- Evaluer les interférences médicamenteuses et alimentaires sur les constantes biologiques.

- Comparer plusieurs populations en analysant les différences ethniques , génétiques, socio-culturelles etc...

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAUX PERSONNELS

Après un exposé de la méthodologie utilisée pour la sélection des sujets, les examens biologiques des spécimens et l'analyse statistique des données, nous présenterons nos résultats puis nous ferons les discussions qui s'imposent.

I- LA METHODOLOGIE

A- LE CHOIX DE LA POPULATION

1- Lieu et dispositions pratiques

L'étude effectuée en janvier 1995 , a porté sur des donneurs de sang enrolés à partir:

- Du centre de transfusion sanguine d'Abidjan Treichville.
- De collecte de sang organisée par ledit centre, à la mairie du plateau et au lycée professionnel de Yopougon.

Chaque sujet, après consentement, a été soumis à un examen clinique et à un interrogatoire réalisé à partir d'un questionnaire, ANNEXE 2.

2- Les critères d'exclusion

Les donneurs présentant les caractéristiques mentionnées ci-dessous, n'ont pas été sélectionnés. Ce sont:

- Une maladie chronique connue: Diabète, hypertension etc...
- Une infection ou un état fébrile récent (délai inférieur à deux semaines).
- Une consommation excessive de tabac (plus de 10 cigarettes par jour) et/ou d'alcool (Jugée en fonction de la nature et de l'alcool et de la quantité consommée par jour).
- Une prise actuelle ou antérieurement récente de médicament(s) susceptible(s) d'influencer les constantes hématologiques.

→ Un état physiologique particulier:

+ Grossesse ou allaitement

+ état post-prandial

B- LE PRELEVEMENT DES SPECIMENS

Les sujets sélectionnés tranquilisés, en position assise, ont subi un prélèvement veineux au pli du coude, avant le don pour lequel ils sont venus.

Les prélèvements ont été effectués entre 7h30 et 10h30 tous les jours ouvrables.

Chez chaque sujet, 15ml de sang ont été recueillis dans deux tubes stériles sous vides VACUTAINER[®] :

→ 10ml dans un tube sec en vue de la réalisation de

+ L'électrophorèse et le dosage des protéines sériques.

+ Dosage du complément.

→ 5ml dans un tube contenant de l'EDTA (Ethylène diamine tétracétique) pour :

+ L'hémogramme

+ Le typage lymphocytaire

+ L'électrophorèse de l'hémoglobine

Par ailleurs des prélèvements ont été réalisés par le centre de transfusion, comme il se doit chez tous les donneurs après le don, pour la réalisation du groupage sanguin et des tests sérologiques de l'infection à VIH.

C- LES METHODES D'ANALYSE BIOLOGIQUE DES SPECIMENS

Les spécimens biologiques récoltés chez chaque sujet, ont fait l'objet d'analyse dans les laboratoires suivants :

- Le laboratoire du PROJET RETRO-CI sise au CHU de Treichville , pour l'hémogramme et le typage lymphocytaire.
- Le laboratoire d'immuno-hématologie du CHU de Cocody, pour l'électrophorèse des protéines sériques et de l'hémoglobine, le dosage des protides et du complément.
- Le laboratoire du centre de transfusion pour le groupage sanguin et la sérologie rétrovirale.

1- L'hémogramme

Le COULTER JT2^R de COULTRONICS a permis d'effectuer la numération des cellules sanguines, la formule leucocytaire approchée, et d'évaluer le taux d'hémoglobine et des constantes érythrocytaires.

2- La détermination des populations lymphocytaires

Le typage lymphocytaire a été réalisé par une technique d'immunofluorescence directe à double coloration sur sang total lysé, avec visualisation de la fluorescence par cytométrie en flux.

2-1 Principe (voir page 30)

2-2 Matériels

- Un cytomètre en flux FACScan^R de BECTON DICKINSON, figure 6

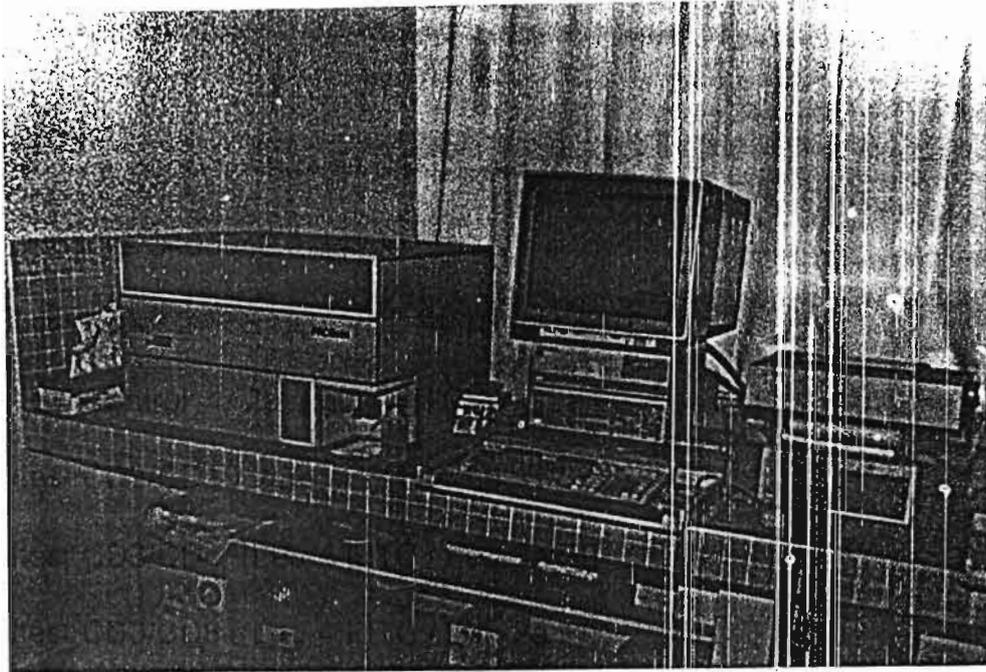


Fig 6 : Dispositif de lecture par cytométrie en flux

→ Un ordinateur HEWLET PACKARD avec le logiciel SIMULSET

→ Des anticorps monoclonaux de BECTON DICKINSON:

Catalogues 3400040 à 3400044

+ Simultest LeucoGATE CD45/CD14 (HLe-1 FITC / Leu-M3 PE)

+ Simultest Control 1/ 2a (IgG1 FITC / IgG2a PE)

+ Simultest CD3/CD19 (Leu-4 FITC / Leu-12 PE)

+ Simultest CD3/CD4 (Leu-4 FITC / Leu-3a PE)

+ Simultest CD3/CD8 (Leu-4 FITC / Leu-2a PE)

Chaque réactif renferme un couple d'anticorps monoclonaux de souris liés à des fluorochromes différents. Les deux fluorochromes utilisés sont le FITC (Isothiocyanate de fluoresceïne) et la PE (Phycoérythrine). Excités par le rayon laser (488 nm), ils donnent

une fluorescence verte (515 nm) pour le FITC et une fluorescence rouge-orangée (580 nm) pour la PE.

- La solution de lyse des globules rouges: FACS Lysing Solution de BECTON D.
- Une solution tamponnée de phosphate: PBS (phosphate buffer solution).
- Une solution de paraformaldéhyde à 1%.
- De l'eau distillée.
- Une centrifugeuse.
- Un Vortex.
- Un réfrigérateur.
- Une pompe à vide.
- Des micropipettes avec embouts adaptés.
- Des tubes en plastique de 5 ml, propres.

2-3 Le mode opératoire

a- Le marquage des cellules

- Identifier 5 tubes pour chaque spécimen, soit A,B,C,D,E.
- Suivre les indications du **tableau III** ci-dessous :

Tubes	A	B	C	D	E
Réactifs	LeucoGATE	Control	CD3/CD19	CD3/CD4	CD3/CD8
	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
Sang total	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl

Tb III : Répartition des réactifs et du spécimen biologique

- Agiter les tubes au vortex à faible vitesse pendant quelques secondes.
- Incuber au réfrigérateur pendant 5 minutes.
- Ajouter 2ml de la solution de lyse à chaque tube.
- Agiter lentement au vortex et incuber pendant 10 minutes à la température ambiante
- Centrifuger les tubes à 2500 tours/minutes pendant 5 minutes.
- Aspirer le surnageant en laissant environ 50µl dans chaque tube.
- Agiter au vortex pour remettre le culot en suspension puis ajouter 2ml de PBS.
- Agiter puis centrifuger comme précédemment.
- Aspirer le surnageant en laissant environ 50µl sans troubler le culot.
- Agiter au vortex pour resuspendre le culot.
- Ajouter 500µl de paraformaldéhyde.
- Agiter au vortex et s'assurer qu'il n'y a pas de culot.

b- La procédure de lecture au cytomètre en flux

Après la mise en marche du FACScan et de l'ordinateur contenant le logiciel SIMULSET, on procède comme suit:

b-1 Etablissement de la fenêtre lymphocytaire (GATE)

C'est une sélection qualitative et quantitative des lymphocytes qui réalisée en utilisant le tube A (tube LeucoGATE CD45/CD14).

Le cytomètre fait une analyse multiparamétrique en se basant sur le fait que les cellules sanguines ont des caractéristiques différentes de diffusion (FSC et SSC) et de fluorescence (par rapport à leur nombre en CD45 et CD14), tableau IV.

	FSC (taille)	SSC (granularité)	Vert (CD45)	Rouge-orangé (CD14)
Lymphocytes (L)	+	+	+++	-
Granulocytes (G)	+++	+++	+	-
Monocytes (M)	++	++	++	+++
Débris (D)	±	-	-	-

Tb IV : Les caractères de diffusion et de fluorescence des cellules sanguines

(+++ Elevé ++ Moyen +Faible ± Très faible - Négatif)

Les débris renferment les plaquettes et les globules rouges résiduels.

Les résultats de ces analyses sont transformés par le logiciel SIMULSET en cytogramme où chaque point représente les coordonnées de chaque cellule en fonction de deux paramètres.

Pour simplifier l'analyse, on peut diviser le cytogramme en 4 cadrans **tableau V**:

C 1	C 2
C 3	C 4

Tb V: Les différentes parties d'un cytogramme

Sur le cytogramme, le logiciel représente:

- + Les lymphocytes en vert.
- + Les granulocytes en bleu.
- + Les monocytes en rouge.
- + Les débris en mauve.

Ainsi avec le tube A, le cytomètre couplé au logiciel réalise automatiquement les déterminations suivantes dans l'ordre indiqué, tableau VI.

	Étape1	Étape2	Étape 3 (Fig 7a)	Étape 4 (Fig 7b)	Étape 5
X	SSC	FSC	FSC	CD45	CD45
Y	CD14	CD45	SSC	CD14	CD14

Tb VI : Les différentes étapes de la réalisation de la fenêtre lymphocytaire

Les étapes 1 et 2 sont des stades préliminaires à la sélection de la fenêtre qui est effectuée à l'étape 3. Cette fenêtre peut être ajustée par l'opérateur en fonction des résultats de l'étape 4 qui permet d'évaluer la pureté (ou le pourcentage: P) de la fenêtre en lymphocytes.

$$P = L / N \text{ doit être égal à } 95 \pm 5 \% \quad N = L + M + G + D$$

L'étape 5 est réalisée avec les mêmes paramètres que l'étape 4 mais concerne toutes les cellules analysées et non pas seulement celles de la fenêtre.

Soit X le pourcentage de lymphocytes obtenu.

Le rapport P/X représente le taux de lymphocytes de l'échantillon contenu dans la fenêtre qui doit être supérieur à 95%.

Les analyses ultérieures seront réalisées chaque fois après sélection de la fenêtre.

b-2 Le contrôle des fluorescences non spécifiques

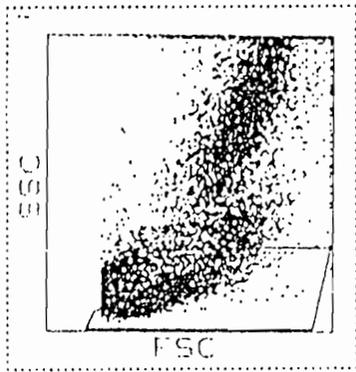
Réalisé avec le tube B où les cellules ont été mises en contact avec un couple d'anticorps monoclonaux marqués, de même isotype que les anticorps monoclonaux utilisés mais non spécifiques des cellules sanguines et pouvant se fixer sur les récepteurs des immunoglobulines de certaines cellules humaines.

Après la sélection de la fenêtre lymphocytaire, l'analyse biparamétrique est réalisée.

