

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**



ANNEE 1999

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDE APPROFONDIES**  
**DE BIOLOGIE**

Présenté par :

**Mamadou SARR**

Docteur en Pharmacie

**SUJET :**

**CARACTERISATION DES CONDITIONS DE CULTURE POUR  
L'INDUCTION D'UNE PRODUCTION D'ANTICORPS  
REACTIFS VIS-A-VIS D'ANTIGENES DES FORMES  
SANGUINES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* PAR DES  
LYMPHOCYTES B PROVENANT D'AMYGDALES  
PRELEVEES CHEZ DEZ SUJETS JEUNES  
DE LA REGION DE DAKAR**

Soutenu le 30 Juillet 1999 devant la Commission d'Examen :

<b>Président :</b>	<b>M. Bhen Sikina</b>	<b>TOGUEBAYE</b>	Professeur
<b>Membres :</b>	<b>M. Lamine</b>	<b>DIAKHATE</b>	Professeur
	<b>M. Doudou</b>	<b>BA</b>	Professeur
	<b>Mme. Aminata</b>	<b>SALL/DIALLO</b>	Maître de Conférences Agrégé
	<b>M. Cheikh Tidiane</b>	<b>BA</b>	Maître de Conférences Agrégé
<b>Directeur de Recherches :</b>	<b>M. Olivier</b>	<b>GARAUD</b>	Chef du Laboratoire d'Immunologie Clinique et Parasitaire - Institut Pasteur de Dakar.
<b>Co-Directeur :</b>	<b>Mme Aminata</b>	<b>SALL/DIALLO</b>	Laboratoire de Pharmacologie Pharmacodynamie et de Physiologie

ABREVIATIONS.....	7
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>PREMIERE PARTIE : .....</b>	<b>10</b>
<b>2 DONNÉES ACTUELLES SUR LES LYMPHOCYTES B ET LEURS CONDITIONS DE CULTURE.....</b>	<b>10</b>
2.1 DIFFÉRENTIATION LYMPHOCYTAIRE B DÉPENDANTE D'ANTIGÈNES THYMO-DÉPENDANTES : .....	10
2.2 DISTRIBUTIONS ET PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISÉS POUR LA CARACTÉRISATION DES POPULATIONS CELLULAIRES.....	13
2.3 CULTURE DES LYMPHOCYTES B .....	14
<b>DEUXIEME PARTIE.....</b>	<b>17</b>
<b>3 ETUDE DE LA PRODUCTION <i>IN VITRO</i> D'IMMUNOGLOBULINES À PARTIR DE CELLULES AMYGDALIENNES.....</b>	<b>17</b>
3.1 EXTRACTION DES CELLULES MONONUCLÉES AMYGDALIENNES EN PARTICULIER LYMPHOCYTAIRES.....	17
3.1.1 <i>Les prélèvements :</i> .....	17
3.1.2 <i>Réactifs utilisés.....</i>	17
3.1.3 <i>Isolement des cellules mononuclées .....</i>	17
3.2 CARACTÉRISATION DES POPULATIONS CELLULAIRES ISOLÉES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX... ..	19
3.2.1 <i>Principe :</i> .....	19
3.2.2 <i>Les marqueurs recherchés :</i> .....	19
3.2.3 <i>Technique de caractérisation des cellules.....</i>	20
3.3 CULTURE DES CELLULES ISOLÉES.....	21
3.3.1 <i>Matériels.....</i>	21
3.3.2 <i>Milieux et conditions de culture.....</i>	22
3.3.3 <i>Mise en culture cellulaire.....</i>	24
3.4 DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES PAR ELISA (ENZYMÉ LINKED IMMUNO-SORBANT ASSAY).....	24
3.4.1 <i>Choix de l'échantillonnage :</i> .....	25
3.4.2 <i>Principe:</i> .....	25
3.4.3 <i>Matériels de laboratoire.....</i>	25
3.4.4 <i>Tampons et réactifs.....</i>	26
3.4.5 <i>Méthode:</i> .....	28
3.5 MÉTHODES STATISTIQUES UTILISÉES POUR L'ANALYSE DES RÉSULTATS.....	29
<b>RESULTATS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....</b>	<b>30</b>
4.1 ISOLEMENT DES CELLULES.....	30
4.2 CARACTÉRISATION DES POPULATIONS CELLULAIRES ISOLÉES : .....	30
4.3 RÉSULTATS DU DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES .....	31
<b>5 ANALYSE DES RÉSULTATS.....</b>	<b>31</b>
5.1 RÉPARTITION CELLULAIRE DES ÉCHANTILLONS TRAITÉS .....	31

5.2	INDUCTION D'UNE PRODUCTION D'IMMUNOGLOBULINES PAR DES POPULATIONS CELLULAIRES ISSUES D'AMYGDALES PALATINES.....	32
5.3	INFLUENCE DE LA QUALITÉ DU SÉRUM DE VEAU FŒTAL SUR LA PRODUCTION D'IGG ET D'IGM. ....	33
5.4	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SVF SUR LA PRODUCTION D'IMMUNOGLOBULINES. ....	38
5.5	APPRÉCIATION DE LA PRODUCTION D'IGG / IGM EN RÉPONSE À LA STIMULATION DES CELLULES B AMYGDALIENNES PAR LES EXTRAITS D'HÉMATIES PARASITÉES PAR <i>P. FALCIPARUM</i> .....	43
5.6	APPRÉCIATION D'UNE MODIFICATION DU PROTOCOLE DE CULTURE CONSISTANT À LAISSER REPOSER LES CELLULES 18 HEURES AVANT D'EFFECTUER LA STIMULATION.....	44
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSION PAR RAPPORT A LA MISE EN ŒUVRE DU PROJET ET SES OBJECTIFS. ....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSION PAR RAPPORT A L'APPROCHE TECHNOLOGIQUE DU PROJET. ....</b>	<b>48</b>
7.1	LES MILIEUX DE CULTURE.....	48
7.2	LES ANTIGÈNES DE STIMULATION. ....	49
<b>8</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>50</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>55</b>

Je dédie ce travail

*A M. Marcel Claude PADONOU*

*A M<sup>lle</sup> Volimata CAMARA*

*A M<sup>lle</sup> Fatou Kiné SECK*

## *REMERCEMENTS*

Au Dr J.P. MOREAU, Directeur de l'Institut PASTEUR de DAKAR.

Au Dr Ronald PERRAUT.

A tout le personnel du Laboratoire d'Immunologie Clinique et Parasitaire.

A tout le personnel du service O.R.L. de l'Hôpital Principal de Dakar.

# A NOS MAITRES ET JUGES

**Au Professeur Doudou BA :**

*Nous avions beaucoup regretté votre absence lors de notre soutenance de thèse de Doctorat en Pharmacie. En vous reconduisant dans ce jury de mémoire, nous espérons vous le témoigner de notre attachement.*

*Soyez assuré, cher maître, de notre profond respect.*

**Au Professeur Lamine DIAKHATE :**

*C'est un grand plaisir, mais aussi un grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.*

*Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.*

**Au Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE**

*La disponibilité, l'humilité, vos connaissances étendues, pour ne citer que cela sont des qualités que nous avons appréciées lors de vos enseignements.*

*Nous vous prions de croire à l'expression de nos sentiments respectueux et de notre profonde gratitude.*

**A notre Maître le Professeur agrégé Aminata SALL/DIALLO**

*Vous nous avez mis le pied à l'étrier et depuis vous n'avez de cesse de nous encourager à persévérer dans cette voie longue et difficile. Votre amour du travail, vos connaissances étendues et vos qualités humaines forcent le respect et l'admiration de tous.*

*Soyez assuré, cher Maître, de notre éternelle reconnaissance.*

**Au docteur Olivier GARRAUD**

*Ce travail est le vôtre.*

*Votre rigueur scientifique et votre sens de la méthode sont les qualités qui nous ont le plus marqué lors de notre passage dans votre laboratoire.*

*Soyez assuré de notre profonde reconnaissance et de nos sincères remerciements.*

# Abbreviations

*Ac = Anticorps*

*Ag = Antigène*

*BSA = Bovine Serum Albumin*

*CD = Cluster of Differentiation*

*D.O. = Densité optique*

*EGF = Epidermal Growth Factor*

*E.L.I.S.A. = Enzyme Linked Immunosorbant Assay*

*Gp = Glycoprotéine*

*Ig = Immunoglobuline*

*IL = Interleukine*

*kDa = Kilodalton*

*µg = microgramme*

*µl = microlitre*

*ml = millilitre*

*n = nombre*

*nm = nanomètre*

*PBS = Phosphate Buffer Saline*

*P.f = Plasmodium falciparum*

*Th = lymphocyte T helper*

*TNF = Tumor Nevosis Factor*

# 1 INTRODUCTION

La réponse immunologique repose sur le système immunitaire qui est organisé en tissu et régulé par des processus physiologiques. Le substratum du système immunologique chez l'homme comprend les organes lymphoïdes : thymus, moelle osseuse hématogène, rate et ganglions lymphatiques (organes lymphoïdes secondaires). Parmi les organes lymphoïdes secondaires, on peut citer le tissu lymphoïde diffus, les follicules et les agrégats de follicules. Au niveau des agrégats de follicules, il convient de citer, en dehors des amygdales palatines et linguales, celles qui se trouvent dans l'arrière mur du pharynx. Ce sont ces dernières qui nous ont particulièrement intéressées au cours de ce travail.

Le fonctionnement de l'immunité spécifique humorale repose directement sur l'activité des lymphocytes B et l'absence d'immunité stérilisante chez l'homme contre l'agent du paludisme a été le principal moteur de la recherche de candidats vaccins dirigés contre *Plasmodium falciparum*. La mise au point d'un modèle expérimental justifie la caractérisation des conditions de production *in vitro* d'immunoglobulines protectrices contre ce parasite. Pour cela, tout en essayant de tirer parti du statut immunitaire de sujets jeunes amygdalotomisés, plusieurs conditions de culture ont été prévues :

- D'abord sans stimuli ;
- Ensuite, avec des "premiers " stimuli polyclonaux (SAC, anti- $\mu$ ...),
- Enfin, les "seconds" signaux nécessaires à l'induction de la production d'immunoglobulines sont fournis par des lymphocytes T (interaction T-B) et par des cytokines (dont certain ont un effet prolifératif important dans un tel système).

De nombreux travaux ont permis d'apprécier les conditions de production d'anticorps réactifs vis-à-vis d'antigènes des formes sanguines de *Plasmodium falciparum* par des lymphocytes B du sang périphérique provenant de sujets à priori immuns pour ce parasite. (11, 12)



Par rapport à ces travaux, on a cherché à déterminer si les amygdales pouvaient représenter une source "intéressante" de cellules sensibilisées par des antigènes de *Plasmodium falciparum*, utilisables et utiles pour des travaux ultérieurs de préférence au sang périphérique, forcément plus limité en nombre de cellules et d'apprécier si les lymphocytes B d'origine amygdalienne peuvent représenter une source potentielle de cellules permettant l'étude du répertoire B d'épitopes de *P. falciparum*.

La mise en œuvre d'un tel projet a nécessité :

- L'isolement et la caractérisation des cellules tonsillaires provenant de sujets *a priori* immuns pour *Plasmodium falciparum* dans le but de leur utilisation comme modèle expérimental.
- La sélection, parmi plusieurs, d'une condition optimale de culture et de différenciation capable de favoriser *in vitro* la production, par les lymphocytes B, d'anticorps réactifs vis à vis des formes sanguines de *Plasmodium falciparum*.
- L'estimation de l'intensité de la production *in vitro* d'anticorps polyréactifs anti-*Plasmodium falciparum* des lymphocytes B amygdaliens suite à leur exposition à des antigènes solubles de ce parasite et à des facteurs de différenciation non spécifiques tels que les cytokines humaines recombinantes et à des agents chimiques et/ou biologiques potentialisant la réponse lymphocytaire.

## **PREMIERE PARTIE :**

### **2 Données actuelles sur les lymphocytes B et leurs conditions de culture.**

#### **2.1 Différenciation lymphocytaire B dépendante d'antigènes thymo-dépendantes :**

La différenciation lymphocytaire B thymo-dépendante est contrôlée par deux types de signaux, un stimulus déclenché par la reconnaissance de l'antigène via le récepteur B de la cellule, et un ensemble de stimuli déclenchés par les lymphocytes T activés.

Les signaux lymphocytaires T sont de deux ordres, membranaires et solubles ou sécrétés.

La situation typique est la suivante : une protéine exogène (thymo-dépendante) va être captée par une cellule présentant l'antigène (qui peut être un lymphocyte B), qui l'apprête et la présente sous forme de peptides à sa surface dans le contexte des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dont le récepteur T est spécifique du peptide présenté va lier ce peptide - toujours dans le contexte de la double reconnaissance des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité -; ce processus va déclencher une série d'opérations aboutissant à la synthèse et à l'expression de molécules exportées à la membrane des cellules et qui sont soit ancrées dans celles-là (molécules membranaires) soit sécrétées à l'extérieur.

Dans le cas particulier du lymphocyte B, la double reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T et par le lymphocyte B, via leurs récepteurs spécifiques pour l'antigène, va déclencher une série d'événements cellulaires et moléculaires aboutissant (i) à la synthèse, par chacun des deux types cellulaires, de molécules de membranes, qui peuvent être caractéristiques de l'état « activé » de la cellule ou qui peuvent tout simplement être

« hyperexprimées », et (ii) à la synthèse et au relargage de médiateurs comme des cytokines ou des interleukines.

Un certain nombre de molécules lymphocytaires T et B vont se comporter comme des récepteurs-ligands les unes par rapport aux autres et être étroitement cohésives. Parmi les tandems moléculaires les plus importants en ce qui concerne l'activation lymphocytaire B-T, on note les molécules CD40 qui sont normalement exprimées par les lymphocytes B (comme d'ailleurs par les autres cellules présentant l'antigène) et les molécules CD40L (L pour ligand) qui sont exprimées par les lymphocytes T activés.

Les lymphocytes T activés vont par ailleurs sécréter une gamme de cytokines variable selon la famille de différenciation à laquelle appartient ce lymphocyte T (Th0, Th1 ou Th2).

Le lymphocyte B activé exprime à sa surface un grand nombre de récepteurs liant les cytokines sécrétées - entre autres - par les lymphocytes T activés, et le processus d'activation-différenciation va pouvoir s'amplifier. La conjonction de ces signaux va faire que le processus de différenciation du lymphocyte B va se poursuivre, et que le lymphocyte B va pouvoir se différencier soit en cellule sécrétant des Ig (après réarrangement des gènes codant pour les Ig d'une sorte et d'une seule), soit en cellule B mémoire. Le lymphocyte B différencié en plasmocyte va sécréter des Ig d'une seule classe et sous-classe d'Ig qui va lier spécifiquement l'antigène pour lequel le récepteur B de ce lymphocyte a été sélectionné. Un certain nombre de lymphocytes B possèdent, en effet, un récepteur B capable de lier spécifiquement une protéine donnée, cette notion est connue sous le nom de répertoire B. Les lymphocytes B qui n'ont pas encore réarrangé leurs gènes codant pour la synthèse des Ig sont dits naïfs, ce n'est pas pour autant qu'ils sont incapables de lier un antigène ; ces lymphocytes B naïfs expriment à leur surface une chaîne  $\mu$  et une chaîne  $\delta$  ; après différenciation - comprenant le réarrangement des chaînes lourdes des Ig - le clone de lymphocytes B issu de l'activation du lymphocyte naïf ayant lié l'antigène en question, produira un seul type d'Ig.

Plusieurs clones de lymphocytes B peuvent produire plusieurs types d'Ig de classes et de sous-classes différentes. Au fur et à mesure de la restimulation par l'antigène, le nombre de classes différentes d'Ig capables de lier un antigène donné a des chances d'être moindre et l'affinité des anticorps résultant de la différenciation terminale des lymphocytes est de plus en plus forte.

Les Ac spécifiques d'un antigène donné de chacune des classes et sous-classes sont capables de lier le même antigène (quoique avec des avidités ou des affinités différentes) ; cependant, la fonction effectrice de ces différents anticorps a des chances d'être différente, compte tenu des propriétés biologiques propres à chacune des classes et sous-classes d'Ig.

La résultante en terme d'efficacité des Ac s'estime donc non seulement en quantité mais aussi en qualité d'anticorps produits.

Un certain nombre de cytokines est capable d'agir au niveau du réarrangement des gènes d'Ig et donc d'influencer la qualité des anticorps produits. De plus, la plupart des cytokines connues ont un effet positif ou négatif sur l'activation, la multiplication et/ou la différenciation des lymphocytes B, certaines cytokines étant des « molécules lymphocytaires B puissantes », d'autres étant des « molécules B mineures ».

Parmi les cytokines exerçant un rôle puissant sur la différenciation des lymphocytes B on cite : l'IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-15... Les cytokines capables d'agir sur la commutation isotypique (réarrangement des gènes codant pour les différents Ig) sont : l'IL-4, IL-10, IL-13 et IFN- $\gamma$ . C'est ainsi que, *in vitro*, on peut mimer la différenciation lymphocytaire B pour des cellules B purifiées, en stimulant les molécules membranaires CD40 et les récepteurs pour les cytokines, en cultivant les cellules B avec des Ac anti-CD40 ou des molécules CD40L solubles qui vont lier les molécules membranaires CD40, et avec différentes cytokines telles que l'IL-4 ou l'IL-10 ; ces molécules, en liant les récepteurs spécifiques sur le lymphocyte B, vont transduire des signaux membranaires d'activation puis de différenciation cellulaire, aboutissant à la synthèse d'Ig. (10)

## 2.2 Distributions et propriétés des anticorps monoclonaux utilisés pour la caractérisation des populations cellulaires.

- **CD3 :**

L'anticorps CD3 dirigé contre l'antigène CD3 reconnaît une population cellulaire T mûre représentant 70 à 80 % des lymphocytes du sang périphérique des sujets sains. (21)

- **CD19 :**

L'antigène CD19 caractérise toutes les cellules B y compris les cellules B précoces, hormis les plasmocytes. L'antigène CD19 est retrouvé à la surface des cellules dendritiques folliculaires et sur les cellules précoces de la lignée myélomonocytaire.

Des études in vitro montrent que les anticorps anti-CD19 ont un effet inhibiteur sur l'activation et la prolifération des cellules B. Ils inhibent notamment la réponse des cellules B à la co-stimulation par les anti-immunoglobulines et l'interleukine 4 (IL-4). (20)

- **CD40 :**

La recherche d'anticorps monoclonaux agonistes pour l'activation B a abouti à l'identification de CD40, membre de la famille Fas, CD30, TNF-R, etc., par son domaine extracellulaire, mais possédant des différences dans le domaine intracellulaire de la protéine. CD40 interagit avec son ligand exprimé à la surface des lymphocytes T activés : CD40L (gp39) faisant partie de la famille de Fas-L, TNF, ...

La culture de lymphocytes B en présence de fibroblastes transfectés par un FcR, l'anticorps anti-CD40 et de l'IL4 constitue une technique de choix pour l'expansion quasi-illimitée de lymphoblastes B.(1,2)

- **IgM :**

D'un poids moléculaire de 870 kDa, ce sont les immunoglobulines les plus volumineuses. Elles sont constituées de 5 monomères  $\mu_2[\kappa]_2$  ou  $\mu_2[\lambda]_2$  reliés entre eux par des ponts disulfures. Chaque pentamère renferme une chaîne supplémentaire, la chaîne J, d'un poids moléculaire de 15

kDa, et qui en assure la cohésion par la formation de ponts disulfures. Elles représentent environ 10 à 15% des immunoglobulines circulantes et sont fortement glycosylées, les résidus sucrés atteignent 10% de la masse totale. Les IgM fixent le complément et sont d'excellents agglutinants. Sur le plan physiologique, ce sont elles qui apparaissent d'abord lors d'une première immunisation.

Elles ne franchissent pas la barrière placentaire. (15)

- **IgG :**

Les IgG constituent les anticorps "conventionnels" protecteurs. Majoritaires dans le sérum – elles représentent 70 % des immunoglobulines totales – elles n'apparaissent pas immédiatement lors de la première stimulation par l'antigène, étant précédé par un premier pic assez éphémère de production d'IgM. En revanche, elles sont produites et seules en réponse secondaire. Capables de franchir la barrière placentaire, et à ce titre d'exercer une protection chez le fœtus, elles sont capables de fixer le complément. Elles comportent 2 chaînes [gamma] et 2 chaînes légères [kappa] ou [lamda]. A noter enfin qu'il existe 4 sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) qui ont entre elles des différences mineures de structure et de fonction. (15, 5)

### **2.3 Culture des lymphocytes B**

L'activation des lymphocytes B avec des molécules telles que les activateurs polyclonaux, [Anticorps anti fragment  $\mu$  humain (anti- $\mu$ ) ou *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC)], capables de stimuler le récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BcR) permet généralement leur maturation et leur différenciation, processus pouvant être étudié *in vitro*. (4)

Le BcR est un complexe multimoléculaire membranaire participant à la transduction du signal. Le pontage des immunoglobulines membranaires permet de mimer le phénomène de reconnaissance antigénique. A un faible niveau de pontage (occupation des mlg < 10% ), il n'y a pas de signal de prolifération. Au-delà, un signal prolifératif est donné. En fait, un deuxième signal est requis et apporté par le lymphocyte T activé. Ainsi dans la plupart des situations expérimentales, l'activation B requiert une coopération entre T et B.

La capacité des lymphocytes T activés à contribuer à l'activation polyclonale des lymphocytes B est communément appelée effet "bystander" ou de proximité. La question centrale au cours de la coopération T-B est celle d'assurer le maintien de l'information "spécificité pour l'antigène" dans un processus de communication cellulaire où les partenaires ne voient pas le même antigène de la même façon. (22)

Aussi, pour que le système immunitaire puisse fonctionner, il est indispensable que les cellules qui le forment puissent communiquer entre elles. Pour y parvenir, les cellules doivent se reconnaître et s'adresser des messages. La reconnaissance se fait par l'intermédiaire de récepteurs. Des messages non spécifiques sont portés par des protéines de petite taille appelées lymphokines, lorsqu'elles sont produites par des lymphocytes, et plus généralement cytokines, car produites par des cellules.

Certaines de ces interleukines ont été utilisées dans nos différentes conditions de culture et quelques-unes de leurs propriétés biologiques ont été décrites par rapport aux lymphocytes B.

- **L'interleukine 2** induit la prolifération des lymphocytes B stimulés par l'antigène ou des activateurs polyclonaux (anti- $\mu$ , SAC, LPS). Elle autorise la production par ces cellules d'immunoglobulines de type IgM, IgG et IgA.

Dans le système d'activation des lymphocytes B via l'antigène CD40, l'IL2 n'a par elle-même qu'un effet mineur. Cependant elle agit en très forte synergie avec l'IL10 pour induire la prolifération à long terme et la différenciation cellulaire. L'effet de l'IL10 est d'augmenter la densité des récepteurs de haute affinité pour l'IL2.

L'effet le plus marqué de l'IL2 est observé dans le système dépendant des lymphocytes T activés. L'IL2, produite essentiellement par la population de TH1, a un effet majeur sur la prolifération et la différenciation des (IgM, IgG, IgA) des lymphocytes B. Dans aucun de ces systèmes l'IL2 n'est capable d'influencer la commutation isotypique. (6, 9, 17).

- **L'Interleukine 6** n'agit que sur les cellules B activées puisque les lymphocytes B au repos sont dépourvus de récepteurs pour l'IL-6. Ainsi, elle n'est pas impliquée dans l'activation précoce, ni dans la prolifération des cellules B. Cependant en tant que facteur de maturation terminale,

L' IL6 va accroître la production d'immunoglobulines aussi bien d'IgM, d'IgG que d'IgA. Produite par les cellules présentant l'antigène et les lymphocytes Th<sub>2</sub>, l'IL6 agit de concert avec les autres cytokines dans la différenciation des lymphocytes B et la production des anticorps (16,18).

- **L'Interleukine 10** est un facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes B. Bien que l'IL10 ne stimule pas la prolifération des lymphocytes B au repos, elle induit une nette augmentation de la viabilité de ces cellules cultivées *in vitro* (8, 14).

Des études ont démontré que l'IL10 était également un facteur de prolifération et de différenciation des lymphocytes B humains activés par *staphylococcus aureus* (SAC) ou par des anticorps anti-CD40. L'IL10 entraîne une prolifération importante de ces cellules ainsi stimulées, ainsi que la différenciation de ces lymphocytes en cellules produisant des IgG, IgM et IgA. (7,10, 23)



## DEUXIEME PARTIE

### 3 Etude de la production *in vitro* d'immunoglobulines à partir de cellules amygdaliennes.

#### 3.1 Extraction des cellules mononuclées amygdaliennes en particulier lymphocytaires.

La technique utilisée pour l'isolement des lymphocytes totaux à partir des amygdales est celle pratiquée selon le protocole en vigueur au niveau du laboratoire.

##### 3.1.1 Les prélèvements :

Les amygdales proviennent de population jeune, de milieu urbain et dont l'âge moyen est de 11 ans, exposée à plasmodium falciparum de façon modérée et épisodique.

Elles ont été collectées à l'Hôpital Principal de Dakar (Service O.R.L) sur la période de novembre 1998 à mai 1999 et acheminées dans un milieu de survie approprié au laboratoire où elles sont immédiatement traitées.

##### 3.1.2 Réactifs utilisés

- RPMI:

Hèpes	20 ml
Bicarbonate de sodium	2 g
Pyrivate	10 ml
Gentamicine	2.5 ml
Péni-streptomycine	5 ml
RPMI poudre 1640 (+L-Glutamine	10.44 g
QSP	1 Litre

- HISTOPAQUE : Milieu de séparation des lymphocytes (d = 1,077), Solution prête à l'emploi (EUROBIO® SIGMA 1077).

##### 3.1.3 Isolement des cellules mononuclées .

Les principales étapes de l'isolement des lymphocytes totaux à partir de prélèvements amygdaliens peuvent être résumées ainsi :

- Préparation de la suspension cellulaire totale.

Les amygdales sont déposées dans une boîte de Pétri stérile contenant environ 20 ml de solution de RPMI.

Elles sont ensuite débarrassées de la graisse qui les entoure à l'aide de pinces Kocher et de lames de bistouri.

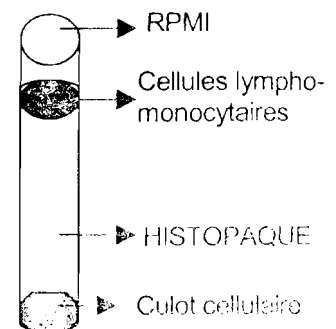
Les cellules amygdaliennes sont ensuite récupérées par grattage grâce à un scalpel puis la suspension cellulaire obtenue est aspirée à l'aide d'une pipette Pasteur puis filtrée de manière à retenir les grumeaux qui seront ensuite broyés par écrasement à l'aide d'un pilon dans le but de récupérer le maximum de cellules au niveau du filtrat.