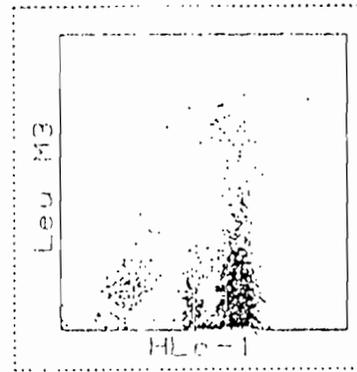
Un signal d'erreur est émis si la fixation non spécifique de chaque anticorps monoclonal est supérieure à 5% au niveau des cadrans C1, C2, C3, figure 7c.

b-3 L'analyse des marqueurs spécifiques du typage

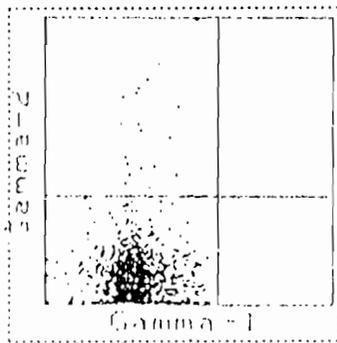
Avec les tubes C, D, E, après une sélection de la fenêtre lymphocytaire, la répartition des lymphocytes en fonction de leur affinité pour les deux marqueurs est visualisée sur un cytogramme. Le pourcentage de chaque cadran est établi par rapport à l'ensemble des cellules de la fenêtre, figures 7d-7e-7f.



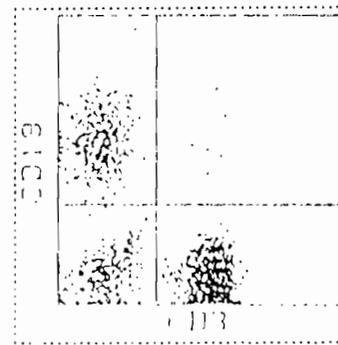
7a : SSC Vs FSC



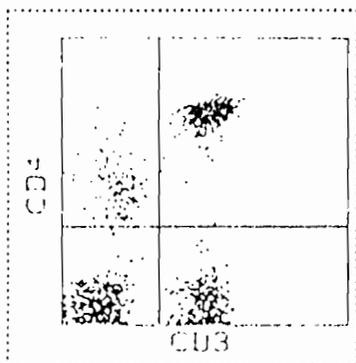
7b : CD14 Vs CD45



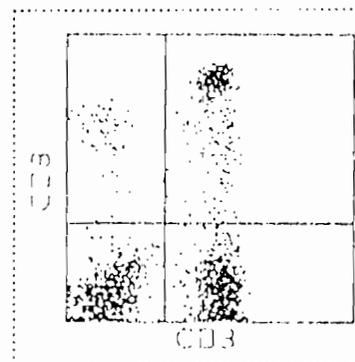
7c : Contrôle



7d : CD19 Vs CD3



7e : CD4 Vs CD3



7f : CD8 Vs CD3

Fig 7 : Cytogrammes d'analyse multiparamétrique d'un typage lymphocytaire

2-3 L'expression des résultats

Les pourcentages des populations sont corrigés pour être exprimés en fonction seulement des lymphocytes contenus dans la fenêtre.

Ainsi le pourcentage corrigé des lymphocytes T4 (%LyT4) est:

$$\%LyT4 = \frac{\%LyCD3+CD4+}{P}$$

où %LyCD3+CD4+ est le pourcentage de lymphocytes T4 donné par le cytogramme et

P le pourcentage de lymphocytes dans la fenêtre lymphocytaire

La valeur absolue des lymphocytes T4 (LyT4) est:

$$LyT4 = (\%Ly T4) \times (\%Ly) \times GB \times 1/10000 \text{ cellules/mm}^3$$

Avec %Ly représentant le pourcentage de lymphocyte et GB le nombre de globules blancs par μl de sang, obtenus par l' hémogramme réalisé avec le COULTER JT2^R.

2-4 La validation des résultats

Les résultats obtenus ne seront validés que si:

- Il n'y a pas de signal d'erreur.
- La différence des N ($N = L + M + G + D$) tube à tube en dehors du tube A est inférieure à 500 cellules.
- %LyCD3+ = (%LyCD4+) + (%LyCD8+) \pm (5-10%)
- La différence de %LyCD3+ tube à tube entre les tubes C, D, E est inférieure à 5%
- Le pourcentage en lymphocyte déterminé par le cytomètre ne s'écarte pas de plus de 10% de celui obtenu par le compteur COULTER^R, (%Ly = $X \pm 10\%$)

3- L'électrophorèse des protéines sériques et de l'hémoglobine

Sur support d'acétate de cellulose et à pH alcalin, les fractions protéiques d'une part et les fractions hémoglobiniques d'autre part, sont séparées par une migration électrophorétique de 15 minutes à 180 Volts pour les protéines et 450 Volts pour l'hémoglobine.

Les fractions obtenues sont après coloration au rouge ponceau et transparence de la plaque, quantifiées au densitomètre PROCESS 24^R de HELENA.

Les spécimens présentant une hémoglobine anormale ont fait l'objet d'un test de falciformation et d'une électrophorèse à pH acide, en vue de confirmer le résultat.

4- Dosage du CH50

C'est le complément hémolytique 50%, qui correspond à la quantité de sérum frais capable de lyser 50% des globules rouges de mouton sensibilisés par du sérum de lapin anti-globule rouge de mouton, dans des conditions standardisées de température, de volume, de temps d'incubation et de nombre de globules rouges de mouton.

Nous avons utilisé une technique d'immuno-hémolyse standardisée par le laboratoire d'immuno-hématologie du CHU de Cocody.

5- La sérologie rétrovirale

Elle a été réalisée par une technique immuno-enzymatique utilisant les réactifs VIRONOSTIKA^R de ORGANON TECHNIKA.

6- Le dosage des protides totaux

Nous avons utilisé la méthode de Biuret modifiée qui est basée sur le fait que les liaisons

peptidiques des protéines en présence d'ions cuivriques en excès et en milieu alcalin donnent un complexe dont la coloration bleu-violet est appréciée par spectrophotométrie à 546 nm.

7- Le groupage sanguin

Il a été déterminé pour les systèmes ABO et Rhésus par des techniques d'agglutination sur plaques.

Le groupage ABO a été réalisé par une épreuve globulaire de Beth-Vincent utilisant des réactifs d'ORGANON TECHNIKA, et une épreuve sérique de Simonin utilisant des globules rouges tests A et B préparés par le laboratoire du Centre de transfusion.

Le Rhésus standard a été déterminé avec des anticorps monoclonaux anti-D.

D- LA METHODOLOGIE D'ANALYSE DES DONNEES

Les résultats des différents paramètres biologiques et du questionnaire ont été analysés par les logiciels suivants:

- SPSS, (Statistical package for the social sciences), pour déterminer la nature de la distribution des paramètres biologiques.
- EPI-INFO version 6 pour l'analyse statistique.
- WordPerfect 6.0a pour le traitement de texte.
- Havard Graphic 3 pour l'interprétation graphique des résultats.

Les intervalles de référence (IR) des populations lymphocytaires ont été calculés au risque $\alpha = 5\%$ par la méthode paramétrique de Gauss et par la méthode non paramétrique des quantiles afin de comparer nos résultats avec ceux de la littérature qui sont exprimés

par l'une des deux méthodes, selon les Auteurs.

L'étude de la différence des moyennes de différents sous-ensembles de notre population établie à partir de certains critères de partition a été réalisée:

→ Soit par le test ANOVA pour les paramètres dont la distribution est normale.

Ce test équivaut à un test T de Student lorsque le nombre de sous-ensemble est égal à deux.

→ Soit par le test de Kruskal-Wallis quand la distribution du paramètre n'est pas normale.

Ce test est l'équivalent du test de Mann-Whitney ou du test de Wilcoxon pour deux groupes ou plus.

Le test d'homogénéité des variances de Bartlett permet de décider du choix d'un des deux tests. Dans tous les cas, on affirmera une différence inter-groupes si au risque $\alpha=5\%$, la valeur de P (probabilité) est inférieure à 0,05 (Dean et coll., 1990).

L'étude de la relation existant entre deux paramètres quantitatifs, a été réalisée en interprétant la probabilité d'indépendance (P) par rapport au seuil de 0,05 et en visualisant le diagramme de dispersion.

II- LES RESULTATS

L'étude réalisée en Janvier 1995, a porté sur une population de 114 sujets dont les caractéristiques démographiques sont données par le **tableau VII**.

Après une présentation des résultats globaux des populations leucocytaires et des populations lymphocytaires de tous les sujets de référence, nous étudierons l'influence de différents facteurs, utilisés comme critères de partition, sur les populations lymphocytaires.

A- Les résultats globaux

Ces résultats sont représentés dans les **tableaux VIII et IX** pour les populations leucocytaires et les **tableaux X et XI** pour les populations lymphocytaires.

La distribution des taux des populations lymphocytaires dans la population de référence étudiée suit la loi normale, **ANNEXE 4**; cependant nous présentons nos résultats par les deux méthodes usuelles: la méthode paramétrique de Gauss et la méthode non paramétrique des quantiles.

Ces résultats montrent qu'au niveau des populations leucocytaires, il y a pratiquement autant de granulocytes que de lymphocytes chez l'adulte Ivoirien normal, **figure 8**.

Au niveau des populations lymphocytaires, on note d'une part une prédominance de la population lymphocytaire T qui représente 69% des lymphocytes totaux, et d'autre part, que les lymphocytes non-T non-B ont un taux plus élevé que les lymphocytes B.

La sous population lymphocytaire T4 est majoritaire et représente en moyenne presque le double du nombre de la sous population lymphocytaire T8, avec un Indice immuno-régulation moyen de 1,83.

Critères démographiques		N (%)
Nationalité Ivoirienne		114 (100%)
Race noire		114 (100%)
Ethnie	Akan	62 (54,4%)
	Krou	16 (14%)
	Lagunaire	15 (13,2%)
	Mande-Fu	3 (2,6%)
	Voltaïque	18 (15,8%)
Sexe	feminin	42 (36,8%)
	masculin	72 (63,2%)
Age	20-29 ans	79 (69,3%)
	30-39 ans	29 (25,4%)
	40-45 ans	6 (5,3%)

Tb VII: Caractéristiques démographiques de la population d'étude

Pourcentage de leucocytes	Méthode paramétrique de Gauss			Minimum-Maximum	Méthode non paramétrique des quantiles	
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence		Médiane	Intervalle de référence
Lymphocytes	44	9	27-62	21-68	45	38-50
Granulocytes	47	10	28-66	24-71	46	41-53
Monocytes	9	3	3-15	1-17	9	7-11

Tb VIII : Valeurs relatives des populations leucocytaires de l'adulte Ivoirien

présumé sain, n=114, Janvier 1995

	Méthode paramétrique de Gauss			Méthode non paramétrique des quantiles		
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence	Minimum-Maximum	Médiane	Intervalle de référence
Leucocytes /mm ³	5544	1590	2428-8660	2700-12000	5150	4400-6300
Lymphocytes /mm ³	2408	671	1093-3723	953-3982	2159	1927-2821
Granulocytes /mm ³	2648	1195	306-4990	868-7946	2405	1896-3050
Monocytes /mm ³	488	191	114-862	43-1094	473	372-590

Tb IX : Valeurs absolues du taux et de la formule leucocytaires sanguins chez 114 adultes Ivoiriens donneurs de sang, Janvier 1995.

Populations lymphocytaires	Méthode paramétrique de Gauss			Minimum-Maximum	Méthode non paramétrique des quantiles	
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence		Médiane	Intervalle de référence
Ly B (CD19+)	13,6	3,56	6,7-20,6	6-23	14	11-23
Ly T (CD3+)	69,3	6,91	55,7-82,8	43-81	70	65-81
Ly NBNT (CD3-CD19-)	17,1	6,73	3,9-30,3	6-48	17	12-20
Ly T4 (CD3+CD4+)	41,6	6,54	28,8-54,4	27-56	41	37-46
Ly T8 (CD3+CD8+)	24,5	6,02	12,7-36,3	12-41	23,5	20-29
Ly T4 LyT8	1,83	0,6	0,65-3,01	0,73-3,79	1,82	1,37-2,16

Tb X : Valeurs relatives des populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien normal, n=114, Janvier 1995.