- Séparation des cellules par gradient de densité.

Un volume du filtrat (environ 35 ml) est délicatement déposé sur de l'HISTOPAQUE (15 ml) contenu dans un tube à fond rond de 50 ml, puis centrifugé à 1800 tours / mn pendant 30 mn.

On obtient :

- En haut du RPMI
- A l'interface les cellules lympho-monocytaires
- En bas l'HISTOPAQUE et le culot cellulaire.



L'anneau de cellules lympho-monocytaires est ensuite prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur puis repris dans du RPMI (5 ou 10 ml) et centrifugé à 1700 tours / mn pendant 15 mn.

On obtient un culot qui est repris dans du RPMI et les cellules viables (lympho et monocytes) sont comptées au microscope (grossissement 40) en présence du Bleu Trypan suivant la formule :

$$N = X \times 1000 \times \text{Volume de reprise} \times \text{facteur de dilution}$$

N = nombre de cellules mono-lymphocytaires totales dans la suspension cellulaire.

X = nombre de cellules comptées au microscope.

### **3.2 Caractérisation des populations cellulaires isolées par Cytométrie de flux.**

#### **3.2.1 Principe :**

Cette technique permet de donner des informations sur chaque cellule passant individuellement dans une gaine liquide devant un faisceau laser. Ces informations portent sur la taille de la cellule et sur sa granulométrie. De plus, si les cellules ont été incubées avec un anticorps marqué à un fluorochrome, il est possible de visualiser les populations cellulaires marquées et non marquées et de quantifier ce marquage. Il est possible de réaliser des doubles ou des triples marquages en utilisant 2 ou 3 anticorps marqués par des fluorochromes différents.

L'analyse électronique de ces différents signaux permet de différencier dans les leucocytes, la ou les populations qui nous intéressent.

#### **3.2.2 Les marqueurs recherchés :**

Les principales étapes de la différenciation B peuvent être suivies par l'acquisition de marqueurs et par l'expression d'immunoglobulines membranaires à la surface des lymphocytes B. Différents marqueurs permettent de distinguer des stades distinctifs de différenciation et plusieurs anticorps monoclonaux peuvent permettre de détecter leur présence. Ce sont des anticorps monoclonaux pour techniques en suspension cellulaire, c'est-à-dire couplés à l'isothiocyanate de Fluorescéine (FITC) qui donne une fluorescence verte aux populations cellulaires marquées ou à la Phycoérythrine (PE) qui en donne une fluorescence rouge. Les principaux anticorps utilisés sont :

- L'anticorps CD3 (PE) : spécifique des lymphocytes T matures.
- L'anticorps CD19 (FITC) : spécifique des cellules B.
- L'anticorps CD40 (FITC) : marqueur spécifique des CPA dont les lymphocytes B.

- Les immunoglobulines G (PE) et les immunoglobulines M (FITC)

### 3.2.3 Technique de caractérisation des cellules.

#### 3.2.3.1 Préparation des cellules

- Remettre en suspension le culot obtenu par *Ficoll* dans 2ml de RPMI contenu dans un tube à centrifuger (fond conique).
- Compléter avec la solution de lavage (PBS / BSA 1% + Azide de Na 0,1%).
- Centrifuger à 2000 tours / mn pendant 5 mn
- Reprendre le culot avec 1 ml de PBS / BSA +Azide de Na ; Y ajouter 100 microlitres de sérum AB (permet la saturation des liaisons non spécifiques) et compléter à 15 ml avec la solution PBS / BSA +Azide de Na.
- Centrifuger à 2000 tours/mn pendant 5 mn
- Ajuster le culot à la concentration de 1 million de cellules / ml.

#### 3.2.3.2 Marquage avec les anticorps monoclonaux

Pour un échantillon

- Répartir dans 2 tubes *Eppendorf* 100µl de la suspension cellulaire (un tube test et un tube témoin).
- Dans le tube test, ajouter 2,5 µl de la solution d'anticorps conjugués à tester.
- Incuber les tubes *Eppendorf* à +4°C pendant 30 mn à l'obscurité.
- Laver 2 fois en utilisant: 1 ml de PBS/BSA;AZIDE DE NA par centrifugation et élimination du surnageant par aspiration.
- Remettre les cellules en suspension dans 200 µl. de Tampon fixateur ou de formaldéhyde (0,5 à 1,5%).
- Analyser au cytofluorographe.

### 3.3 Culture des cellules isolées

#### 3.3.1 Matériels

##### 3.3.1.1 Matériels de laboratoire

- Plaques de culture FALCON<sup>®</sup> MULTIWELL<sup>™</sup> pour culture de tissus, 48 puits à fond plat avec couvercle afin de limiter l'évaporation.
- Tubes de 50 ml-
- Pipettes : 20, 200, 1000µl et pipette «multicanaux » de 200 µl  
( *Gilson Medical Electronics S.A., Villiers-le-Bel, France* )
- Cônes jaunes et bleus (*Gilson Medical Electronics S.A., Villiers-le-Bel, France* )
- Microtubes (*AVS Nunc. Kamstrup, Denmark* )

##### 3.3.1.2 Matériels biologiques

- Milieu ISCOVE
- Cycloheximidine
- **Extraits de Schizontes** : Ils sont obtenus à partir de la culture de lignées de *Plasmodium falciparum* jusqu'au stade de schizontes. Après centrifugation le culot est récupéré puis congelé. L'opération est recommencée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un bon stock. On procède ensuite à un "effet-dose" pour déterminer la dilution de travail (de 1/200<sup>e</sup> à 1/2000<sup>e</sup>).

### 3.3.2 Milieux et conditions de culture

Le milieu de base est de l'ISCOVE supplémenté en acides aminés, antibiotiques, antifongiques et tampons dans les proportions suivantes.

• L-GLUTAMINE 1%	5ML/500ML
• AA NON ESSENTIELS 1	5ML/500ML
• TRANSFERRINE-SELENIUM 1% -INSULINE	5ML/500ML
• PREISREPTOMYCINE 0,5 %.	2,5ML/500ML
• GENTAMYCINE 0,5	2,5ML/500ML
• FUNGISONE 0,5	2,5ML/500ML
• HEPES 2	10 ML/500ML

Nous avons étudié :

#### 3.3.2.1 L'influence de la qualité du sérum de veau foetal et de sa concentration sur la production d'immunoglobulines.

Les principaux sérums étudiés (codifiés par les lettres de l'alphabet) sont :

- **Sérum A** : Référence 010062; lot 051711; EUROBIO ®
- **Sérum B** : Référence 010062 ; lot 941338 ; EUROBIO ®
- **Sérum C** : South america ; lot 40G388K;GIBCO BRL®
- **Sérum D** : USA ; lot 3016000A; GIBCO BRL®
- **Sérum E** : Paris; lot STF 421; VALBLOTECH ®
- **Sérum F** : Paris; lot STF 131; VALBLOTECH ®
- **Sérum G** : Paris; lot 50110550180; VALBLOTECH ®
- **Sérum H** : USA; lot 38H3372; SIGMA CELL CULTURE ®
- **Sérum I** : Deisenhofen ; lot 76H3380 ; SIGMA CELL CULTURE
- **Sérum T** : sérum de référence du laboratoire pris comme témoin et utilisé pour la culture des lymphocytes sanguins.

Les milieux de culture ont été préparés à trois concentrations différentes pour chaque lot de sérum : les proportions et les volumes finaux sont résumés dans le tableau ci-après :

**Tableau I : Principales concentrations des milieux de culture utilisés.**

	ISCOVE COMPLET	FCS	TOTAL
MILIEUX 7,5% SVF	111 ml	9 ml	120 ml
MILIEUX 10% SVF	108 ml	12 ml	120 ml
MILIEUX 12,5% SVF	105 ml	15 ml	120 ml

### 3.3.2.2 L'influence de la condition de culture.

Plusieurs conditions de culture ont été prévues pour l'étude de la production des immunoglobulines à partir des lymphocytes tissulaires.

- **Condition 1** : cellules seules
- **Condition 2** : cellules + anti- $\mu$  (10  $\mu\text{g/ml}$  final) +IL2 (100 UI/ml)
- **Condition 3** : cellules +IL10 (100 UI/ml)
- **Condition 4** : cellules + IL2 +IL10 (100 et 100 UI/ML)
- **Condition 5** : cellules + SAC (1/10000 final) + IL2 (100UI/ml)
- **Condition 6** : cellules + IL2 (100UI/ml)
- **Condition 7** : cellules +IL10 (100 UI/ml) + IL6 (50  $\mu\text{g/ml}$  )
- **Condition 8** : cellules + extraits de schizontes (10  $\mu\text{g/ml}$ ) +IL2 (100UI/ml)
- **Condition 9** : cellules + extraits de schizontes (10  $\mu\text{g/ml}$ ) + IL2 +IL10 + IL6 (50  $\mu\text{g/ml}$  )
- **Condition 10** : cellules + cycloheximidine (100  $\mu\text{g/ml}$  )

### 3.3.3 Mise en culture cellulaire

- Décongeler les sérums de veau
- Inactiver les sérums à 56°C.
- Mettre en culture les cellules

Les cellules ont été distribuées à la concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules /ml de milieu de culture.

Les volumes de distribution ont été de 10 $\mu$ l pour les stimuli polyclonaux et les cytokines, 100 $\mu$ l pour les cellules mononuclées et 1ml pour le milieu ISCOVE.

Les principales étapes de cette culture cellulaire peuvent être résumées ainsi :

- 1) Préparer les concentrations finales des différentes conditions de culture.
- 2) Numéroter et identifier les plaques de 48 puits.
- 3) Répartir les différentes conditions de culture.
- 4) Répartir les différents milieux de culture dans chaque puits.
- 5) Mettre à l'étuve à 37°C, sans CO<sub>2</sub> et en atmosphère humide pendant 10 jours.

### 3.4 Dosage des immunoglobulines par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

Il consiste en la détection des immunoglobulines polyspécifiques dans les surnageants de culture et des immunoglobulines spécifiques anti-antigène de *Plasmodium falciparum*.



### 3.4.1 Choix de l'échantillonnage :

Les surnageants de culture cellulaire ont été testés en *duplicate*.

Les différents témoins (milieu conjugué, milieu étudié, contrôle positif) ont également été testés systématiquement sur chaque plaque.

Les résultats du dosage des immunoglobulines de type M et G sont exprimés en densité optique (D.O) ou en ratio de D.O par méthode ELISA selon le protocole en vigueur au niveau du laboratoire.

### 3.4.2 Principe:

L'ELISA est une technique immunoenzymatique qui permet de mesurer une liaison entre un antigène et un anticorps. L'antigène ou (l'anticorps) est fixé sur une phase solide (immunoabsorbant) qui permet de capter l'anticorps (ou l'antigène) de la solution à tester. L'addition d'immunoglobulines hétérologues, conjuguées à une enzyme, permet la transformation d'un substrat chromogène en produit coloré dont l'intensité mesurée en densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps ou d'antigènes fixés.

### 3.4.3 Matériels de laboratoire.

- Tubes de 50 ml
- Plaques IMMULON-4<sup>®</sup> (*Dynatech, Springfield, VA, USA*) pour ELISA.
- Plaques MaxiSorp<sup>®</sup> (*Dynatech, Springfield, VA, USA*) pour ELISA.
- Pipettes : 20, 200, 1000µl et pipette «multicanaux» de 200 µl (*Gilson Medical Electronics S.A., Villiers-le-Bel, France*)
- Cônes jaunes et bleus (*Gilson Medical Electronics S.A., Villiers-le-Bel, France*)
- Microtubes (*A/S Nunc, Kamstrup, Denmark*)
- Laveur de plaque automatique, *Titertek Microplate-Washer. 120.*

- Lecteur de plaque : Spectrophotomètre, *Titertek-Multiskan-MCC/340* et *Logiciel DIGI-WIN*
- Centrifugeuse à godets flottants.

#### 3.4.4 Tampons et réactifs.

- Tampon de "coating" : Tampon carbonate/bicarbonate pH 9,6 (Tampon de dilution de l'antigène)

Carbonate de sodium 0.01 5M anhydre	1,5 g
(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)	
Bicarbonate de sodium 0,035 M	2,93 g
(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)	
Azide de sodium	0,2 g
(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)	
Eau distillée qsp	1000 ml
( conservée 15 jours à +4° C )	

- Tampon de lavage phosphate/ Tween 20: pH 7,2

Soit:

Chlorure de sodium:	8 g
( Prolabo, Paris, France)	
Phosphate disodique anhydre:	1,07 g
( Prolabo, Paris, France)	
Phosphate monosodique anhydre :	0,307 g
( Prolabo, Paris, France)	
Tween 20 (Polysorbate 20):	0,5 ml

(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)

ou du PBS (phosphate Buffer Saline ) (Biolyon, England)

Eau distillée : 1000 ml

- Tampon de saturation

Tampon PBS + BSA 5% (Bovine Serum Albumin)

(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)

- Tampon de dilution des antigènes

PBS + 0,1 % Tween-20 +1% BSA

- Conjugués

Anticorps de chèvre couplés à la peroxydase reconnaissant la Fc des IgG d'humain (Cappel, NC, USA)

- Solution de révélation: Ortho-Toluidine (O-T) / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(Sigma Chemical Cie, Saint-Louis, USA)

On dissous 5 mg d'O-T dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide puis on ajoute 30 ml de tampon citrate / acide chlorhydrique pH 4 et 12 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10%.

La solution obtenue doit être parfaitement incolore et être conservée à + 4°C à l'obscurité (verre inactinique). Tampon pH 4

- Acide citrique, 1H<sub>2</sub>O: 11,77 g

- Hydroxyde de sodium 4,48 g

- Eau distillée 1000 ml

- Acide chlorhydrique: quelques gouttes pour ajuster le pH à 4 ( Prolabo, Paris, France)

- Solution d'arrêt

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Prolabo, Paris, France)

#### 3.4.5 Méthode:

- **Sensibilisation ou "coating"** : Les plaques de type Immulon-4® ont été sensibilisées par des anti-IgM ou anti-IgG d'humains dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans le tampon carbonate/bicarbonate pour obtenir une concentration de 1µg/ml. Les plaques de type MaxiSorp® ont été sensibilisées par des extraits de schizontes dilués au 1/500<sup>ème</sup> dans le tampon carbonate/bicarbonate pour obtenir une concentration de 10 µg/ml. Les plaques sont recouvertes de ruban adhésif puis incubées à +4°C pendant une nuit.
- **Lavage** : Les plaques sont lavées automatiquement par remplissage des puits avec un tampon de lavage, 3 fois pour un cycle de lavage.
- **Saturation** : Les plaques sont saturées avec le tampon de saturation (200µl dans chaque puits) et incubées à 37°C pendant 1 heure.
- **Incubation des surnageants de culture** : Les plaques sont retournées pour éliminer le tampon de saturation puis lavées. Les surnageants non dilués et les témoins sont distribués à raison de 50 µl/puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 heure 30 minutes
- **Lavage** : Un cycle de lavage (3 fois)
- **Incubation du conjugué** : Les Ac de chèvres couplés à la peroxydase reconnaissant le Fc des Ig d'humain sont dilués dans du PBS/0,1% Tween-20/0,1%BSA au 1/6000<sup>ème</sup> et distribués dans chaque puits à raison de 50µl /puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 heure.
- **Lavage** : Un cycle de lavage (3 fois)
- **Révélation** : Un volume de 50 µl de réactif de coloration préparé extemporanément (Ortho-Toluidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est déposé dans chaque puits. Il

apparaît au bout de 5 à 15 mn une coloration bleu azur. L'addition de 50  $\mu$ l par puits de solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vire la coloration au jaune-citron. La D.O est lue au spectrophotomètre à 450 nm.

### **3.5 Méthodes statistiques utilisées pour l'analyse des résultats.**

Le logiciel Statview 4.1<sup>®</sup> a servi à l'ensemble de l'analyse statistique.

Les comparaisons des réponses de la production d'immunoglobulines pour les trois concentrations de travail (7.5, 10 et 12.5%) ont été réalisées à l'aide du test de  $\chi^2$ .

Les comparaisons des moyennes de la production d'anticorps sous l'influence des dix sérums étudiés ont été effectuées par le test H de Kruskal & Wallis (test non paramétrique permettant de déterminer la liaison entre un caractère quantitatif et un caractère qualitatif à k classes sans rien exiger des lois de probabilités des variables considérées).

# RESULTATS

## 4 Présentation générale des résultats.

### 4.1 Isolement des cellules.

Les résultats de l'isolement des cellules représentent la moyenne  $\pm$  écart-type des résultats obtenus à partir des 10 amygdales.

Tableau II : Résultats de l'isolement des cellules amygdaliennes.

Amygdales	Sexe	Age	Nombre de cellules obtenues
Amygdale 1	M	6 ans	840 millions
Amygdale 2	M	7 ans	1400 millions
Amygdale 3	F	12 ans	630 millions
Amygdale 4	F		780 millions
Amygdale 5	F	36 ans	980 millions
Amygdale 6	M		1296 millions
Amygdale 7	F	5 ans	726 millions
Amygdale 8	F	20 ans	915 millions
Amygdale 9	F	6 ans	1100 millions
Amygdale 10	F	11 ans	818 millions

Soit un total de 983,88 millions de cellules  $\pm$  235,87.

### 4.2 Caractérisation des populations cellulaires isolées :

Les résultats du marquage des lymphocytes sont présentés en terme d'analyse des populations cellulaires obtenues par diffraction (FSC-Height) par le cytofluorographe et de l'analyse monoparamétrique des populations lymphocytaires marquées par les différents fluorochromes : FL1-Height représentant le logarithme de l'intensité de la fluorescence verte (FITC) et FL2 – Height celui de la fluorescence rouge (PE).

Les proportions relatives des différentes populations cellulaires marquées sont consignées au niveau de la figure 1 (annexe).

### **4.3 Résultats du dosage des immunoglobulines**

Deux séries de dosage des immunoglobulines par méthode ELISA ont été effectuées sur l'ensemble des dix amygdales traitées dans cette étude, à savoir le dosage des IgM et des IgG.

Pour chaque amygdale, les résultats de la densité optique du dosage des immunoglobulines pour les différents sérums étudiés en fonction des trois concentrations de travail (7,5%, 10% et 12,5%) et pour les dix conditions de culture sont présentés au niveau des tableaux III ainsi que leur valeur moyenne (annexe).

Le résultat du dosage des amygdales 8, 9 et 10 suite à une modification du protocole en laissant les cellules reposées pendant 18 heures sont consignés en annexe (**Tableau IV**).

Les résultats de l'influence des différentes conditions de culture sont représentés au niveau des figures 2 et 3. (annexe)

## **5 Analyse des résultats.**

### **5.1 Répartition cellulaire des échantillons traités**

- 1) Nous avons cherché à analyser la répartition cellulaire des échantillons amygdaliens traités afin de savoir quelles étaient les proportions relatives de lymphocytes T, de lymphocytes B et éventuellement d'autres populations cellulaires.
- 2) Nous avons pour cela marqué les populations à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblés pour la reconnaissance de certains antigènes de différenciation des leucocytes humains, en particulier lymphocytaires.
- 3) Nous avons analysé la répartition moyenne des lymphocytes B (CD19 – CD40) et des lymphocytes T (CD3). La représentation moyenne des lymphocytes B est de  $43.5 \pm 7.3\%$  et celle des lymphocytes T est de  $38.9 \pm 9.5\%$ .

Au sein des populations B, nous avons cherché à apprécier la répartition des sous-populations sIgM<sup>+</sup> et sIgG<sup>+</sup> en les marquant grâce à des anticorps polyclonaux fluorescents et spécifiques de classes.

Le profil de la répartition, variable selon les échantillons, est montré sur la figure 4.

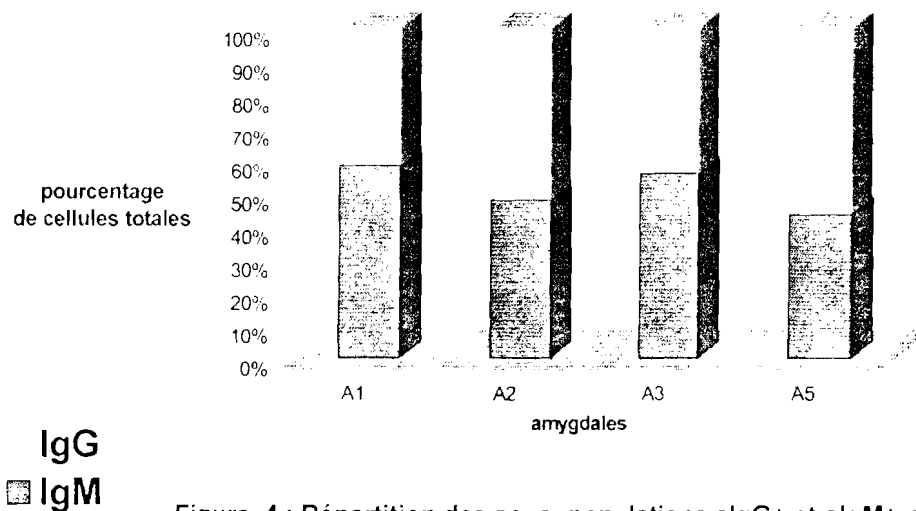


Figure 4 : Répartition des sous-populations sIgG<sup>+</sup> et sIgM<sup>+</sup> marquées.

Le pourcentage cumulé des cellules sIgG<sup>+</sup> et sIgM<sup>+</sup> étant supérieur au 100% des cellules CD19<sup>+</sup>, on n'exclue pas un problème technique de reconnaissance non spécifique malgré la pré-incubation des cellules dans du sérum A-B (2%). On n'exclue pas non plus un marquage de cellules non B exprimant des récepteurs pour les IgG et peut-être les IgM.

## 5.2 Induction d'une production d'immunoglobulines par des populations cellulaires issues d'amygdales palatines.

- 1) Nous avons cherché à évaluer et à caractériser une production d'IgG/IgM induite *in vitro* pour la mise en culture de suspension cellulaires d'amygdales, stimulées ou non par différents agents actifs sur la différenciation lymphocytaire B.
- 2) Pour cela, nous avons utilisé une technique de mise en culture dans un milieu nutritif adéquat en présence d'une concentration fixe de sérum de veau fœtal de 10% ayant servi d'un sérum de référence dans les travaux précédents du laboratoire.



- 3) Nous avons observé les résultats suivants
- 4) La totalité des suspensions cellulaires ont donné lieu à une production d'IgG et d'IgM en présence mais aussi en absence de stimuli. La figure 5 montre les données acquises lors de l'analyse des conditions de stimulations suivantes : (1) cellules seules ; (2) stimulus ; (3) cellules + cycloheximidine.

On a remarqué l'importance considérable de la production "spontanée" d'IgG et d'IgM dans toutes les conditions de culture, à part celles où la cycloheximidine a été ajoutée à la concentration de 100 µg/ml. Cette dernière condition de culture représente une condition témoin. La cycloheximidine bloque la synthèse de protéine.

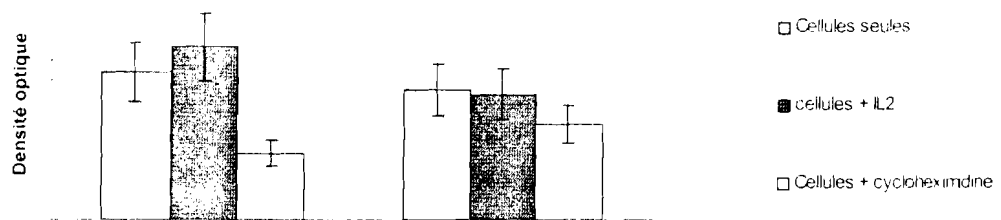


Figure 5 : Production d'anticorps de type IgG et IgM sous différentes conditions de culture

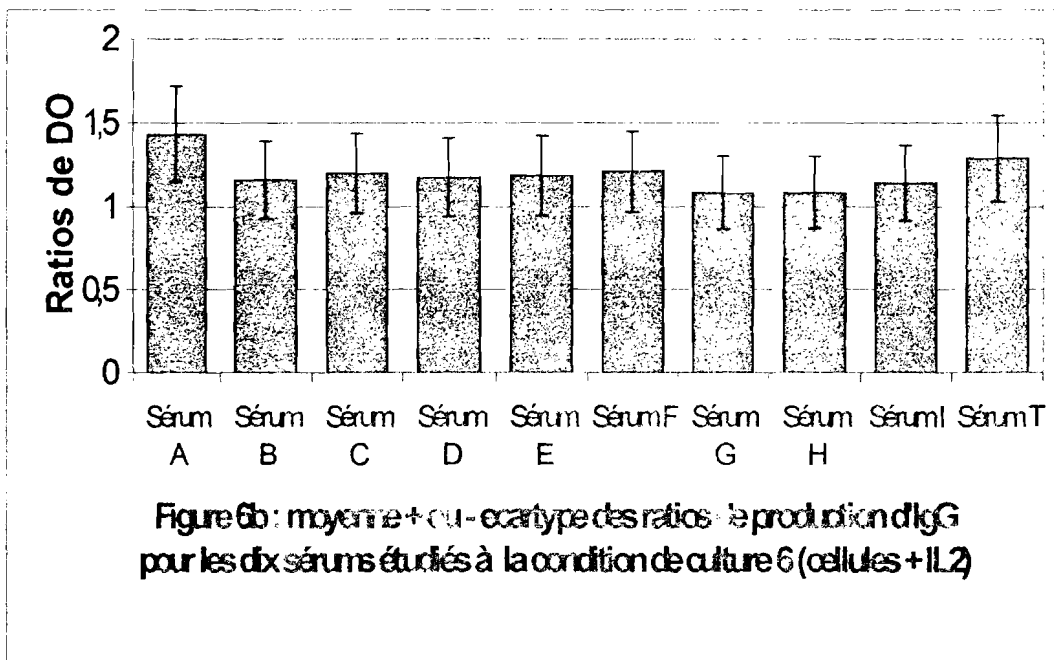
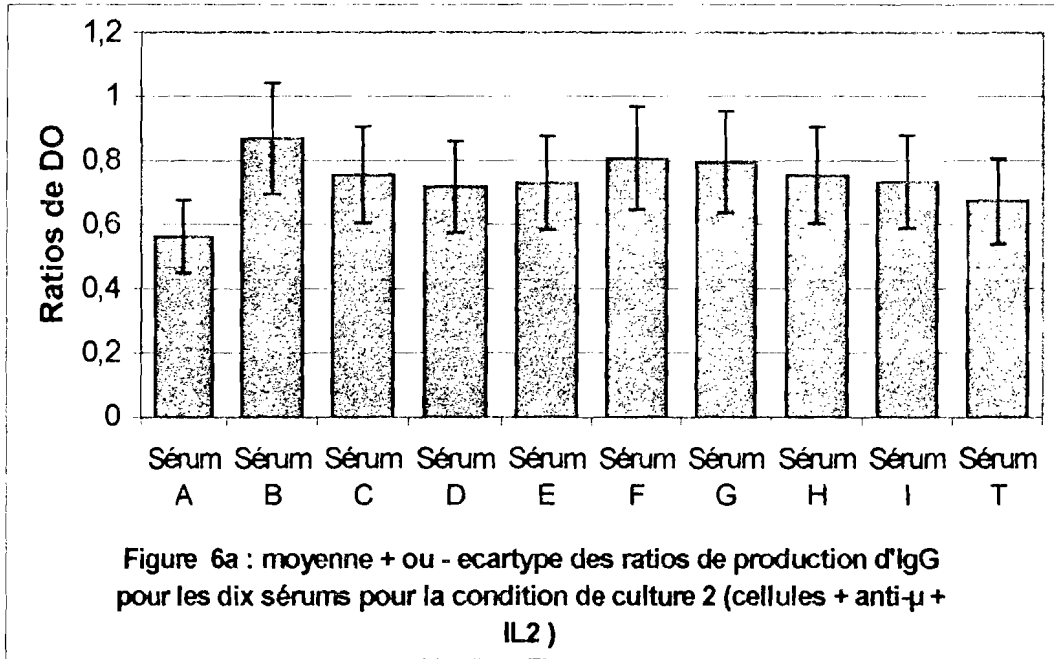
### 5.3 Influence de la qualité du sérum de veau fœtal sur la production d'IgG et d'IgM.