Populations lymphocytaires cellules /mm ³	Méthode paramétrique de Gauss			Minimum-Maximum	Méthode non paramétrique des quantiles	
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence		Médiane	Intervalle de référence
LyB (CD19+)	328	124	85-571	73-760	309	238-390
LyT (CD3+)	1672	509	674-2670	705-3185	1540	1319-2028
Ly NTNB (CD3-CD19-)	408	195	26-790	105-1120	367	267-487
Ly T4 (CD3+CD4+)	1002	326	363-1641	448-2150	926	788-1162
Ly T8 (CD3+ CD8+)	596	242	122-1070	229-1274	541	423-699

Tb XI : Valeurs absolues des populations lymphocytaires de
l'adulte Ivoirien présumé sain, n = 114, Janvier 1995

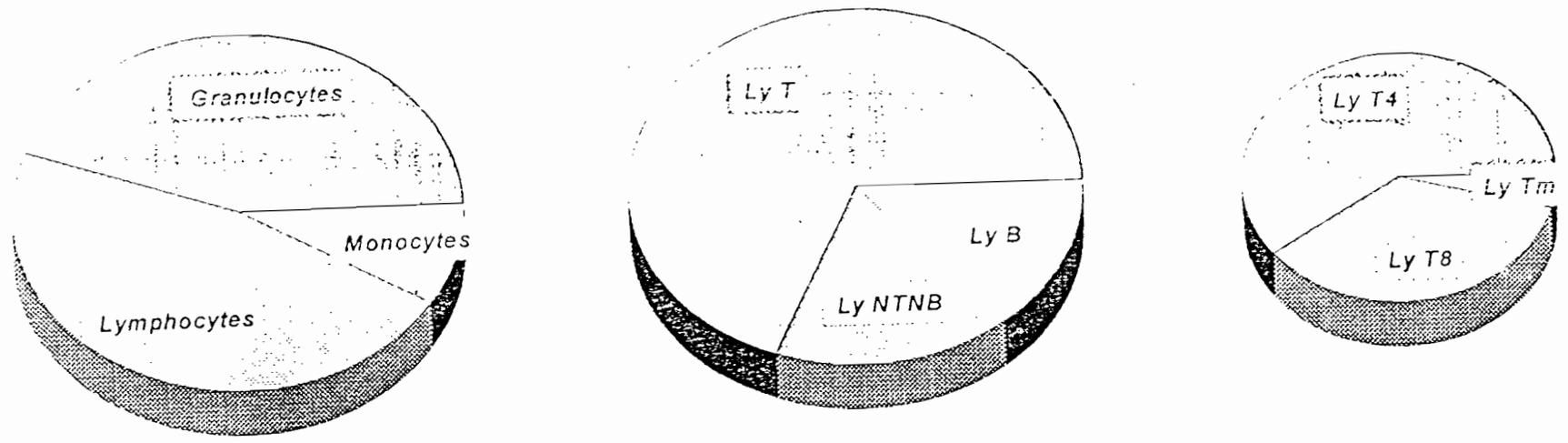


Fig 8 : Les populations leucocytaires et les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien présumé sain, n=114.

B- Influence du sexe sur les populations lymphocytaires

Les tableaux XII et XIII présentent la formule leucocytaire et les populations lymphocytaires en fonction du sexe.

Les résultats obtenus montrent une différence des valeurs absolues des sous populations lymphocytaires T4 et T8 entre les 2 sexes. La valeur absolue de ces sous populations lymphocytaires est issue de 3 paramètres (valeur relative, taux des lymphocytes totaux et taux des leucocytes) dont l'analyse met en évidence une différence significative au niveau du taux global des leucocytes entre les hommes (5161) et les femmes (6202). Les valeurs relatives des sous populations lymphocytaires T4 ou T8 et le taux de lymphocytes totaux, ne présentent aucune différence en fonction du sexe.

On note une différence au niveau des populations lymphocytaires T et non-T non-B en fonction du sexe. Quant aux lymphocytes B, les valeurs obtenues ne sont pas influencées par le sexe.

Signalons enfin que les femmes ont moins de monocytes que les hommes: 447 contre 513 monocytes / mm³ de sang périphérique.

	hommes (n=72)			femmes (n=42)			P
	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence	
Leucocytes	5161	1307	2600-7723	6202	1818	2638-9765	< 0,001
Lymphocytes							
V.R.	44	7,8	28-59	45	10,5	21-66	0,52
V.A.	2238	620	1023-3453	2701	662	1403-4000	< 0,001
Granulocytes							
V.R.	46	8,8	29-63	48	11	26-69	0,53
V.A.	2410	890	666-4154	3054	1515	24-6084	0,008
Monocytes							
V.R.	10	3	4-16	7	2,2	3-11,5	< 0,001
V.A.	513	189	143-833	447	188	79-815	0,07

Tb XII : Taux et formule leucocytaires de l'adulte Ivoirien en fonction du sexe

V.R. : Valeurs relatives V.A. : Valeurs absolues exprimées en Cellules/mm³

P : Probabilité d'indépendance des moyennes

		hommes (n = 72)			femmes (n = 42)			
Populations lymphocytaires		Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence	P
Ly B	V.R.	13,5	3,7	6,2-20,8	13,8	3,4	7,1-20,5	0,7
	V.A.	303	121	66-540	371	119	137-604	0,005
Ly T	V.R.	67,8	7,3	53,5-82,1	71,8	5,4	61,2-82,4	0,006
	V.A.	1515	437	658-2371	1943	514	936-2950	< 0,0001
Ly NTNB	V.R.	18,7	7,2	4,6-32,8	14,4	4,83	4,9-23,9	0,001
	V.A.	421	211	7-835	385	163	66-704	0,66
Ly T4	V.R.	40,9	6,6	27,9-53,8	42,8	6,3	30,5-55,2	0,13
	V.A.	906	246	424-1388	1167	380	422-1912	< 0,001
Ly T8	V.R.	24	5,9	12,4-35,6	25,4	6,1	13,4-37,4	0,25
	V.A.	545	233	88-1002	684	235	223-1145	0,003
Ly T4 / Ly T8		1,83	0,6	0,65-3,01	1,82	0,64	0,57-3,1	0,95

Tb XIII : Les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien en fonction du sexe

V.R. : Valeurs relatives (en pourcentage) V.A. : Valeurs absolues (en cellules/mm³)

P : Probabilité d'indépendance des moyennes

C- Influence de l'âge sur les populations lymphocytaires

Près de 70% des sujets de référence, ont moins de 30 ans et la moyenne d'âge est de 27 ans ; notre population de référence est donc constituée essentiellement d'adultes jeunes. En regroupant ces sujets en 2 classes d'âge, on note qu'il n'y a pas de différence au niveau des sous populations lymphocytaires, **tableau XIV**.

Cependant, il existe une relation décroissante ($R = - 0,25$ et $P = 0.008$) entre l'âge et le taux de lymphocytes T montrant que le taux de lymphocytes T totaux diminue quand l'âge augmente, **tableau XV**.

D- Influence du poids sur les populations lymphocytaires

Les résultats du **tableau XV** montrent qu'il n'y a aucune relation entre le taux des populations lymphocytaires et le poids.

E- Les populations lymphocytaires en fonction du groupe

ethnique

Les sujets enrôlés ont été repartis en 5 groupes ethniques tenant compte des habitudes socio-culturelles et de la situation géographique sur le territoire Ivoirien, **ANNEXE 3**.

Les résultats regroupés dans le **tableau XVI** montrent que le taux des sous populations lymphocytaires ne dépend pas du groupe ethnique des sujets de référence.

Populations lymphocytaires cellules/ μ l (%)	Age < 30 ans	Age \geq 29 ans	P
Ly T4	909 (46,7)	930 (41,5)	0,95 (0,82)
Ly T8	594 (25)	597 (23,3)	0,95 (0,53)
Ly T	1668 (70,1)	1630 (67,2)	0,88 (0,22)
Ly NTNB	382 (16,3)	465 (19)	0,12 (0,33)
Ly B	329 (13,6)	328 (13,8)	0,91 (0,18)

**Tb XIV : Les populations lymphocytaires de l'Ivoirien en
fonction de l'âge**

P : Probabilité d'indépendance des moyennes des populations lymphocytaires

	AGE		POIDS	
	R	P	R	P
Ly T4	- 0,06	> 0,5	0,05	> 0,5
Ly T8	- 0,16	0,09	0,06	> 0,5
Ly T	- 0,25	0,008	0,08	0,41
Ly B	0,12	0,21	0,09	0,36
Ly NTNB	0,19	0,05	- 0,13	0,17

TbXIV: Corrélations populations lymphocytaires - âge, et populations lymphocytaires -poids chez l'adulte Ivoirien normal (n=114)

R : Coefficient de corrélation P : Probabilité d'inexistence d'une relation

	AKAN	KROU	LAGUNAIRE	MANDE-FU	VOLTAIQUE	
Populations lymphocytaires (Cellules /mm ³)	n = 62 (54,4%)	n = 16 (14%)	n = 15 (13,2%)	n = 3 (2,6%)	n = 18 (15,8%)	P
Ly T4	994	1004	1022	989	1015	0,99
Ly T8	606	611	577	548	572	0,96
Ly T	1674	1706	1658	1643	1656	0,99
Ly B	328	370	279	288	340	0,33
Ly NTN	419	389	386	349	412	0,47

Tb XVI: Les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien
en fonction du groupe ethnique

P : Probabilité d'indépendance des moyennes

F- Influence du cycle menstruel et de la prise de pilules contraceptives

Sur les 42 femmes de notre population de référence, seulement 5 soit 12% utilisent des pilules contraceptives. Ce groupe présente une sous population T4 plus élevée que celle des autres femmes ; 47,6% contre 42% ($P = 0,034$).

D'autre part, tenant compte de la période du cycle menstruel (nombre de jours existant entre la date du début des dernières menstrues et le jour du prélèvement), nous avons recherché l'existence d'une relation avec le taux des populations leucocytaires et lymphocytaires. L'analyse montre qu'en dehors des leucocytes totaux, les autres paramètres ne sont pas influencés par le cycle menstruel.

En effet il existe une relation croissante ($R = 0,35$) entre le taux de globules blancs et le nombre de jours du cycle menstruel, ($P = 0,03$).

G- Effet du sport

Dans la population étudiée, près de 50% des sujets pratiquent du sport ($n = 56$).

L'analyse des moyennes des populations lymphocytaires montre qu'il n'y a pas de différence entre les sujets sportifs et ceux qui ne pratiquent aucun sport.

De plus il n'existe aucune corrélation significative entre la fréquence hebdomadaire de sport et les taux des populations lymphocytaires.

H- Relation entre les populations lymphocytaires et d'autres paramètres biologiques

Nous avons évalué d'autres paramètres biologiques en vue de déterminer une relation entre leur taux et celui des populations lymphocytaires.

Nous les aborderons en distinguant les paramètres qualitatifs des quantitatifs.

1- Influence des paramètres qualitatifs

Par rapport au groupe sanguin, nous n'avons trouvé aucune différence au niveau des taux des populations lymphocytaires, qu'il s'agisse du système ABO ou du système Rhésus, **tableau XVII.**

Notons que 51% des sujets de la population étudiée sont du groupe O et 94% ont un Rhésus standard positif.

Nous avons aussi comparé les taux des populations lymphocytaires des sujets ayant un profil d'électrophorèse de l'hémoglobine normal (n = 103, soit 90,4%) à celui des sujets porteurs d'une hémoglobine anormale (n = 11, soit 9,6%).

Les résultats ne montrent pas de différence entre ces deux groupes. Signalons que parmi les sujets porteurs d'hémoglobine anormale, 9 sont AC, les deux autres sont SC et SFA2.

Populations lymphocytaires (cellules /mm ³)	SYSTEME ABO				P	SYSTEME RHESUS		P
	A (n = 22)	AB (n = 4)	B (n = 30)	O (n = 58)		D (n = 107)	d (n = 7)	
Ly B	311	415	310	339	0,33	330	306	0,63
Ly NTNB	384	370	386	430	0,67	407	426	0,8
Ly T	1557	1894	1555	1762	0,15	1666	1764	0,63
Ly T4	916	1167	974	1038	0,32	1000	1023	0,86
Ly T8	569	657	539	631	0,34	593	645	0,6

Tb XVII: Relation entre le groupe sanguin et les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien présumé sain

D: Rhésus standard positif d: Rhésus standard négatif

P: Probabilité d'indépendance des moyennes des populations lymphocytaires

2 - Influence des paramètres biologiques quantitatifs

L' étude de la corrélation existant entre les taux des populations lymphocytaires et 3 paramètres biologiques (hémoglobine, protidémie, complément) donne les résultats figurant dans le **tableau XVIII**.

86% des sujets (n = 98) ont un taux d'hémoglobine supérieur à 11 g/dl et 4% (n = 5) un taux inférieur à 10 g/dl. Ainsi en établissant 3 groupes (taux <10, 10-11, >11), l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence au niveau des populations lymphocytaires. **tableau XIX**. Cependant on observe une relation entre la sous population lymphocytaire T8 et le taux sanguin d'hémoglobine, (R = 0,22 et P = 0,02) **tableau XVIII**.