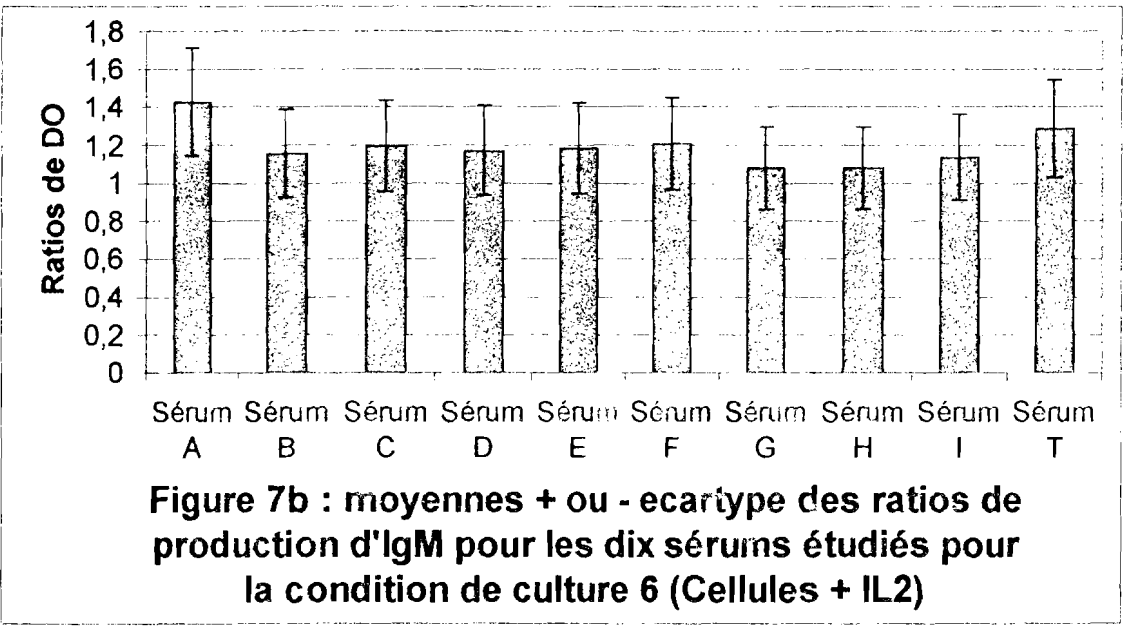
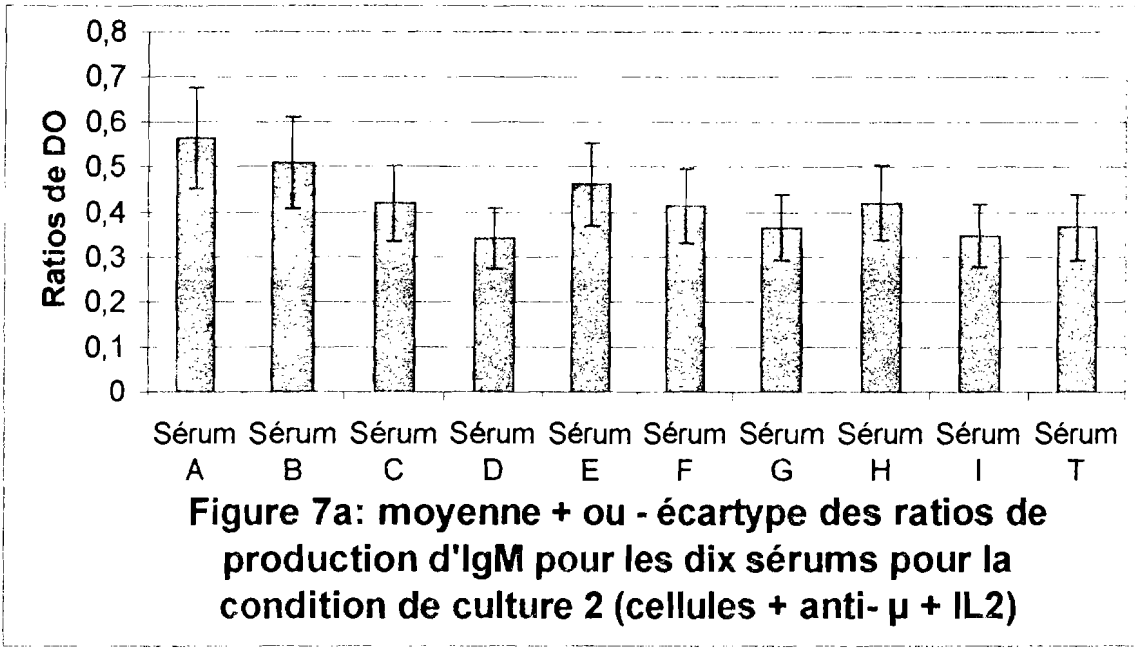
- 1) Nous avons cherché à savoir si la qualité du SVF influençait la production d'IgG et d'IgM par des cellules B tissulaires d'origine amygdalienne cultivées *in vitro*.
- 2) Pour cela, nous avons fait varier le seul paramètre SVF et nous avons gardé constants les autres paramètres : (1) Origine des suspensions cellulaires ; (2) Conditions de culture.
- 3) Dix lots de SVF différents ont été testés dans différentes conditions de culture, y compris dans la condition culture "Témoin" en présence de cycloheximidine.

- 4) Comme le montre la figure 6, nous n'avons pas noté de différence objective dans la production d'IgG/IgM au sein des mêmes suspensions cellulaires.

Pour exprimer ces résultats, nous avons calculé le ratio des productions d'IgG et d'IgM dans différentes conditions de culture vs. la condition culture "Cellules seules". Nous avons vérifié au préalable que la cycloheximidine avait bien bloqué l'ensemble des productions d'immunoglobulines pour chacune des suspensions de cellules d'origine amygdalienne testées.

Il en a été de même pour les autres conditions de culture comme cela est montré sur le tableau V :





**Tableau Va : Moyennes  $\pm$  écartype des ratios de la production d'IgM pour les autres conditions de culture.**

Conditions de culture	Sérum A		Sérum B		Sérum C		Sérum D		Sérum E	
	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyenne	Ecartype
3 - Cellules + IL10	1,165	0,322	0,914	0,840	0,961	0,334	0,909	1,282	0,933	0,951
4 - Cellules + IL2 + IL10	1,297	0,276	1,037	1,489	1,189	1,661	1,171	0,507	1,223	0,085
5 - Cellules + SAC + IL2	1,503	0,859	1,051	1,709	1,211	0,121	1,192	0,785	1,205	0,341
7 - Cellules + IL10 + IL6	1,204	0,130	0,868	0,888	1,017	0,719	0,992	0,424	0,989	0,376
8 - Cellules + Schizontes + IL2	1,418	0,287	1,086	0,734	1,252	0,792	1,200	0,127	1,262	1,616
Conditions de culture	Sérum F		Sérum G		Sérum H		Sérum I		Sérum T	
	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype
3 - Cellules + IL10	0,956	2,812	0,908	0,395	0,990	0,718	0,942	1,419	1,018	0,540
4 - Cellules + IL2 + IL10	1,309	1,615	1,090	0,797	1,129	0,936	1,127	0,852	1,260	1,319
5 - Cellules + SAC + IL2	1,292	1,297	1,063	0,635	1,152	0,870	1,083	0,219	1,295	1,482
7 - Cellules + IL10 + IL6	1,057	2,065	0,941	0,738	0,923	0,508	1,001	0,682	1,092	1,051
8 - Cellules + Schizontes + IL2	1,282	0,375	1,157	0,663	1,186	0,622	1,135	2,608	1,315	0,861

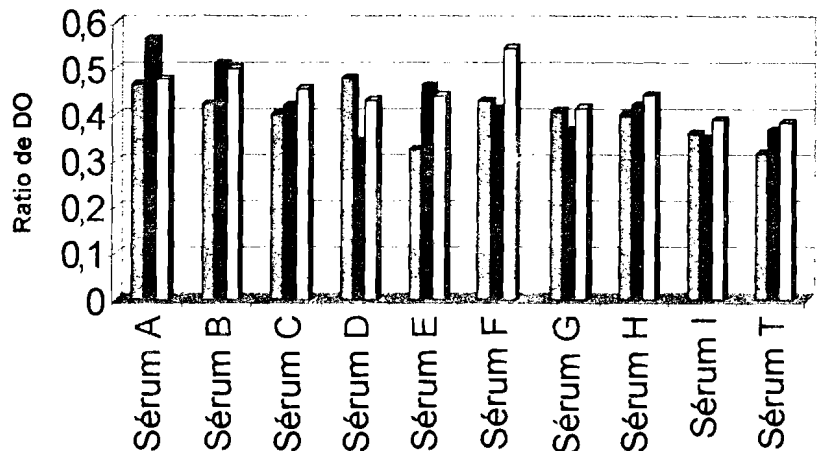
**Tableau Vb : Moyennes  $\pm$  écartype des ratios de la production d'IgG pour les autres conditions de culture.**

Conditions de culture	Sérum A		Sérum B		Sérum C		Sérum D		Sérum E	
	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype
3 - Cellules + IL10	1,165	1,418	0,926	0,961	0,968	0,952	0,993	0,660	0,958	1,212
4 - Cellules + IL2 + IL10	1,237	1,820	0,915	1,189	0,970	1,485	0,944	1,273	0,907	1,210
5 - Cellules + SAC + IL2	1,543	1,042	1,020	1,211	0,988	0,672	0,952	0,228	0,962	0,229
7 - Cellules + IL10 + IL6	1,344	0,566	1,058	1,017	0,964	1,499	1,012	1,410	0,970	0,748
8 - Cellules + Schizontes + IL2	1,378	2,155	0,996	1,252	1,079442509	1,474	1,068	1,212	1,011	0,687
Conditions de culture	Sérum F		Sérum G		Sérum H		Sérum I		Sérum T	
	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype	Moyennes	Ecartype
3 - Cellules + IL10	0,935	0,894	1,020	0,694	0,996	1,027	0,980	1,589	0,907	1,477
4 - Cellules + IL2 + IL10	0,975	0,518	1,050	0,882	0,947	0,453	0,939	0,526	0,925	1,485
5 - Cellules + SAC + IL2	1,004	1,985	1,077	0,546	1,017	0,310	0,984	1,575	0,972	1,363
7 - Cellules + IL10 + IL6	0,937	0,578	1,000	0,697	0,969	0,657	1,056	3,421	0,938	3,223
8 - Cellules + Schizontes + IL2	1,039	0,771	1,045	0,039	0,948	0,978	1,125	6,547	0,996	2,678

#### **5.4 Influence de la concentration en SVF sur la production d'immunoglobulines**

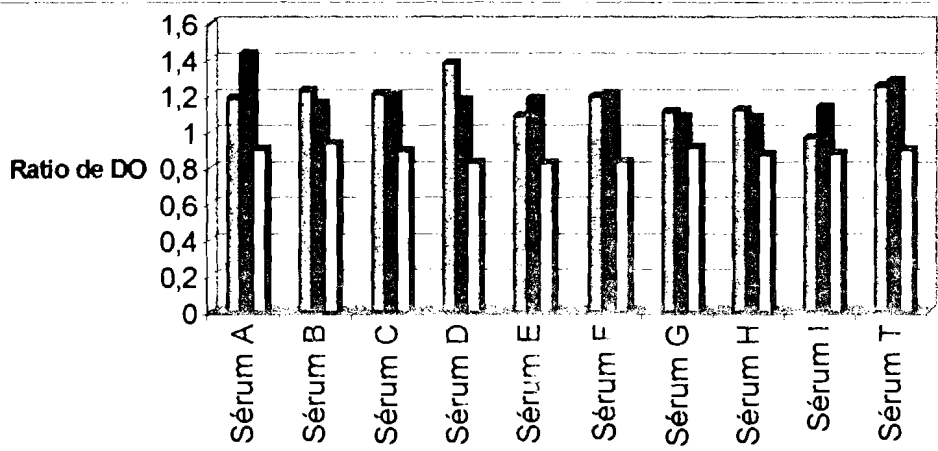
- 1) Nous avons cherché à apprécier si la concentration de chacun des différents sérums testés influait sur la quantité des immunoglobulines produites par les cellules B amygdaliennes en culture.
- 2) Pour cela, nous avons utilisé des concentrations variant de 7.5 à 12.5% de SVF dans chacun des conditions de culture testées précédemment.
- 3) Comme le montre la figure 8, nous n'avons pas mis en évidence de différence notable en ce qui concerne la production, *in vitro*, d'immunoglobulines par les cellules B tissulaires en présence de chacune des trois concentrations de sérum et ce, pour chacune des conditions de culture. En effet, le test de  $\chi^2$  n'a permis de montrer aucune différence statistiquement significative de la répartition des densités optiques mesurées pour les différents milieux.