Au niveau de la protidémie, 95% des sujets de référence ont un taux compris entre 65 et 90 g/l. Seulement 3,5% des sujets (n=4) ont présenté un pourcentage de gammaglobuline supérieur à 34%. Il n'y a aucune corrélation entre la protidémie et les populations lymphocytaires.

Tous nos sujets ont présenté un taux de Ch50 (complément hémolytique 50%) compris entre 150 et 400 UCh50. Nous avons aussi observé l'absence de relation entre le taux de Ch50 et les valeurs des sous populations lymphocytaires.

	Hémoglobine		Protidémie		CH50	
	R	P	R	P	R	P
Ly T4	- 0,17	0,07	0,05	> 0,5	0,16	0,09
Ly T8	0,22	0,02	0,07	> 0,5	- 0,06	> 0,5
Ly T	0,05	> 0,5	0,07	> 0,5	0,1	0,32
Ly B	- 0,12	0,1	-0,1	0,2	0,04	> 0,5
Ly NTNB	0,01	> 0,5	- 0,02	> 0,5	- 0,12	0,2

Tb XVIII:Relation entre les populations lymphocytaires et d'autres paramètres biologiques

R : Coefficient de corrélation

P : Probabilité de corrélation

Populations Lymphocytaires		Taux d'Hémoglobine			P
		< 10g/dl n = 5	10-11g/dl n = 11	> 11g/dl n = 98	
Ly B	V.R.	14,6	13,2	13,6	0,66
	V.A.	292	335	330	0,72
Ly NTNB	V.R.	17,4	19,7	16,8	0,79
	V.A.	364	467	403	0,90
Ly T	V.R.	68,2	67,5	69,5	0,84
	V.A.	1359	1684	1685	0,51
Ly T8	V.R.	21,4	24,2	24,7	0,52
	V.A.	425	600	603	0,29
Ly T4	V.R.	44,2	41,7	41,5	0,60
	V.A.	888	1058	1860	0,68

**Tb XIX: Les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien en
fonction du taux d'hémoglobine**

V.R.: Valeurs Relatives V.A.: Valeurs Absolues (en cellules/ μ l)

P: Probabilité d'indépendance des moyennes

III- LA DISCUSSION

Nos résultats globaux sur les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien, sont en accord avec ceux de Lisse et coll., 1990 qui ont travaillé sur des populations africaines en utilisant une technique immunoenzymatique.

Nicholson et coll., 1994 ont montré que les techniques de cytométrie, d'immunoenzymologie, de microbilles et la technique des cytosphères donnent des résultats de phénotypage lymphocytaire superposables.

C'est pourquoi nous pouvons proposer l'utilisation des résultats de notre étude pour l'interprétation des résultats de typage lymphocytaire de l'adulte l'ivoirien même en utilisant les techniques de cytosphères, de microbilles, d'ELISA qui ont l'avantage d'être moins onéreuses que la cytométrie, donc plus accessibles à nos pays.

Notons que nos résultats concernant les lymphocytes T totaux (69%) sont en désaccord avec ceux de Pene et coll., 1978, qui en travaillant sur des adultes Ivoiriens par la technique des rosettes ont obtenus 31,75%.

Nos résultats montrent, une similitude au niveau des valeurs relatives des populations lymphocytaires comparativement à ceux de Reichert et coll., 1991 ; Fahey et coll., 1990 qui ont travaillé sur des populations Américaines.

Par rapport à la population Européenne, les travaux de Spira et coll., 1993 donnent un pourcentage de Ly T4 superposable au nôtre, mais un pourcentage de Ly T8 plus élevé: 32,5% contre 23,5% dans notre population.

Quant aux valeurs absolues des populations lymphocytaires de notre étude, elles sont superposables avec celles de certains travaux Américains et Européens (Landay et coll., 1993 ; Weiss et coll., 1992) et ne le sont pas avec d'autres (Fahey et coll., 1990; Martini E., Roquin H. et coll., 1988). Cette observation pourrait résulter d'une différence au niveau

du taux de leucocytes et/ou du taux de lymphocytes totaux qui peut avoir deux causes:

+ Une cause physiologique qui est liée à la race.

En effet nos résultats comparés à ceux de Dacie et coll., 1984 ; Giorgi et coll., 1992 montrent que l'adulte Ivoirien a plus de lymphocytes totaux mais moins de leucocytes que les populations Américaines et Européennes qui donnent un taux de lymphocytes totaux de 1500 à 3000 cellules/ μ l et un taux de leucocytes allant de 4000 à 10000 cellules/ μ l.

+ Une cause analytique qui explique la différence des valeurs absolues des populations lymphocytaires trouvées à l'intérieur d'une même population. Une étude multicentrique réalisée par Steinberg C. et Cunningham S, 1989 a montré que la différence observée au niveau des valeurs absolues dépend de l'appareillage utilisé pour déterminer le taux de leucocytes et de lymphocytes totaux.

Nous pensons qu'il serait préférable d'utiliser les valeurs relatives qui comme l'ont montré Taylor et coll., 1989, ont une bonne corrélation avec les valeurs absolues et sont soumises à des variations peu importantes.

Nous suggérons aussi l'utilisation des résultats obtenus par la méthode paramétrique car la distribution des valeurs de référence des populations lymphocytaires de l'Ivoirien est normale comme chez les Caucasiens selon Reichert et coll., 1991.

Signalons que nos résultats montrent que le taux des lymphocytes non-T non-B est supérieur aux taux de lymphocytes B. Ce fait qui est contraire à ce qu'évoque la littérature pourrait être particulier à la population étudiée. Une autre étude devra être entreprise pour confirmer cette observation et trouver une explication.

Par rapport au sexe, nos résultats montrent que les femmes ont plus de lymphocytes totaux circulants, que les hommes. Cependant au niveau des sous populations lymphocytaires, nos résultats sont conformes à ceux de Mientjes et coll., 1992 ; Weiss et coll., 1992 qui ne trouvent aucune différence en fonction du sexe.

Nos résultats ne font ressortir aucune influence de l'âge sur les sous populations lymphocytaires T chez l'adulte conformément aux travaux de Nagel et coll., 1981; Tollerud et coll., 1989 qui montrent qu'entre 16 et 60 ans il n'y a pas de variation des populations lymphocytaires T4 et T8. Cependant nos résultats montrent une relation décroissante entre le taux de lymphocytes T et l'âge, dans la population étudiée qui a une tranche d'âge de 20 à 40 ans. D'autres travaux doivent être menée sur une population ayant une tranche d'âge plus grande afin de confirmer nos résultats.

Les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien ne dépendent pas de l'appartenance de ce dernier à un groupe ethnique donné. Cependant notons que nous n'avons tenu compte que de l'ethnie de l'ascendant paternel et que pour certains groupes ethniques, le nombre de sujets est insuffisant pour pouvoir tirer des conclusions. Une étude ne prenant en compte que des sujets non métissés devra être entreprise en vue de résultat plus probant.

Chez les femmes, les populations lymphocytaires ne sont pas influencées par le cycle menstruel mais le taux de leucocytes est affecté. Nous pensons qu'une étude transversale des populations lymphocytaires chez la femme pourrait donner des résultats plus intéressants à ce sujet.

L'échantillonnage faible des femmes consommant des pilules contraceptives ne nous permet pas d'affirmer que l'utilisation de ces médicaments augmente le taux de lymphocytes T4.

Notre étude relève l'absence d'une influence du sport sur les populations lymphocytaires. Mais il serait intéressant d'envisager une étude quantifiant de façon plus précise la fréquence et la nature du sport.

Nous avons voulu rechercher l'existence d'une note génétique en étudiant la relation entre les populations lymphocytaires et les systèmes de groupes sanguins. Notre étude ne mentionne aucune relation, cependant, le nombre insuffisant de certains phénotypes ne nous permet pas d'être affirmatif.

Le profil hémoglobinique n'influence pas le taux des populations lymphocytaires chez l'adulte Ivoirien en bonne santé apparente.

Près de 95% de nos sujets ont une protidémie et un protidogramme normal selon les résultats de Yapou et coll., 1989.

Nos résultats montrent que chez des sujets ayant un taux normal de protéines sériques, d'hémoglobine, et de complément, il n'y a aucune relation entre ces paramètres et le taux des populations lymphocytaires.

Notre étude présente, comme toute oeuvre humaine, certaines limites qu'il nous paraît opportun de mentionner car elles pourraient influencer l'exploitation de nos résultats.

Les travaux de Abo T. et coll., 1981 ont montré que les taux des populations

lymphocytaires du sang périphérique subissent des variations en fonction du cycle circadien. Ces auteurs notent un taux minimal à 8 heures du matin, qui augmente progressivement au cours de la journée pour atteindre un pic aux environs de minuit (24 heures) avec un taux qui est 1,5 à 2 fois supérieur à celui obtenu à 8 heures du matin. C'est pourquoi nous pensons que nos résultats qui ont été obtenus chez des sujets recrutés entre 7h30 et 10h30 (tranche horaire habituellement utilisé par les laboratoires d'analyses biologiques pour les prélèvements), ne pourront pas être applicables à des sujets ayant subi un prélèvement sanguin à des moments éloignés de cette tranche horaire.

Bien qu'ayant été réalisé chez des donneurs de sang, nos résultats ne peuvent pas s'appliquer à des sujets ayant subi une perte massive de sang (comme un don de sang) préalablement au prélèvement effectué en vu d'un typage lymphocytaire. En effet les travaux de Martini E. et coll., 1988 ont montré que les taux des lymphocytes et des sous populations lymphocytaires T4 et T8 sont plus faibles lorsque les prélèvements sont effectués après un don de sang.

La détermination de valeurs de référence nécessite l'utilisation de sujet présumé sain. Nos critères d'inclusion liés au coût de réalisation du travail, ne nous ont pas permis d'une part, de faire un tri aléatoire dans toute la population Ivoirienne et de disposer d'un grand échantillonnage et d'autre part de faire plus d'un examen de typage lymphocytaire par sujet. Nous pensons qu'une étude ultérieure devra être entreprise sur un échantillonnage plus grand choisi au hasard en vu de confirmer nos résultats.

CONCLUSION

De nos jours, les analyses biologiques jouent un rôle important dans l'arsenal médical. Leur interprétation nécessite l'existence de valeurs de référence établies chez des sujets présumés sains.

Nous nous sommes proposés d'établir ces normes pour les populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien. Ainsi en Janvier 1995, nous avons recruté 114 donneurs de sang au centre de transfusion d'Abidjan puis réalisé le typage lymphocytaire par cytométrie en flux. Les résultats obtenus au niveau des sous populations lymphocytaires T confirment ceux trouvés par d'autres auteurs en Afrique.

Nos résultats sont superposables en valeurs relatives à ceux de l'Europe et de l'Amérique. Cependant, il existe une différence au niveau des valeurs absolues, imputable à des différences analytiques et raciales au niveau du taux de leucocytes.

Nos résultats montrent une différence du taux de leucocytes en fonction du sexe avec une prédominance chez la femme. L'âge, l'appartenance à un groupe ethnique et le groupe sanguin n'ont pas d'influence sur les populations lymphocytaires dans la population étudiée; Il en est de même pour la protidémie, le taux d'hémoglobine et le complément hémolytique.

D'autres travaux doivent être entrepris pour étayer nos résultats concernant l'influence du cycle menstruel, des pilules contraceptives et du sport sur le taux des populations lymphocytaires. Il en est de même pour le taux des lymphocytes non-T non-B que nous trouvons supérieur au taux de lymphocytes B.

Nous suggérons aux biologistes et aux cliniciens, l'utilisation de nos résultats en vue d'interpréter les bilans immunitaires de typage lymphocytaire qui depuis l'avènement de l'infection à V.I.H. ont eu un regain d'intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

BACH J.F., JUDET C., ARCE S., DORMONT J. (1974)

Exploration de la fonction thymique chez l'Homme : Le phénomène des "rosettes-mouton" marqueurs des lymphocytes T chez l'Homme.

Nouv. presse médicale 3, p. 655-660

BAST R.C., REINBERG E.L., MAVER C., LAVIN P.,SCHLOSSMAN S.F. (1983)

Contrasting effects of cyclophosphamide and prednisolone on the phenotype of human peripheral blood leukocytes.

Clin. Immunopathol. 28, p. 101-114

BECTON DICKINSON IMMUNOCYTOMETRY SYSTEMS (1992)

Catalogues Simultest TM Leucogate, Control, CD3/CD19, CD3/CD4, CD3/CD8.

BERNARD A. (1993)

Antigènes de différenciation leucocytaire ou molécule CD. In: JEAN-FRANÇOIS BACH.

Traité d'Immunologie Flammarion Médecine Sciences, Edition Paris.

BRENNER M.B., Mc LEAN J., DYALYNAS D.P. et al (1986)

Identification of a putative second T-cell receptor.

Nature 322, p. 145.

BRETAUDIÈRE J.P., BURET J., FAVRE R. et al (1979)

Variations biologiques des examens de laboratoires (document D).

Ann. Biol. Clin. 28, p. 229-239.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1992)

1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.

Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 41 (RR-17), p. 1-35.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1994)

1994 Revised guidelines for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infections.

Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 43 (RR-3), p. 1-21.

COLLIER A.C. (1992)

Antiretroviral therapies.

Infect. Med. suppl 1, p.11-19

CONSTANS J., LADNER J., DABIS F. et al (1992)

I-Hyperlymphocytose CD8 au cours de l'infection par le VIH: 63 observations.

Presse Médicale 21, p. 27-30.

DACIE J.V., LEWIE S.M. (1984)

In: Practical haematology Churchill-Livingstone, Edit. Edinburgh, p. 413.

DALGLEISH A., BEVERLY P., CLAPHAM P., CRAWFORD D., GREAVES M., WEISS R. (1974)

The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS virus. *Nature* 251, p. 547.

DEAN A.D., DEAN J.A., BURTON J.H., DICKER R.C. (1990)

Epi info. version 5: A word processing, database, and statistics program for epidemiology on micro-computers. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.

DEMBIC Z., VON BOEHMER H., STEIMETZ M. (1986)

The role of T cell receptor and genes in MHC restricted antigen recognition. *Immunol. Today* 7, p. 308.

FAHEY J.L., PRINCE H., WEAVER M. et al (1984)

Quantitative changes in T helper or T suppressor /cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immune deficiency syndrome from other immune subsets disorders. *Am. J. Med.* 76, p. 95-100.

FAHEY J.L., TAYLOR J.M.G., DETELS R. et al. (1990)

The prognostic Value of cellular and serologic markers in infection with HIV1. *N.E.J.M.* 322, p.166-72.

FROLAND S., NATVIG J., BERDAL P. (1971)

Surface-bound immunoglobulin as a marker of B lymphocytes in man. *Nature* 234, p. 251-2

GENETET N. (1993)

Maturation des lymphocytes. In: GENETET BERNARD *Immunologie* Collection Biologie Médicale, Editons Médicales Internationales, p. 45.

GIORGI J.V., KESSON A.M., CHOU C.C. (1992)

Immunodeficiency and infectious diseases. In: ROSE N R., CONWAY DE MACARIO E., FAHEY J.L., FRIEDMAN H., PENN G.M. (Ed.) *Manual of clinical laboratory immunology*, 4th Edit. Washington, D.C.: American society for microbiology, p. 174-181.

JALKANEN S.T., BARGATZE F.R., HERRON L.R., BUTCHER E.C. (1986)

A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.* 16, p. 1195-1202.

KUNG P.C., GOLDSTEIN G., REINHERTZ E.C., SCHLOSSMAN S.F. (1979)

Monoclonal antibodies defining constitutive human T cell surface antigens. *Science* 206, p. 347.

LANDAY A., HO J.L., HOM D. et al (1993)

A rapid manual method for CD4+ T cell quantification for use in developing countries.
AIDS 7, p. 1565-1568.

LISSE I.M., WITTLE H., AABY P., NORMARK M., RYDER L.P. (1990)

Labelling of T-cell subsets under field conditions in tropical countries. Adaptation of the immuno-alkaline phosphatase staining method for blood smears.
J. Immunol. Meth. 129, p. 49-53.

LOKEN M.R., BROSNAN J.M., BACH B.A., AULT K.A. (1990)

Establishing optimal lymphocyte gate for immunophenotyping by flow cytometry.
Cytometry 11, p. 453-459.

MARTINEZ-MAZA O., CRABB E., MITSUYASU R.T., FAHEY J.L., GIORGI J.V. (1987)

Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity.
J. Immunol. 138, p. 3720-3724.

MARTINI E., MULLER J.Y., DOINEL C. et al (1988)

Disappearance of CD4 lymphocyte circadian cycles in HIV infected patients. Early events during asymptomatic infection.
AIDS 2, p. 133-134.

MARTINI E., ROQUIN H., GASTAL G., DOINEL C. (1988)

Diminution des lymphocytes circulants après un don de sang. Incidence sur l'établissement des valeurs de référence.
Ann. Biologie Clinique 46, p. 327-328.

MIENTJES G.H., VAN AMEIJDEN E.J., ROOS M.T. et al (1992)

Large diurnal variation in CD4 count and T-cell function among drug users: Implications for clinical practice and epidemiological studies.
AIDS 6, p. 1269-1272.

MILLER J.F.A.P., MARSHALL A.H.E., WHITE R.G. (1962)

The immunological significance of the thymus.
Adv. Immunol. 2, p. 111-162.

NAGEL J.E., CHREST F.J., PYLE R.S., ADLER W.H. (1981)

Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans.
J. Immunol. 127, p. 2086-2088.

NICHOLSON J.K.A., VELLECA M.W., JUBERT S., GREEN A.T., BRYAN L. (1994)

Evaluation of alternative CD4 technologies for the enumeration of CD4 lymphocytes.
J. of Immunol. Meth. 177, p. 43-54.

PAXTON H., BENDELE T. (1993)

Effect of time, temperature, anticoagulant on flow cytometry and hematological values
Ann. Ny. Acad. Sci. 677, p. 440-443.

PANTALEO G, GRAZIOSI C, FAUCI A.S. (1993)

The immunopathogenesis of HIV infection.
NEJM 328, p. 327-335.

PENE F., FELLEZ Ch., SOMBO F., CABANNES R. (1978)

Etude immunologique des populations lymphocytaires de l'Ivoirien (Rosettes-mouton et Ig de membrane)

Ann. Univ. Abidjan série B (Médecine), tome XII, p. 142-145.

PICOT C (1993)

La cytofluorimétrie analytique et séparative en immunologie. In: GENETET BERNARD.
Immunologie Collection Biologie Médicale, Editions Médicales Internationales. P. 413.

REICHERT T., DEBRUYERE M., DENEYS V., TOTTERMAN T., LYDYARD P., YUKSEL F. (1991)

Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians.

Clin. Immunol. Immunopathol. 60, p. 190-208.

RENZI P., GINNS L.C. (1987)

Analysis of T-cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to ficoll-hypaque separation by flow cytometry.

J. Immunol. Meth. 98, p. 53-56.

ROITT I, BROSTOFF J., MALE D. (1989)

Immunologie fondamentale et appliquée Medsi/McGraw-Hill, p. 14.7.

SACHS C., DAUBROSSE E., DRODOWSKY M. et al (1980)

Facteurs à prendre en considération pour le prélèvement sanguin en vue de l'établissement de valeurs de référence (document E).

Ann. Biol. Clin. 38, p. 251-265.

SACHS C., AELLIG A., ALBERT A. et al (1981 A)

Production de valeurs de référence de sujets sains (document G).

Ann. Biol. Clin. 39, p. 235-244.

SACHS C., AELLIG A., ALBERT A. et al (1981 B)

Le concept de valeurs de référence en biologie clinique (document A).

Ann. Biol. Clin. 39, p. 381-384.

SACHS C., AELLIG A., ALBERT A. et al (1982)

Utilisation des valeurs de référence (document J).

Ann. Biol. Clin. 40, p. 697-708

RESUME

L'infection à VIH qui se caractérise par une atteinte élective des lymphocytes T4, a donné de l'intérêt au phénotypage lymphocytaire, devenu un examen de routine. L'interprétation de toute analyse biologique, repose sur la comparaison des valeurs observées chez un sujet, aux valeurs de référence. Ces dernières sont soumises à des variations génétiques, climatiques et analytiques faisant qu'elles ne sont pas toujours superposables d'une population à une autre.

Cette étude visait, à partir du phénotypage lymphocytaire réalisé par cytométrie en flux chez 114 donneurs de sang, à déterminer les valeurs de référence des populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien. Nous avons également évalué l'influence de certains facteurs sur les taux des populations lymphocytaires.

Les résultats montrent que :

L'adulte Ivoirien a un taux moyen de 1002 lymphocytes T4 / μ l et 596 lymphocytes T8 / μ l de sang périphérique avec un indice d'immunorégulation moyen de 1,83. Le taux de leucocytes totaux est plus bas chez l'homme (5161 cellules/ μ l) que chez la femme (6202 cellules/ μ l).

L'âge et certains paramètres biologiques comme la protidémie, n'influencent pas le taux des populations lymphocytaires.

Ces résultats sont destinés d'une part à donner aux cliniciens locaux des repères indispensables à l'interprétation rationnelle du bilan immunitaire de l'adulte Ivoirien, et d'autre part à servir de base pour d'autres études.

Mots clés : Phénotypage lymphocytaire , Valeurs de référence , Adulte Ivoirien

SACHS C., AELLIG A., ALBERT A. et al (1983)

Traitement des valeurs de référence et détermination de l'intervalle de référence.
Ann. Biol. Clin. 41, p. 63-79

SCHNITTMAN S.M. (1991)

Viral burden in human immunodeficiency virus type I (HIV) infection. p. 680-683
In : FAUCI A.S., moderator. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection.
Ann. Intern. Med. 114, p. 678-693

SCHREZENMEIER H., FLEISHER B. (1988)

A regulatory role for the CD4 and CD8 molecules in T cell activation.
J. Immunol. 141, p. 398-403.

SOMBO MAMBO F., SEKA SEKA J., CABANNES RAYMOND (1987)

Les groupes sanguins érythrocytaires en Côte d'Ivoire; inventaire et repartition selon les ethnies.
Publications Médicales Africaines 83, p. 16-26.

SPIRA J.T., JONES M.B., NICHOLSON J.K.A. et al (1993)

Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia : An analysis of five patients with unexplained opportunistic infections.
NEJM 328, p. 386-392.

STEINBERG C., CUNNINGHAM-RUNDLES S. (1989)

Standardization of T-cell subsets enumerations.
JAMA 262, p. 1526.

TAYLOR J.M.G., FAHEY J.L., DETELS R., GIORGI J. (1989)

CD4 percentage, CD4 number, and CD4/CD8 ratio in hiv infection: Which to choose and how to use.
Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom 2, p. 114-124

TOLLERUD D.J., CLARK J.W., BROWN L.M. et al (1989)

The influence of age, race, and gender on peripheral blood, mononuclear cell subsets in healthy non smokers.
J. Clin. Immunol. 9, p. 214-222.

TSOUKAS C.D., VALENTINE M., LOTZ M. et al (1984)

The role of the T3 molecular complex in antigen recognition and subsequent activation events.
Immunol. Today 5, p. 311.

VON BOEHMER H. (1986)

The selection of the α heterodimeric TCR for antigen
Immunol. Today 7, p. 333.

WEISS S.H., KLEIN C.W., MAYUR R.K., BERSA J., DENNY T.N. (1992)
Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia
Lancet 340, p. 608-609.

WESTERMANN J., PABST R. (1990)
Lymphocyte subsets in the blood: A diagnostic window on the lymphoid system ?
Immunol. Today 11, p. 406-410.