La figure 8 montre les ratios de production d'immunoglobulines obtenues lorsque les cellules ont été stimulées en présence d'anti- $\mu$  + IL2 et IL2 + IL10.



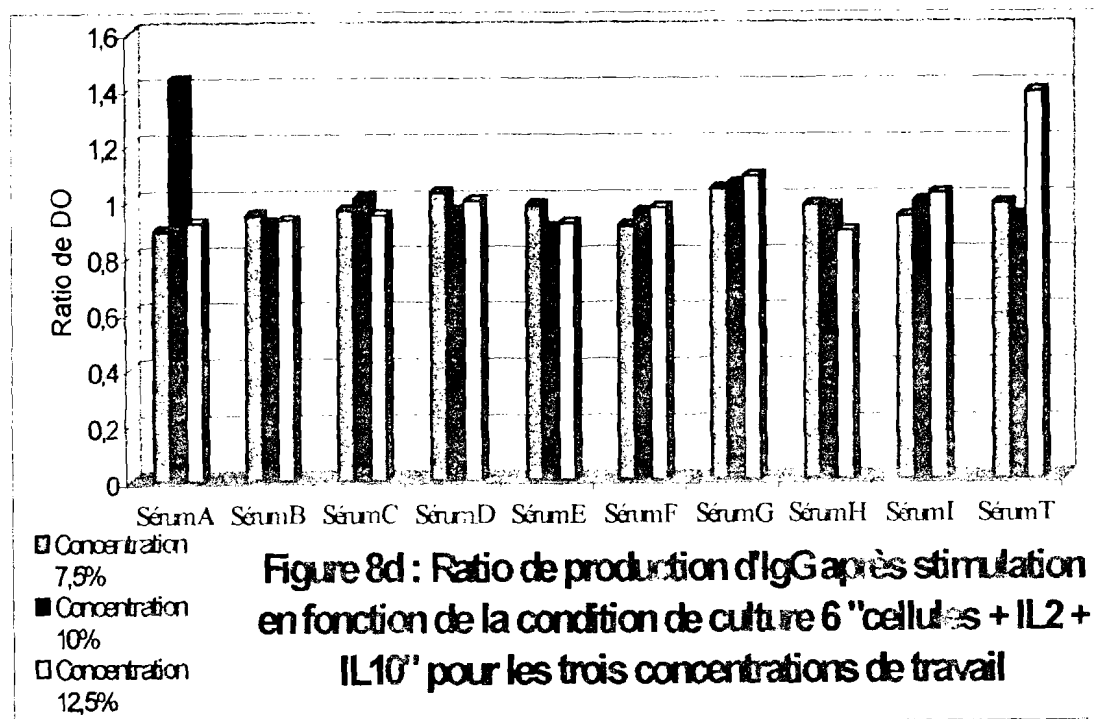
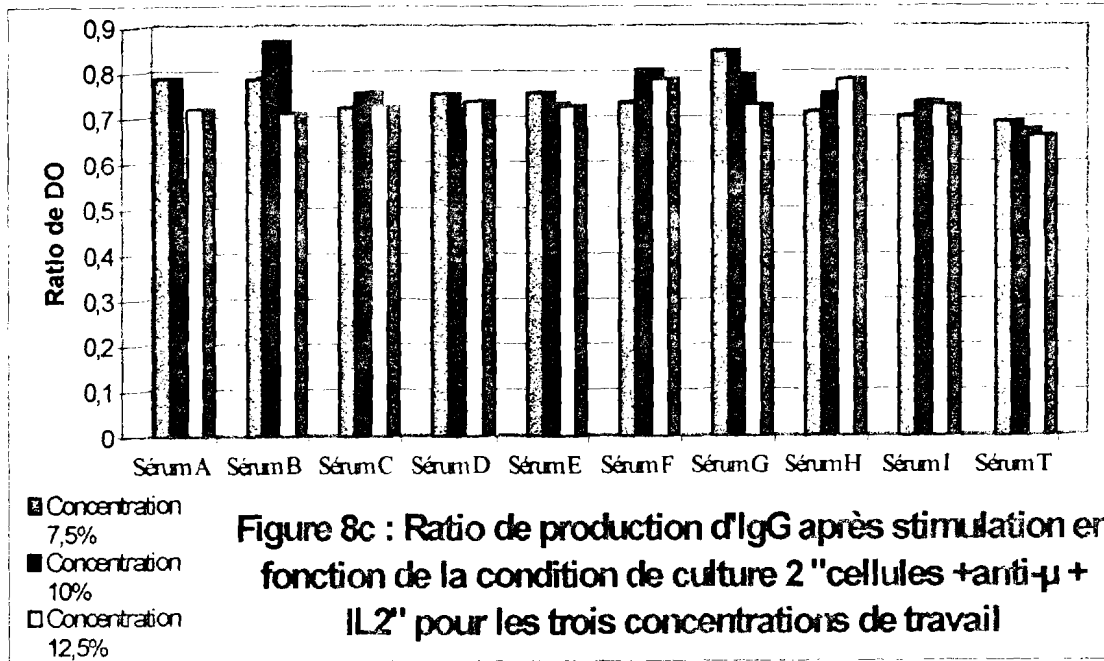
- Concentration 7,5%
- Concentration 10%
- Concentration 12,5%

**Figure 8a : ratio de la production d'IgM après stimulation en fonction de la condition de culture 2 "cellules + anti-μ + IL2" pour les trois concentrations de travail**



- Concentration 7,5%
- Concentration 10%
- Concentration 12,5%

**Figure 8b : ratio de production d'IgM après stimulation en fonction de la condition de culture 6 "cellules + IL2 + IL10" pour les trois concentrations de travail**



Des résultats similaires ont été obtenus dans les 5 autres conditions de culture comme le montre le tableau VI.



**Tableau VIa : Ratio de production d'IgM en fonction des autres conditions de culture pour les trois concentrations de travail.**

Conditions de culture	Sérum A			Sérum B			Sérum C			Sérum D			Sérum E		
	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%
3 - Cellules + IL10	1,165	1,165	0,983	1,418	0,914	0,988	0,926	0,961	0,902	1,165	0,909	0,887	1,418	0,933	0,946
4 - Cellules + IL2 +IL10	1,297	1,297	1,116	1,820	1,037	1,232	0,915	1,189	1,162	1,297	1,171	1,159	1,820	1,223	1,111
5 - Cellules + SAC + IL2	1,503	1,503	1,072	1,042	1,051	1,249	1,020	1,211	1,138	1,503	1,192	1,183	1,042	1,205	1,128
7 - Cellules + IL10 + IL6	1,204	1,204	0,986	0,566	0,868	0,962	1,058	1,017	0,878	1,204	0,992	0,907	0,566	0,989	0,932
8 - Cellules + Schizontes + IL2	1,418	1,418	1,199	2,155	1,086	1,196	0,996	1,252	1,149	1,418	1,200	1,175	2,155	1,262	1,271
Conditions de culture	Sérum F			Sérum G			Sérum H			Sérum I			Sérum T		
	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%
3 - Cellules + IL10	0,926	0,956	0,975	1,165	0,908	0,976	1,418	0,990	0,898	0,926	0,942	1,020	1,165	1,018	0,967
4 - Cellules + IL2 +IL10	0,915	1,309	1,356	1,297	1,090	1,145	1,820	1,129	1,131	0,915	1,127	1,196	1,297	1,260	1,222
5 - Cellules + SAC + IL2	1,020	1,292	1,337	1,503	1,063	1,129	1,042	1,152	1,136	1,020	1,083	1,156	1,503	1,295	1,251
7 - Cellules + IL10 + IL6	1,058	1,057	0,991	1,204	0,941	0,978	0,566	0,923	0,863	1,058	1,001	1,033	1,204	1,092	0,995
8 - Cellules + Schizontes + IL2	0,996	1,282	1,312	1,418	1,157	1,226	2,155	1,186	1,160	0,996	1,135	1,236	1,418	1,315	1,257

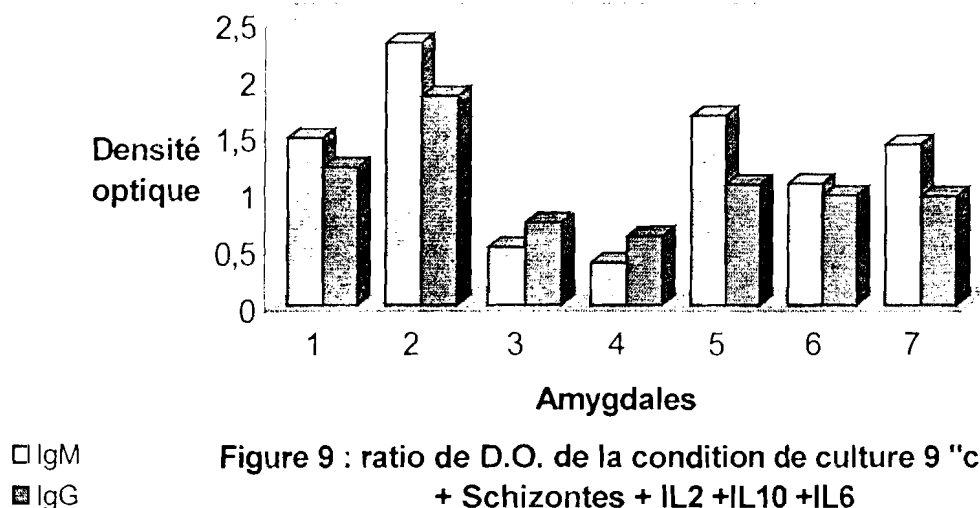
**Tableau VIb : Ratio de la production d'IgG en fonction des autres conditions de culture pour les trois concentrations de travail.**

Conditions de culture	Sérum A			Sérum B			Sérum C			Sérum D			Sérum E		
	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%
3 - Cellules + IL10	0,871	1,165	0,905	0,958	0,926	1,034	0,887	0,968	0,923	0,953	0,993	1,027	0,962	0,958	0,913
4 - Cellules + IL2 +IL10	0,911	1,297	0,963	1,003	0,915	0,957	0,874	0,970	0,941	0,987	0,944	0,975	1,007	0,907	0,898
5 - Cellules + SAC + IL2	0,956	1,503	0,927	0,962	1,020	0,941	0,974	0,988	0,966	0,948	0,952	0,983	1,028	0,962	1,002
7 - Cellules + IL10 + IL6	0,942	1,204	0,943	0,986	1,058	0,901	0,894	0,964	0,971	1,003	1,012	0,988	1,000	0,970	1,012
8 - Cellules + Schizontes + IL2	0,942	1,418	1,007	1,043	0,996	0,992	0,975	1,079	1,038	1,011	1,068	1,052	1,105	1,011	1,025
Conditions de culture	Sérum F			Sérum G			Sérum H			Sérum I			Sérum T		
	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%	Conc 7,5%	Conc 10%	Conc 12,5%
3 - Cellules + IL10	0,865	0,935	0,930	1,008	1,020	1,036	0,992	0,996	0,999	1,004	0,980	0,964	0,947	0,907	0,883
4 - Cellules + IL2 +IL10	0,921	0,975	0,974	1,055	1,050	1,064	0,942	0,947	0,859	0,919	0,939	0,976	0,967	0,925	0,910
5 - Cellules + SAC + IL2	0,938	1,004	1,055	1,055	1,077	1,106	1,041	1,017	0,907	0,953	0,984	0,947	0,997	0,972	0,945
7 - Cellules + IL10 + IL6	0,882	0,937	0,935	1,005	1,000	1,114	0,950	0,969	0,904	0,891	1,056	1,079	1,100	0,938	0,893
8 - Cellules + Schizontes + IL2	0,974	1,039	1,039	1,047	1,045	1,115	0,990	0,948	0,971	0,811	1,125	1,145	1,103	0,996	0,942

## 5.5 Appréciation de la production d'IgG / IgM en réponse à la stimulation des cellules B amygdaliennes par les extraits d'hématies parasitées par *P. falciparum*.