YAPO A.E., ASSAYI M., AKA N.B. et al (1989)
Les valeurs de référence de 21 constituants biochimiques sanguins de l'Ivoirien adulte
présupposé sain.
Pharmacien d'Afrique 44, p. 15-24.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LISTE DES ANTIGENES DE DIFFERENCIATION

LEUCOCYTAIRES

(A. Bernard, 1993)

CD	Distribution tissulaire caractéristique	Poids moléculaire et structure	Implications fonctionnelles
1 a	Corticothymocytes. Cellules de Langerhans et interdigitées. Sous-population B	49 kDa. Analogue HLA-CH mais non polymorphe. Associées à la β_2 -microglobuline	
1 b	Corticothymocytes. Cellules de Langerhans et interdigitées. Sous-population B	45 kDa + β_2 M	
1 c	Corticothymocytes. Cellules de Langerhans et interdigitées. Sous-population B	43 kDa + β_2 M	
2	T + NK	50 kDa. Super-famille des Ig (2 domaines)	Adhésion : responsable du phénomène des rosettes. Déclenche l'activation des cellules T
3	Pan-T stricte	5 chaînes polypeptidiques différentes. Super-famille des Ig	Physiquement associé au TCR. Transduit le signal d'activation du TCR et déclenche l'activation des cellules T
4	Sous population T	1 chaîne monomérique 59 kDa. 4 domaines Ig	Adhésion : stabilise le complexe TCR-HLA de classe II. Transduit un signal d'activation (associée à tyrosine kinase p 56 lck) Récepteur HIV
5	Pan-T. Sous population B	1 chaîne 67 kDa. Super-famille des Ig	Transduit un signal d'activation (ligand CD72)
6	Pan-T. Sous-population B	1 chaîne 100-130 kDa	
7	Pan-T	1 chaîne 40 kDa. un domaine Ig externe	Transduit un signal d'activation
8	Sous population T	Soit homodimère 2 chaînes α , soit hétérodimère $\alpha\beta$ (=32 kDa). Super-famille Ig	Adhésion : stabilise le complexe TCR-HLA de classe II. Transduit un signal d'activation (associée à tyrosine kinase p 56 lck)
9	Plaquettes. Monoocytes	1 chaîne 24 kDa. Famille des protéines à multisegments transmembranaires	Induit l'agrégation et l'activation des plaquettes
10	Cellules leucémiques lymphoïdes aiguës Cellules B immatures	Monomérique. 100 kDa	Activité enzymatique endopeptidase neutre
11 a	Pan leucocytaire	Intégrine. Chaîne α de 180 kDa s'associe à la chaîne β CD18 (= chaîne $\alpha 2$ des intégrines)	Adhésion des leucocytes aux autres cellules. Trois ligands : ICAM-1 (CD54), ICAM-2 et ICAM-3
11 b	Granuleux. Monoocytes. NK	Intégrine. Chaîne α de 165 kDa s'associe à la chaîne β CD18 (αM des intégrines)	Trois ligands connus : C3bi (opsonisation C dépendante), fibrinogène, Facteur X de la coagulation
11 c	Granuleux. Monoocytes. NK	Intégrine. Chaîne α de 150 kDa s'associe à la chaîne β CD18 (αX des intégrines)	
12			Cette CD nécessite d'être caractérisée
13	Monoocytes. Granuleux	1 chaîne 150 kDa	Activité enzymatique. Aminopeptidase
14	Lignée monocyte-macrophage	1 chaîne 55 kDa liée par pont inositol phosphate. Famille des protéines riches en leucine	Active les monocytes = LPS binding protein
15	Lignée myéloïde	Haptène Y	Adhésion. Ligand CD62
16	Granuleux. Macrophage	1 chaîne 50-65 kDa. Super-famille des Ig (deux domaines tronqués). Transmembranaire ou liée par pont inositol phosphate	Récepteur de haute affinité pour le Fc IgG (I = γ R11)
17	Granuleux. Monoocytes. Plaquettes	Lactosylcéramide	
18	Pan leucocytaire	Intégrine. Chaîne β_2 de 95 kDa s'associe à 11 a, 11 b ou 11 c	Voir CD11
19	Pan B	1 chaîne 90 kDa. Super-famille des Ig. Deux domaines	
20	Pan B	Protéine phosphorylée 30 kDa. Multisegments transmembranaires	Transduit un signal d'activation dans les cellules B
21	B mûres	1 chaîne 110 kDa. Famille des facteurs régulateurs du C ³	Récepteur C3b. Ligand CD23. Récepteur EBV

ANNEXE 1 (suite)

CD	Distribution tissulaire caractéristique	Poids moléculaire et structure	Implications fonctionnelles
22	Pan-B	1 chaîne 135 kDa. Super-famille des Ig (5 domaines)	Activation des cellules B. Induit la synthèse des Ig
23	B activées	1 chaîne 45-50 kDa. Donne un segment soluble après clivage lectine animale	Récepteur de faible affinité pour les IgE (Fc ϵ RII). Ligand de CD21
24	B granuleux	1 chaîne de 38-41 kDa	
25	Cellules T activées	1 chaîne de 55 kDa s'associe par l'IL-2 à une chaîne de 75 kDa (α)	Chaîne β du récepteur de l'IL-2
26	Cellules T activées	1 chaîne de 120 kDa	Activité enzymatique dipeptidyl peptidase
27	Cellules T	Homodimère (2 chaînes 55 kDa)	Impliqué dans l'activation des cellules T
28	Cellules T	Homodimère (2 chaînes 28 kDa). Super-famille des Ig. Deux domaines par chaîne	Transmet un signal puissant d'activation des cellules T. Ligand : molécule B7
29	Pan-leucocytaire	Intégrine. Chaîne β 1 des intégrines. Peut s'associer à au moins 6 chaînes α différentes pour former des hétérodimères	Adhésion aux composants de la matrice extracellulaire et de la protéine VCAM, induite à la surface des cellules endothéliales vasculaires par l'IL-1
30	Cellules T et B activées Cellules de Reed-Sternberg	1 chaîne de 105 kDa	
31	Plaquettes	1 chaîne de 140 kDa	= molécule gp11a des plaquettes
32	Macrophages, Granuleux, Cellules B	1 chaîne 39-48 kDa	Récepteur Fc des IgG (= Fc γ R11)
33	Monocytes	1 chaîne de 67 kDa	
34	Précurseurs hématopoïétiques	1 chaîne de 105-120 kDa	
35	Cellules B, Neutrophiles, Eosinophiles	1 chaîne de 190-250 kDa selon les individus. Famille des récepteurs pour le complément	Récepteur pour le C3b (= CR1)
36	Plaquettes, Monocytes	1 chaîne transmembranaire 90 kDa	Récepteur des plaquettes pour la thrombospondine
37	Pan-B	1 chaîne 40-52 kDa. Famille des protéines à multisegments transmembranaires	1 chaîne de 45 kDa
38	Cellules T activées, Cellules pan-B et B activées	1 chaîne de 45 kDa	Transduit un signal d'activation
39	Cellules B mûres	1 seule chaîne polypeptidique de 100 kDa	
40	Pan-B	1 chaîne de 45 kDa peut donner des hétérodimères	Transduit un signal puissant d'activation des cellules B
41	Lignée plaquettaire	Chaîne α IIb des intégrines Chaîne gpIIb des plaquettes 135 kDa; peut s'associer à CD51 ou CD61	Adhésion et agrégation des plaquettes
42	Lignée plaquettaire	Hétérodimère non covalent -42 a = gpIX (23 kDa) -42 b = gpIb (105 kDa)	
43	Pan-leucocytaire	Sialoglycoprotéine 105-115 kDa	
44	Pan-leucocytaire	Glycoprotéine sulfatée 80-95 kDa. Famille des protéotycaenes	Adhère en des leucocytes aux hyaluronates tissulaires (migration). Transduit un puissant signal d'activation
45	Pan leucocytaire Cellules T immatures et vierges Cellules T mémoirees Cellules B	1 chaîne polypeptidique. Isomorphisme, les différentes formes moléculaires ont une distribution différente : CD45 = AcM réagissant avec la partie commune à toutes les formes CD45RO : forme de bas poids moléculaire 180 kDa CD45RA : forme de poids moléculaire intermédiaire : 200-220 kDa Forme de haut poids moléculaire : 220 kDa	Activité tyrosine phosphatase (rôle probable important dans l'adhésion et le contrôle de l'activation cellulaire)
46	Pan-leucocytaire	Glycoprotéine hétérodimérique non covalente : 45-70 kDa. Famille avec CD55	Cofacteur de clivage de C3b C4b
47	Toutes les cellules	1 chaîne de 47 à 52 kDa	

ANNEXE 1 (suite et fin)

CD	Distribution tissulaire caractéristique	Poids moléculaire et structure	Implications fonctionnelles
48	Neutrophiles	Glycoprotéine liée par un pont inositol phosphate; 41 kDa	
49 b	Plaquettes, Cellules T en culture, Cellules épithéliales et endothéliales activées	Chaîne $\alpha 2$ des intégrines (170 kDa). S'associe à CD29 pour former un hétérodimère	Récepteur pour la laminine et le collagène
49 d	Cellules T, Monoocytes, Cellules B	Chaîne $\alpha 4$ des intégrines (150 kDa). S'associe à CD29 pour former un hétérodimère	Ligand pour la fibronectine et VCAM = adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire
49 f	Lignée plaquettaire, Lignée T	Chaîne $\alpha 6$ des intégrines (120 kDa). S'associe à CD29 pour former un hétérodimère	
50	Pan-leucocytaire	Hétérodimère 101-108 kDa	
51	Plaquettes, Cellules endothéliales	Chaîne α des intégrines 140 kDa. S'associe à CD41	Récepteur pour la vitronectine
52	Pan-leucocytaire	1 chaîne 21-28 kDa très glycosylée	Transduit un signal d'activation (cellule T)
53	Pan-leucocytaire	1 chaîne de 32-40 kDa	
54	Cellules endothéliales	1 chaîne de 90 kDa. Super-famille des Ig, 4 domaines	= ICAM-1 ligand de CD18/11a. Récepteur pour les rhinovirus
55	Pan-leucocytes + plaquettes + globules rouges	1 chaîne de 70 kDa liée par un pont d'inositol phosphate. Famille avec CD46	= decay accelerating factor
56	Cellules NK	1 chaîne de 140 kDa isoforme de N-CAM (appartient à la super-famille des Ig)	
57	Cellules NK	1 seule chaîne de 110 kDa	
58	Toutes cellules	1 chaîne de 40-65 kDa. 2 isoformes. Transmembranaire ou lié par un pont d'inositol phosphate	Ligand de CD2 = adhésion des cellules T aux autres cellules
59	Toutes cellules	1 chaîne de 19 à 23 kDa liée par un pont inositol phosphate	3 fonctions : - 2 ^e ligand de CD2 - transduit un signal d'activation aux cellules T - inhibiteur du canal lytique du C
60	Sous-population de cellules T	Gangliosides ayant un groupe disialosyl	Transduit un signal d'activation
61	Lignée plaquettaire	Chaîne gpIIb des plaquettes = chaîne $\beta 3$ des intégrines forme un hétérodimère avec CD41	Récepteur pour la vitronectine
62	Plaquettes, Cellules endothéliales	1 chaîne de 110 kDa. Famille des sélectines	Activation et adhésion des plaquettes. Ligand E substance Lewis X
63	Plaquettes activées, Lignée monocyttaire	1 chaîne de 53 kDa	
64	Monoocytes, Granuleux activés	1 chaîne de 15 kDa	Récepteur de haute affinité (Fc γ R1)
65	Granuleux, Monoocytes	Céramide Dodecylsaccharide 4 C	
66	Granuleux	Phosphoprotéine de 180-200 kDa	
67	Granuleux	1 chaîne de 100 kDa liée par un pont inositol phosphate	
68	Cytoplasme des monoocytes et macrophages	1 chaîne de 110 kDa	
69	Lymphocytes et macrophages actifs, Cellules NK	Homodimère phosphorylé (31 kDa par chaîne)	
70	Cellules T et B activées		
71	Toutes cellules en cycle	Homodimère de 95 kDa	Récepteur pour la transferrine
72	Pan-cellules B	Hétérodimère de 43/39 kDa	Transduit un signal de prolifération
73	Sous population T	1 chaîne de 69 kDa liée par un pont inositol phosphate	Transduit un signal d'activation aux cellules T. Activité enzymatique ecto-Synthéase
74	Cellules B, Monoocytes	1 chaîne avec trois variantes qui coexistent 41/35/33 kDa	Chaîne invariante des molécules HLA de classe II
75	Sous-population B et macrophages	1 chaîne de 53 kDa	
76	Sous-populations B et T	Hétérodimère 85/67 kDa	
77	Sous-population B, Cellules endothéliales	Globotriaosylcéramide	
78	Pan-B, Cellules épithéliales		

ANNEXE 2 : QUESTIONNAIRE POUR L'ETUDE DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES DE L'ADULTE IVOIRIEN

I - IDENTITE

Nom: _____ Prénom _____

Sexe: _

Date de naissance: <dd/mm/yy> Age: ##

Tension: Systolique: ## cmHg Tension: Diastolique: ## cmHg

Taille: ### cm Poids: ###.# Kg

Nationalité: ## Ethnie: _____

Profession: _____

Nombre d'enfants: ## Nombres de frères et soeurs: ###

Numéro du laboratoire : _____

Numéro du donneur: #####

II - LES ANTECEDENTS

Médicaux : Nature: _____
Période: ### semaines

Médicamenteux: Nature: _____
Période de prise: ### semaines

Gynéco-Obstétriques: Nombre de grossesse: ##
Nombre d'IVG: ##

Maladie chronique: _____

III - LE MODE DE VIE

Sport: <Y> Si oui, fréquence: ## par semaine

Tabagisme: <Y> Si oui, fréquence: ## cigarettes par jour

Alcoolisme: <Y> Si oui, fréquence: ## par semaine

nature: _____
dernière prise: ##### jours

Café: <Y> Si oui, fréquence: ## par semaine

Prise de médicament: <Y> Si oui, nature: _____
date de début de prise: ### semaines

IV - LES CONDITIONS DU PRELEVEMENT

Heure du prélèvement: ##.## heures

Date du début des dernières règles: <dd/mm/yy>

Période du cycle: ## jours

Ménopause: <Y>

ANNEXE 3 : LES GROUPES ETHNIQUES DE LA COTE D'IVOIRE

(Sombo et coll, 1987)

Groupe 1 : Les Akans (Sud-est et centre du pays)

Renferme : Les Abbey , Abron , Agni , Apolonien , Attié , Baoulé , N'gbatto

Groupe 2 : Les Mande-Fus (Centre-ouest du pays)

Comprend : Les Dan , Gouro , Yacouba

Groupe 3 : Les Mandings (Nord-ouest du pays)

Renferme : Les Dioula , Koyaka , Mahou , Malinké

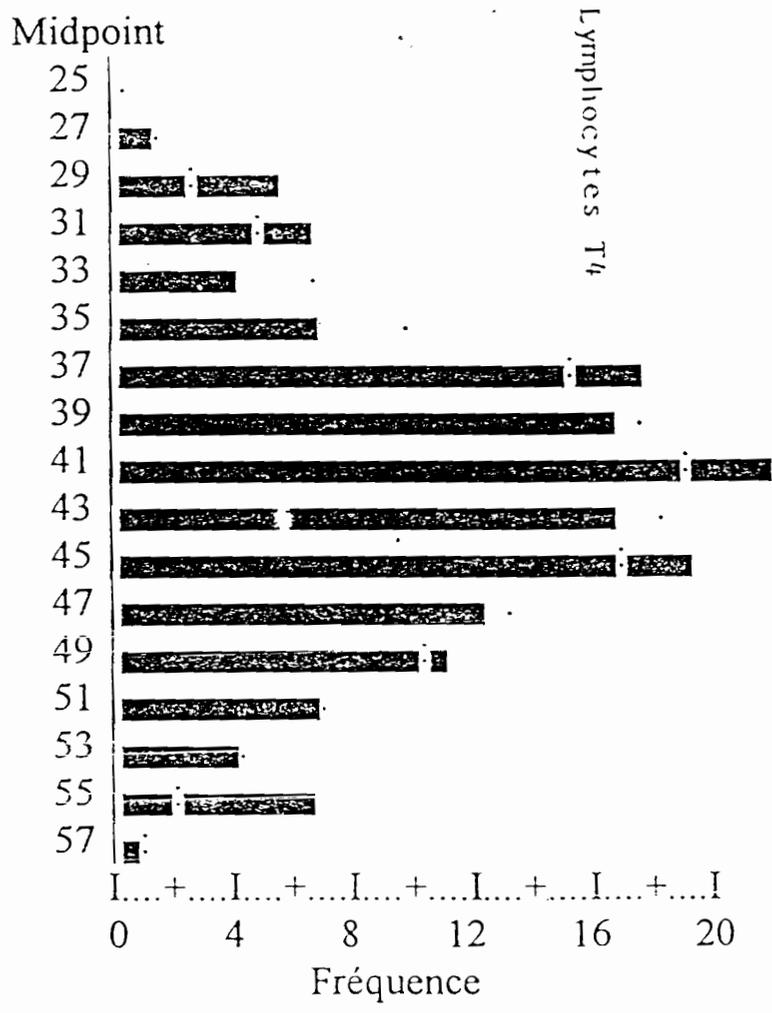
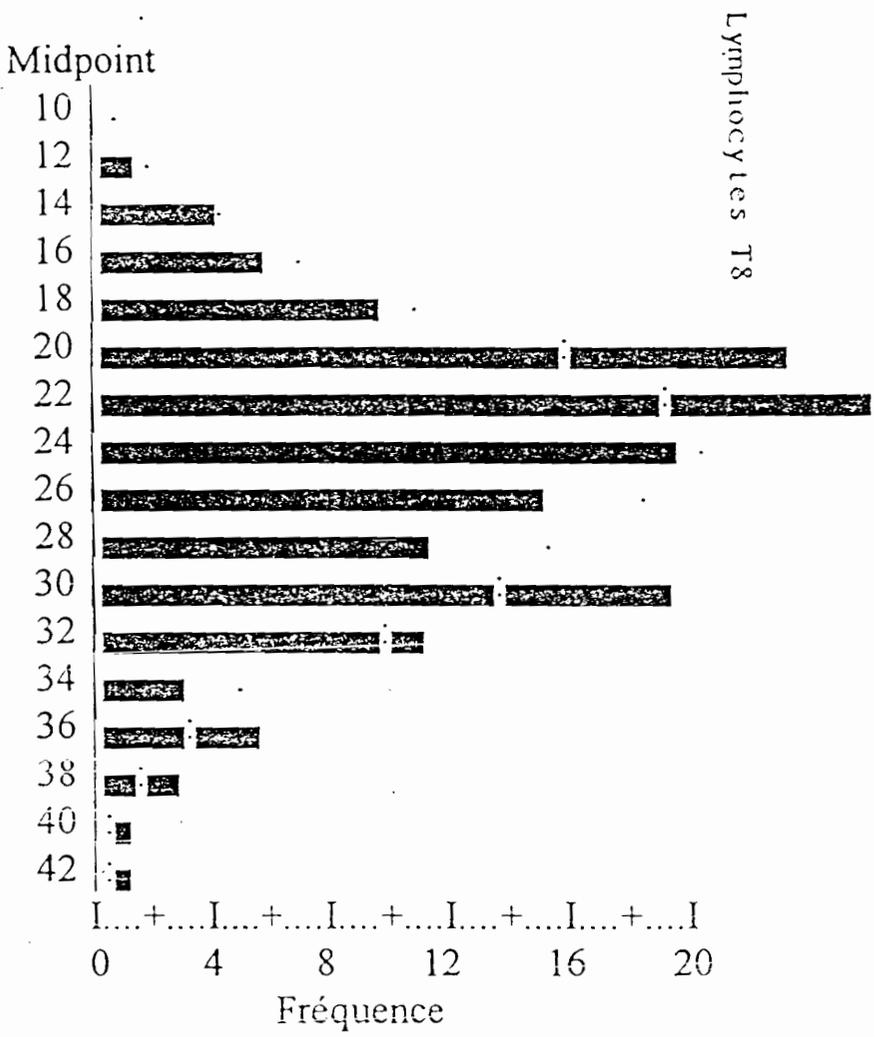
Groupe 4 : Les Krous (Sud-ouest du pays)

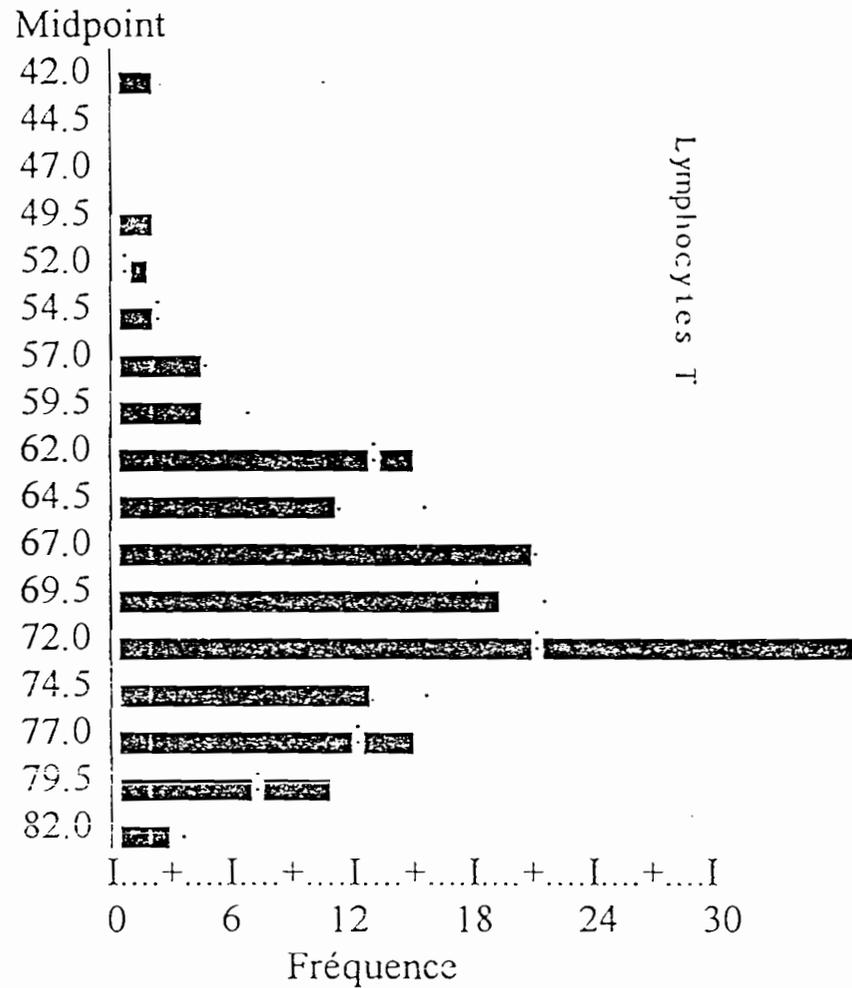
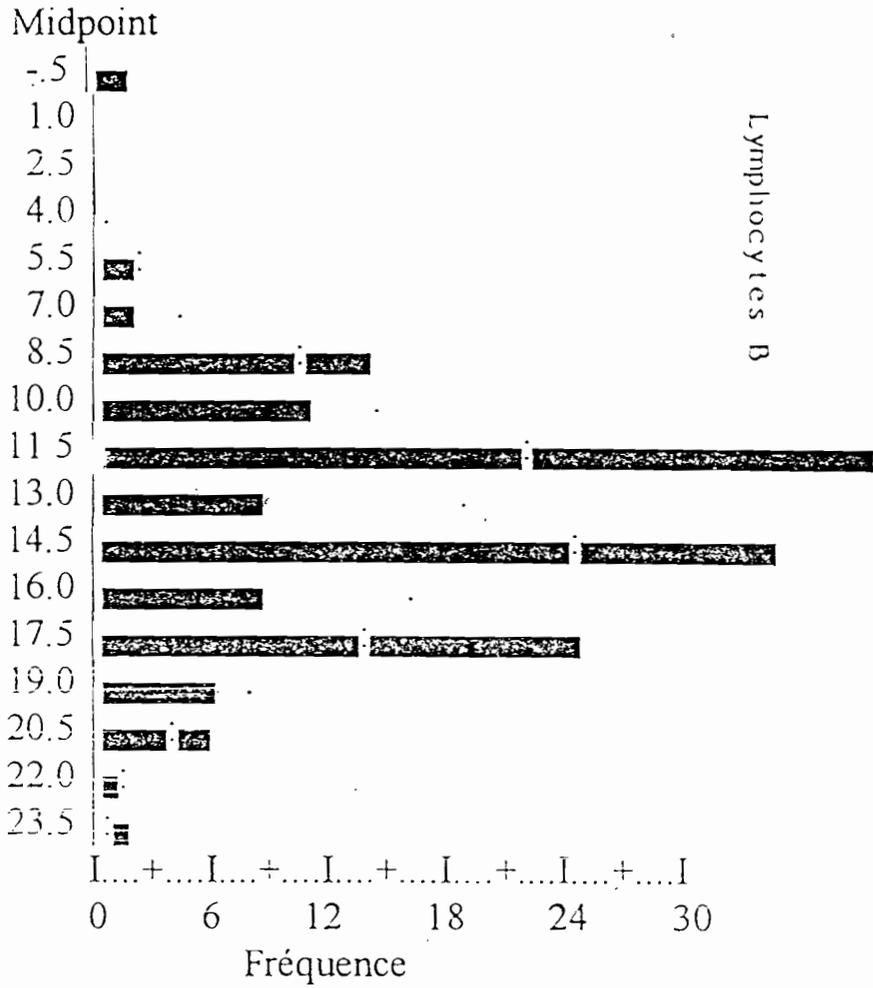
Comprend : Les Bacoué , Bété , Dida , Godié , Guéré , Wobé , Neyo , Niaboua ,
Kroumen , Gagou .