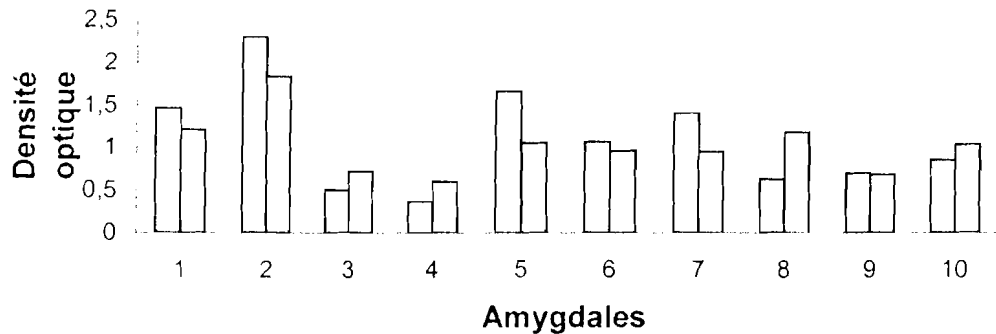
- 1) Les sujets ayant subi une tonsillectomie et inclus dans cette étude sont originaires du Sénégal et vraisemblablement de la presqu'île du Cap-vert, site essentiellement drainé par l'Hôpital Principal de Dakar dont le service O.R.L. nous a fourni les pièces opératoires fraîches. La prévalence d'exposition à *P. falciparum* est faible mais n'est pas utile à Dakar. Nous avons cherché à apprécier si ces sujets – bien que jeunes – avaient des lymphocytes B amygdaliens capables de répondre à une stimulation *in vitro* sous certaines conditions expérimentales, à des antigènes des formes sanguines de *P. falciparum*.
- 2) Pour cela, nous avons sélectionné une des conditions de culture précédentes, en l'occurrence le sérum de référence à la concentration de 10%.
- 3) Nous avons mesuré les immunoglobulines polyclonales dans les surnageants de culture.

Comme le montre la figure 9, nous n'avons pas noté de différence par rapport au contrôle approprié ayant servi à établir le ratio.



Afin d'apprécier la production d'anticorps spécifiques d'antigènes de *Plasmodium falciparum*, nous avons testé les produits de sécrétion cellulaire

suite à l'exposition à des extraits parasite en ELISA et observé les résultats suivants.



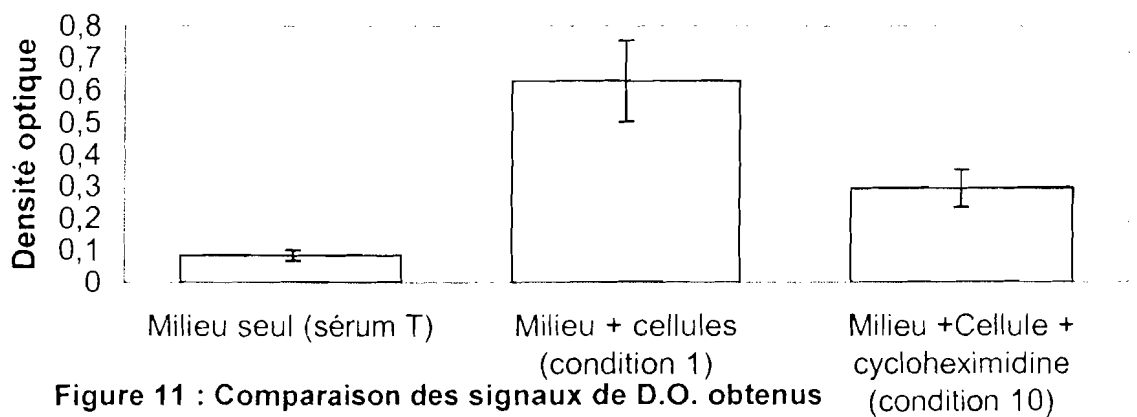
**Figure 10 : Ratio de la production d'immunoglobulines spécifiques de la condition de culture 9 "cellules + schizontes +IL2 +IL6 +IL10".**

□ IgM  
 □ IgG

Il en est de même des autres sérums pour le ratio de la condition 9 par rapport au sérum témoin. On peut en déduire qu'il n'y a pas d'influence de la qualité du sérum sur la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B tonsillaires après stimulation *in vitro* par les extraits multiantigéniques des formes sanguines de *Plasmodium falciparum*.

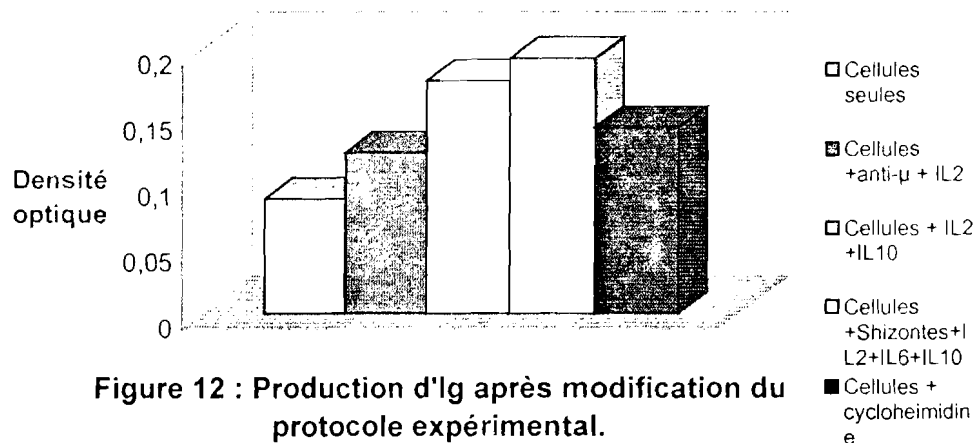
### 5.6 Appréciation d'une modification du protocole de culture consistant à laisser reposer les cellules 18 heures avant d'effectuer la stimulation.

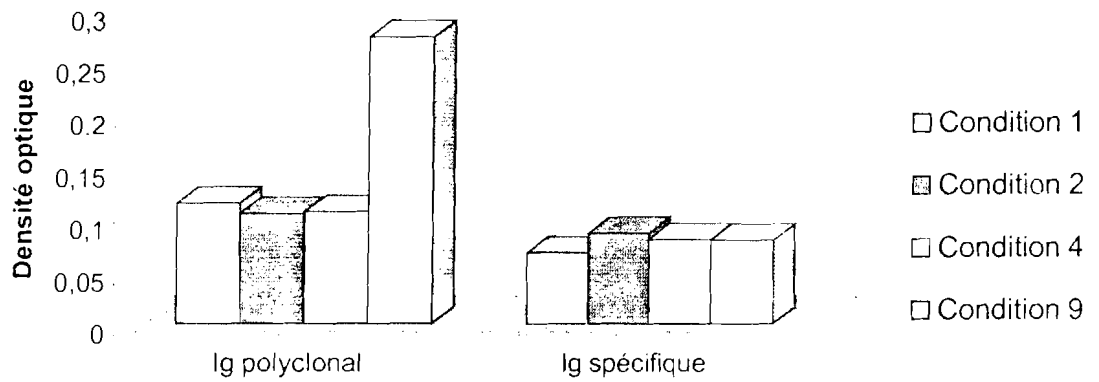
- 1) L'ensemble des données présentées ci-dessus a montré que la production d'IgG / IgM était importante quelles que soient les conditions de culture. De plus, des signaux de D.O. peuvent encore être mesurés en présence de cycloheximidine (figure 11).



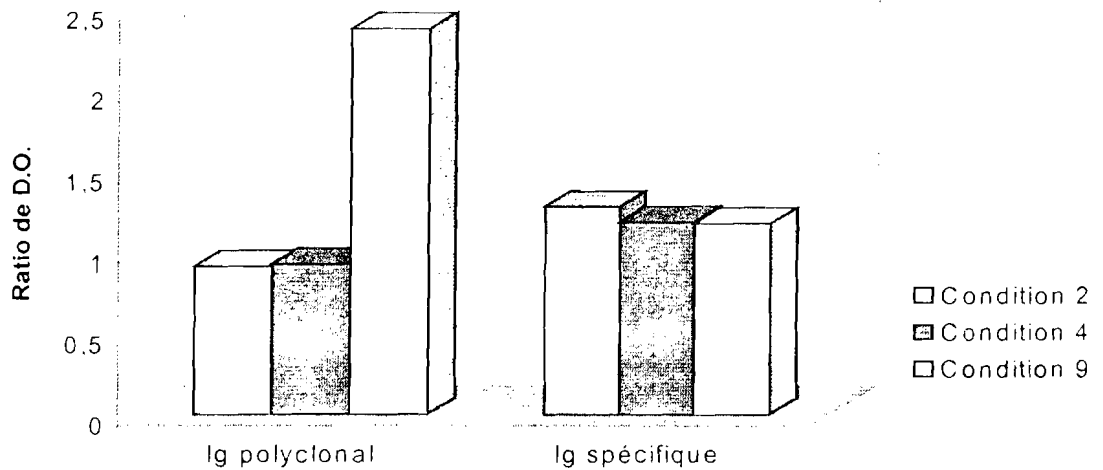
**Figure 11 : Comparaison des signaux de D.O. obtenus avec les trois milieux sans stimuli.**

- 2) Afin de vérifier si cette observation pouvait résulter d'un relargage d'immunoglobulines liées à la membrane des cellules durant les premières heures de culture (un processus physiologique appelé "Capping" ou regroupement suivi du "Shedding" ou relargage), nous avons laissé reposer les cellules dans le milieu de culture "Iscove's + 10% de sérum de veau foetal standard du laboratoire", pris comme référence, pendant 18 heures. Ces cellules ont été ensuite lavées, réajustées à la concentration utile de 2 millions /ml et stimulées comme précédemment. En utilisant comme système de référence le sérum T à la concentration de 10%.
- 3) Dans ces conditions, comme le montre les figures 12, 13 et 14, nous n'avons pas remarqué de différence notable avec les autres sérums malgré la modification expérimentale. De plus, la production d'immunoglobulines spécifiques après stimulation par des extraits multiantigéniques de *Plasmodium falciparum* a été faible quelles que soient les conditions de culture comme le montre les figures 13 et 14, contrairement aux immunoglobulines polyclonales qui peuvent être mesurées de façon appréciable dans les mêmes conditions de stimulation.





**Figure 13 : Appréciation de la production d'Ig polyclonales et spécifiques sous différentes conditions de stimulation.**



**Figure 14 : ratio de production d'Ig polyclonales et spécifiques sous diverses conditions de stimulation.**

En dernière analyse, il ressort que les réponses induites de type "polyclonales/polyspécifiques" et de type spécifique ne sont pas *sticto-sensu* superposables à ceux obtenues avant la modification du protocole et que les bruits de fond obtenus sont souvent moindres.

# DISCUSSION

## 6 DISCUSSION PAR RAPPORT A LA MISE EN ŒUVRE DU PROJET ET SES OBJECTIFS.

Ce travail avait un objectif double : (1) Apprécier la qualité des suspensions tonsillaires de lymphocytes B de sujets faiblement exposés à *P. falciparum* de se différencier *in vitro* lors d'une exposition à des antigènes majeurs de ce parasite en cellules sécrétant des anticorps polyréactifs (totaux / polyclonaux) et/ou spécifiques. (2) Apprécier si des lymphocytes B provenant d'une population jeune exposée à *P. falciparum* de façon modérée et épisodique peuvent représenter une source potentielle de cellules permettant l'étude du répertoire B d'épitopes de *P.falciparum*.

Le premier objectif a nécessité l'isolement et la caractérisation des populations cellulaires étudiées, l'estimation des conditions de production d'anticorps réactifs vis-à-vis des formes sanguines de *P. falciparum* par l'analyse de la fréquence et de l'intensité des réponses anticorps *in vitro* des lymphocytes B tonsillaires. A la vue des résultats obtenus, on peut en déduire que les populations mononuclées tonsillaires sont d'une qualité certaine tant en nombre de cellules que du point de vue de leur diversité et permet la validation de ces cellules comme modèle expérimentale.

La comparaison de la production d'immunoglobulines polyréactives et spécifiques obtenues à partir de cellules mononuclées sanguines (19) par rapport à celles obtenues à partir de cellules mononuclées amygdaliennes a permis d'apprécier l'intérêt de ces dernières comme source potentielle et préférentielle de cellules pour l'étude du répertoire B d'épitopes de *P.falciparum*. En effet si la qualité des suspensions cellulaires obtenues de part et d'autre semble être équivalente, la richesse des populations mononuclées amygdaliennes permet la justification de leur utilisation préférentielle.

## 7 DISCUSSION PAR RAPPORT A L'APPROCHE TECHNOLOGIQUE DU PROJET.

### 7.1 Les milieux de culture

Le milieu de culture dans lequel les cellules sont stimulées et en particulier les lymphocytes B humains tissulaires peut influencer sur les résultats mesurés.

Parmi les paramètres d'influence, on peut citer :

- Les sérums qui sont employés comme source de protéines et de nutriments indispensables à la physiologie des cellules étudiés *in vitro*.

Les sérums étant équivalents du point de vue de la quantité des anticorps produits, on peut présager de la similitude de leur composition en qualité et en proportion.

Le sérum de veau est cependant connu pour induire des bruits de fond «culture» élevés. Comme on cherche à mettre en évidence des immunoglobulines humaines dans les surnageants de culture, les sérums supplémentant ces milieux doivent être dépourvus d'immunoglobulines exogènes pouvant être détectées par des anticorps anti-immunoglobulines humaines ne serait-ce qu'en réaction croisée.

- Les conditions de culture

L'exposition des lymphocytes B tonsillaires à des antigènes protéiques solubles de *Plasmodium falciparum* et à des facteurs de différenciation non spécifiques tels que les cytokines humaines recombinantes et des agents chimiques et/ou biologiques a permis la potentialisation et la différenciation lymphocytaire. En effet, l'analyse de la fréquence et de l'intensité des réponses spécifiques anti-*Plasmodium falciparum* a permis de montrer l'effet différentiel des principales combinaisons de cytokines par rapport à la condition "témoin".