Groupe 5 : Les Voltaïques (Nord du pays)

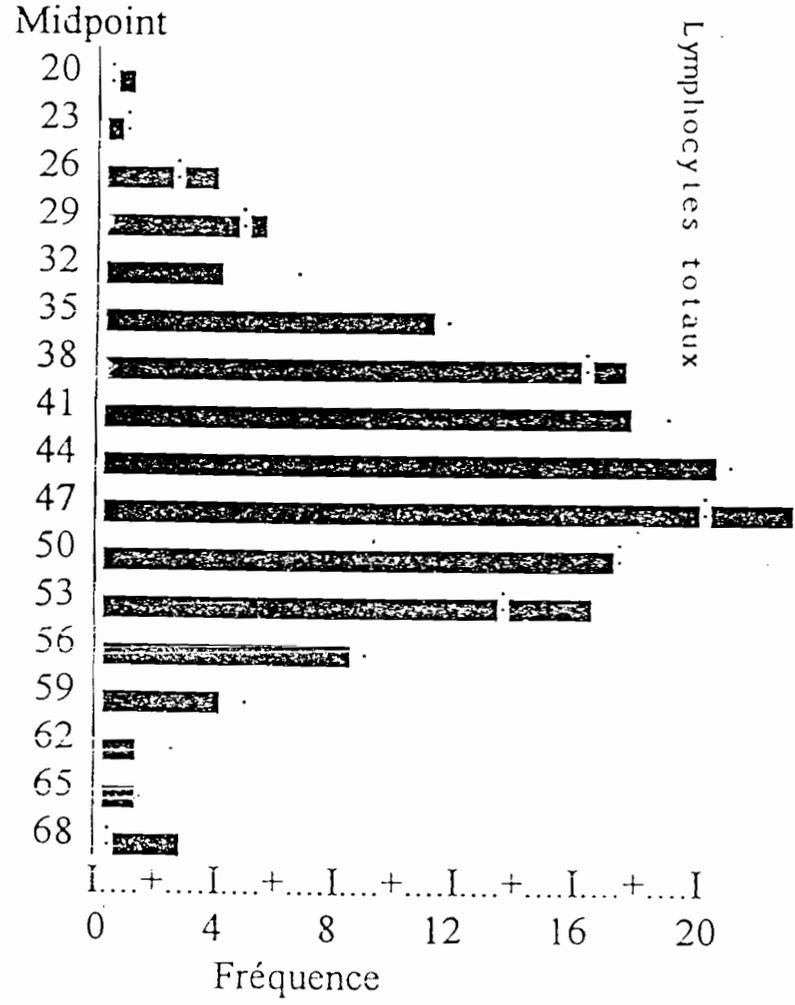
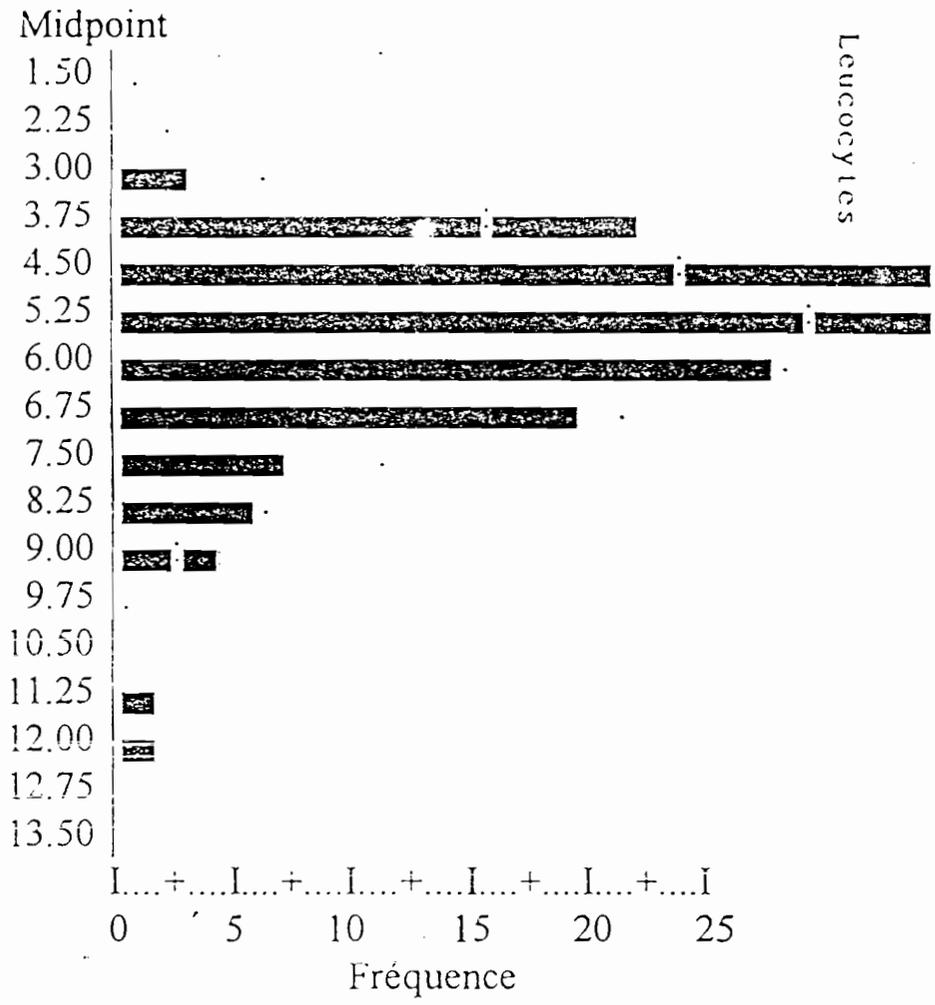
Renferme : Les Sénoufo , Koulango , Tagbana , Mossi , Bambara , Lobi , Youla

**ANNEXE 4: DISTRIBUTION DES POPULATIONS
LYMPHOCYTAIRES DE L'ADULTE IVOIRIEN PRESUME SAIN**





ANNEXE 4: (suite)



ANNEXE 4: (suite et fin)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: BIBLIOGRAPHIE	4
I- LES LYMPHOCYTES	5
A- La morphologie des lymphocytes	5
1- Au microscope optique	5
1-1 Les petits lymphocytes	5
1-2 Les moyens et grands lymphocytes	5
2- Au microscope à contraste de phase	6
3- Au microscope électronique	6
4- Au microscope électronique à balayage	6
B- La maturation des lymphocytes	7
1-La maturation des lymphocytes T	8
1-1 La différenciation hématopoïétique	8
1-2 La maturation fonctionnelle	9
1-2-1 Les molécules de surface	10
1-2-2 La sélection clonale	16
2- La maturation des lymphocytes B	16
2-1 Les étapes de la maturation	17
2-2 Les molécules de surface	18
3- La maturation de la troisième population lymphocytaire	19
C- Le devenir des lymphocytes	20
1- Les populations fonctionnelles des lymphocytes T	20
1-1 Les lymphocytes T effecteurs	20
1-2 Les lymphocytes T régulateurs	20
1-3 Les lymphocytes T mémoires	21
2- Les populations fonctionnelles des lymphocytes B	21
2-1 Les lymphocytes B quiescents	21
2-2 Les plasmocytes	21
2-3 Les lymphocytes B mémoires	21
D- Les fonctions des lymphocytes	22
1- Les fonctions des lymphocytes T	22
1-1 Les fonctions cytotoxiques	22
1-2 La régulation de la réponse immunitaire	23
1-3 La régulation de l'hématopoïèse	23
2- Les fonctions des lymphocytes B	24
2-1 La synthèse d'immunoglobulines	24
2-2 La présentation des antigènes thymodépendants	24
E- Le phénotypage des populations lymphocytaires	25

1- Les techniques utilisées	25
1-1 La technique des rosettes	25
1-2 Les techniques d'immunofluorescence	26
1-2-1 Le principe	26
1-2-2 Les marqueurs de surface utilisés	26
1-2-3 Les anticorps utilisés	27
1-2-4 L'observation de la fluorescence	29
1-3 Les autres techniques	33
1-3-1 Les techniques immunoenzymatiques	33
1-3-2 La technique des cytosphères	33
2- Quelques valeurs de référence	33
3- Les applications du phénotypage lymphocytaire	34
3-1 Le bilan du système immunitaire	34
3-2 Le diagnostic des hémopathies malignes	36
3-3 Les autres applications	36

li- LES VALEURS DE REFERENCE 37

A- Le concept de valeurs de référence 37

B- Les moyens d'obtention des valeurs de référence 37

1- Etablissement de la liste des facteurs
de variations biologiques 38

2- Décider les critères de partition et
les critères d'exclusion 39

3- La préparation des individus de référence 40

4- Les modalités de prélèvements et de
conservation du spécimen biologique

41

5- Effectuer l'analyse par une technique
d'exactitude et de précision connues 41

C- Le traitement statistique des valeurs de référence 43

1- Les méthodes paramétriques 43

2- Les méthodes non paramétriques des quantiles 44

3- Les méthodes intuitives 44

D- Utilisation des valeurs de référence 44

DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX PERSONELS 46

I- LA METHODOLOGIE 47

A- Le choix de la population 47

1- Lieu et disposition pratique 47

2- Les critères d'exclusion	47
B- Le prélèvement des spécimen biologiques	48
C- Les méthodes d'analyse biologique des spécimen	49
1- L'hémogramme	49
2- La détermination des populations lymphocytaires	49
3- L'électrophorèse des protéines sériques et de l'hémoglobine	58
4- Le dosage du complément hémolytique	58
5- La sérologie rétrovirale	58
6- Le dosage des protides totaux	58
7- Le groupage sanguin	59
D- La méthodologie d'analyse des données	59
II- LES RESULTATS	61
A- Les résultats globaux	61
B- Influence du sexe	68
C- Influence de l'âge	71
D- Influence du poids	71
E- Les populations lymphocytaires en fonction du groupe ethnique	71
F- Influence du cycle menstruel et de la prise de pilules contraceptives	75
G- Effet du sport	75
H- Relation entre le taux des populations lymphocytaires et d'autres paramètres biologiques	76
III- LA DISCUSSION	81
CONCLUSION	86

SERMENT DE GALIEN

JE JURE, EN PRESENCE DES MAITRES DE LA FACULTE, DES
CONSEILLERS DE L'ORDRE DES PHARMACIENS ET DE MES
CONDISCIPLES:

D'HONORER CEUX QUI M'ONT INSTRUITS DANS LES PRECEPTES DE
MON ART ET DE LEUR TEMOIGNER MA RECONNAISSANCE EN
RESTANT FIDELE A LEUR ENSEIGNEMENT, D'EXERCER, DANS
L'INTERET DE LA SANTE PUBLIQUE, MA PROFESSION AVEC
CONSCIENCE ET DE RESPECTER NON SEULEMENT LA LEGISLATION
EN VIGUEUR, MAIS AUSSI LES REGLES DE L'HONNEUR, DE LA
PROBITE ET DU DESINTERESSEMENT, DE NE JAMAIS OUBLIER MA
RESPONSABILITE ET MES DEVOIRS ENVERS LE MALADE ET SA
DIGNITE HUMAINE; EN AUCUN CAS, JE NE CONSENTIRAI A UTILISER
MES CONNAISSANCES ET MON ETAT POUR CORROMPRE LES
MOEURS ET FAVORISER DES ACTES CRIMINELS, QUE LES HOMMES
M'ACCORDENT LEUR ESTIME SI JE SUIS FIDELE A MES PROMESSES,
QUE JE SOIS COUVERT D'OPPROBRE ET MEPRISE DE MES
CONFRERES SI J'Y MANQUE.

RESUME

L'infection à VIH qui se caractérise par une atteinte élective des lymphocytes T4, a donné de l'intérêt au phénotypage lymphocytaire, devenu un examen de routine. L'interprétation de toute analyse biologique, repose sur la comparaison des valeurs observées chez un sujet, aux valeurs de référence. Ces dernières sont soumises à des variations génétiques, climatiques et analytiques faisant qu'elles ne sont pas toujours superposables d'une population à une autre.

Cette étude visait, à partir du phénotypage lymphocytaire réalisé par cytométrie en flux chez 114 donneurs de sang, à déterminer les valeurs de référence des populations lymphocytaires de l'adulte Ivoirien. Nous avons également évalué l'influence de certains facteurs sur les taux des populations lymphocytaires.

Les résultats montrent que :

L'adulte Ivoirien a un taux moyen de 1002 lymphocytes T4 / μ l et 596 lymphocytes T8 / μ l de sang périphérique avec un indice d'immunorégulation moyen de 1,83. Le taux de leucocytes totaux est plus bas chez l'homme (5161 cellules/ μ l) que chez la femme (6202 cellules/ μ l).

L'âge et certains paramètres biologiques comme la protidémie, n'influencent pas le taux des populations lymphocytaires.

Ces résultats sont destinés d'une part à donner aux cliniciens locaux des repères indispensables à l'interprétation rationnelle du bilan immunitaire de l'adulte Ivoirien, et d'autre part à servir de base pour d'autres études.

Mots clés : Phénotypage lymphocytaire , Valeurs de référence , Adulte Ivoirien