## **7.2 les antigènes de stimulation.**

Une étape primordiale aurait été la caractérisation des antigènes des formes sanguines de *P. falciparum* pour leur aptitude à induire la production d'immunoglobulines de classes et sous-classes définies. En effet, la sélection d'un immunogène parmi plusieurs est importante quand on sait que les nombreux antigènes décrits pour être fréquemment reconnus par des anticorps sériques de sujets immuns n'induisent qu'une modeste production *in vitro* d'immunoglobulines des différentes sous-classes, contrairement aux déductions faites à partir de modélisations antérieures effectuées au niveau du laboratoire d'immunologie clinique et parasitaire de l'Institut Pasteur de Dakar et basées sur la séparation des lymphocytes B, la reconstitution des signaux T auxiliaires directs [membranaires] et indirects [sécrétoires], la co-culture B-T et l'induction d'une production d'immunoglobulines spécifiques.

En dernière analyse, il est ressorti soit une faible immunogénicité des extraits de schizontes utilisés au cours de ce travail pour la stimulation des cellules mononuclées isolée, soit parce que ces cellules n'ont pas été assez sensibilisées. En effet, les cellules B tonsillaires n'ont pas présenté une très grande réactivité vis - à - vis des extraits antigéniques de *Plasmodium falciparum* ; le niveau d'exposition faible des sujets inclus dans cette étude peut expliquer une telle réactivité.

L'étude d'une cohorte de sujets "immuns" pour *P.falciparum* pour les différents antigènes considérés serait intéressante pour la valorisation de cellules mononuclées d'origine amygdalienne comme modèle expérimental.

## 8 CONCLUSION

La régulation de la production d'anticorps liant des antigènes protéiques solubles - thymo-dépendants (sous le contrôle des lymphocytes T) – d'origine parasitaire est un aspect particulièrement bien connu au niveau du Laboratoire d'Immunologie Clinique et Parasitaire de l'Institut Pasteur de Dakar dont c'est la thématique depuis ces cinq dernières années. Dans le cas du paludisme, la recherche de candidats vaccins dirigés contre les formes asexuées sanguines de ce parasite a connu des développements considérables. La mise en place de modèle expérimental a été alors nécessaire pour l'étude des conditions de production *in vitro* de d'immunoglobulines protectrices contre *Plasmodium falciparum*.

La production d'immunoglobulines résulte de la mise en route de processus moléculaires et cellulaires complexes. *In vitro*, certains d'entre eux ont été analysés dans le but de cribler les conditions de culture permettant à des lymphocytes B tissulaires en l'occurrence d'origine amygdalienne de produire des anticorps au décours d'une stimulation appropriée. En outre, la mise en œuvre d'un tel projet a nécessité :

- l'utilisation de plusieurs milieux de culture (Sérum de veau foetal) enrichi en supplément de culture habituel (L-Glutamine, antibiotiques, antifongiques ...) testés à trois concentrations (7.5%, 10% et 12.5%).
- La reconnaissance et la préparation des suspensions cellulaires T et B.
- La coculture des lymphocytes T et B dans le milieu sélectionné:
- Sans costimuli.
- Avec ou sans antigènes.
- Avec ou sans cytokines.

- La récupération des surnageants de culture et la mesure de la production in vitro d'IgG/IgM polyréactifs (totales/polyclonales) et spécifiques par test ELISA.

Les principaux résultats obtenus ont montré que :

- Le potentiel cellulaire des prélèvements amygdaliens était important tant au niveau de la qualité que de la quantité contrairement aux populations cellulaires mononuclées sanguines forcément plus limitées en nombre de cellules.
- Les sérums utilisés, du moment qu'ils offraient le même environnement aux lymphocytes B pour la production d'immunoglobulines, étaient équivalents et que leur concentration de travail n'a pas une influence remarquable sur la production de ces immunoglobulines.
- L'environnement cytokinique peut jouer un rôle important dans la régulation différentielle des isotypes produits mais aussi dans l'amplification des réponses de la production d'anticorps après stimulation.

Au total, l'étalonnage des nouveaux lots de sérum de veau fœtal convenant pour la culture in vitro de lymphocytes B humains et leur différenciation en cellules sécrétant des immunoglobulines permettra sans doute la constitution d'un nouveau stock de milieu de culture pour les travaux à venir et l'appréciation de la qualité des suspensions tonsillaires de ces lymphocytes B devra également permettre le criblage du répertoire B chez des sujets immunisés par des antigènes des formes sanguines asexuées de *Plasmodium falciparum*.

# BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN,R.C., ARMITAGE,R.J., CONLEY,M.E., ROSENBLATT,H., JENKINS,N.A., COPELAND,N.G., BEDELL, M.A., EDELHOFF,S., DISTECHE, C.M., SIMONEAUX,D.K., FANCELOW, W.C., BELMONT, J. & SPRIGGS, M.K. (1993) : *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyperIgM syndrom.*, Science, 259,990-993.
2. ARMITAGE, R.J., MALISZEWSKI, C.R., ALDERSON, M.R., GRABSTEIN, K.H., SPRIGGS, M.K. & FANLOW, W.C. (1993) : *CD40L : a multi-functional ligand.* Semin. Immunol., 5, 401-402.
3. BANCHEREAU, J., BAZAN, F., BLANCHARD, D., BRIERE, F., GALLIZZI, J.P., VAN KOOTEN, C., LIU, Y.J., ROUSSET, F. & SAELAND, S. (1994) : *The CD40 antigen and its ligand.* Annu. Rev. Immunol., 12, 881-922.
4. BANCHEREAU, J. & ROUSSET, F. (1992) : *Human B lymphocytes : phenotype, proliferation and differentiation.* Adv. Immunol., 52, 125-261.
5. BRIEVA, J.A., ROLDAN, E., DE LA SEN, M.L. & RODRIGUEZ, C. (1991) : *Human in vivo-induced spontaneous IgG secreting cells from tonsil, blood and bone-marrow exhibit different phenotype functional level of maturation,* Immunology, 72, 580-583.
6. CAVAILLON J.-M. (1996) : *les cytokines*, 2<sup>ème</sup> édition, , **Masson**.
7. DEFRANCE T., VANBERVLIET B., BRIERE F., DURAND I., ROUSSET F., BANCHEREAU J. (1992) : - *Interleukin-10 and transforming growth factor  $\beta$  cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A.* J.Exp.Med , 175, 671-682.
8. FEI GO N., CASTLE B.E., BARRET. R., KASTELEIN R., DANG W., MOSMANN T. R., MOORE K. W., HOWARD M. 1990 : – *Interleukin-10, a novel cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells.* J.Exp.Med., 172, 1625-1631.
9. FLUCKIGER A. C, GARRONE P., DURAND I., et al. (1993) : – *Interleukin 10 (IL10) upregulates functional high affinity IL2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes.* J. Exp. Med., 178, 1473-1481.
10. Garraud, O. & Nutman T.B..(1996) : *the role of cytokines in human B-cell differentiation into immunoglobulin-secreting cells.* Bull. Inst. Pasteur, 94,285-309.

11. GARRAUD, O., (1993) : *Antibody-mediated protection in experimental Plasmodium falciparum malaria in the Saimiri monkey : studies on immune effector blood cells. Bull. Inst. Pasteur*, 91,143-159.
12. GARRAUD, O., PERRAUT, R., BLANCHARD, D., CHOUTEAU, P., BOURREAU, E., LE SCANF, C., BONNEMAINS, B. & MICHEL, J.M. (1993a) : *Squirrel monkey (Saimiri sciureus) B lymphocytes : secretion of IgG directed to Plasmodium falciparum antigens, by primed blood B lymphocytes restimulated in vitro with parasitized red blood cells. Res. Immunol.* 144, 407-418.
13. GARRAUD, O. LEGRAND, E.; EGHBALI, H., HOERNI-SIMON, G., HOERNI, B. & GUILLEMIN, B. (1988) : *Interleukin -2 receptor is functionally linked with in vitro activation of B-cells isolated from non Hodgkin's lymphomas. Diagn. Clin. Immunol.*, 5, 417-420.
14. ITOH, K. & HIROHATA, S. (1995) : *The role of IL-10 in B cell activation, proliferation, and differentiation. J. Immunol.*, 154, 4341-4350.
15. LEROY Francis. (1996) : *Eléments d'immunologie, Editions Biocosmos Centre.*
16. LEVY Y., FERMAND J.P., BROUET J.C. (1990) : - *Differential effects of low and high concentrations of interleukin 6 on human b cells. Eur.J. Immunol.*, 20,2389-2393.
17. MURAGACHI, A., HIRANO, T., TANG, B., MATSUDA, T., HORII, Y., NAKAJIMA, K & KISHIMOTO, T. (1988) : *the essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B-cells. J. Exp. Med.*, 167, 332-344
18. MURAGUCHI A., HIRANO T., TANG B et al. (1988) : *The essential role of B cell stimulating factor 2 (BSF-2/IL6) for the terminal differentiations of B-cells. J. Exp. Med.*, 167,332-344
19. NAMBEI, W.S., SARR, M., DIALLO, T.O., DIOUF, A., PERRAULT, R., GARRAUD, O. ( 1999) : *Criblage de protéines recombinantes d'antigènes des formes sanguines de P. falciparum pour leur aptitude à induire in vitro une production d'Ig spécifiques par des cellules mononuclées sanguines de sujets immuns (Résultats provisoires)*
20. Pezzuto A., Doïken, D. Rabinovitch, P.S., Letbetter, J.A. Moldenhauer G. & Clark E.A. (1987) : *CD19 monoclonal antibodies inhibit B cell activation and proliferation. " In leucocytes typing III, white cell differentiation antigens".*358-360.
21. Reinherz, E.L. MEUER, S. Fitzgerald K.A., Hussey, R.E Levine H. and Schlossman S.F. (1982). : *Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complexe. Cell* 30, 735-743.)
22. Reth, M. (1994) : *B-cell antigen receptors. Curr.Opin. Immunol.*, 6,3-8.

23. ROUSSET F., GARCIA E., DEFRANCE T., PERONNE C., VEZZIO N., HSU D.H., KASTELEIN R., MOORE K.W., BANCHEREAU J. (1992) : *Interleukin-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89, 1890-1893.

**TITRE** : CARACTERISATION DES CONDITIONS DE CULTURE POUR L'INDUCTION D'UNE PRODUCTION D'ANTICORPS REACTIFS VIS-A-VIS D'ANTIGENES DES FORMES SANGUINES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* PAR DES LYMPHOCYTES B PROVENANT D'AMYGDALES PRELEVEES CHEZ DES SUJETS JEUNES DE LA REGION DE DAKAR.

**Nom du candidat** : SARR Mamadou

**Nature du mémoire** : DIPLOME D'ETUDES APPRONFONDIES  
DE BIOLOGIE ANIMALE

**Jury** : **Président** : M. Bhen Sikina TOGUEBAYE      Professeur  
**Membres** : M. Doudou BA      Professeur  
M. Lamine DIAKHATE      Professeur  
Mme Aminata SALL/DIALLO      Maître de Conférences Agrégé

Au regard des difficultés rencontrées pour la recherche d'un candidat vaccin contre *Plasmodium falciparum* agent du paludisme, il était nécessaire de caractériser les conditions de production *in vitro* d'anticorps réactifs vis à vis des formes sanguines asexuées de ce parasite.

C'est ainsi que des cellules mononuclées d'origine amygdalienne de sujets *a priori* immuns ont été cultivées pendant 10 jours, à 37°C en atmosphère humide sans CO<sub>2</sub>, sous un volume 100 µl à 2.10<sup>6</sup> cellules / ml en milieu ISCOVE enrichi en sérum de veau foetal utilisé à des concentrations variables (7,5, 10 et 12,5%) et suppléments de culture habituels. Les suspensions de lymphocytes B ont été testées pour leur capacité à produire spontanément ou après stimulation par différentes combinaisons de cytokines et/ou d'extraits multiantigéniques de *P.falciparum* des IgG et IgM polyréactives (polyspécifiques/polyclonaux) et spécifiques *in vitro*. Les productions d'immunoglobulines ont été mesurées dans les surnageants de culture par technique ELISA.

Des principaux résultats obtenus, il est ressorti que les différents lots de sérum de veau foetal avaient un profil équivalent quant à leur capacité de favoriser *in vitro* de façon optimale la culture et la différenciation des lymphocytes B humains après leur activation pour les trois concentrations de travail.

Nos résultats ont permis d'apprécier la qualité des suspensions tonsillaires de lymphocytes B et permettent une indication quant à leur utilisation pour l'étude du répertoire B de sujets immunisés par des antigènes de *P. falciparum* et de préférence au sang périphérique plus limité en nombre de cellules.

**Mots clefs** : Amygdales ; Lymphocytes B ; Immunoglobulines ; *Plasmodium falciparum*

# ANNEXES



## ANNEXES

### TABLEAU IIIa : Resultats du dosage des immunoglobulines par ELISA (type IgM)

#### IgM

#### SERUM A

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
témoin	Conjugate	0,096	0,1485	0,1	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,108
	Milieu A	0,0815	0,0935	0,0985	0,048	0,083	0,1255	0,0625	0,0846429
	Positif	1,0625	1,816	1,6045	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,1822857
	condition 1	0,811	0,947	1,0085	0,863	0,705	0,6085	0,3635	0,7580714
	condition 2	0,733	0,237	0,305	0,405	0,291	0,352	0,1525	0,3536429
	condition 3	0,785	1,0425	0,9315	0,827	0,451	0,5805	0,333	0,7072143
	condition 4	0,7575	1,533	1,0875	0,941	0,5775	0,5935	0,332	0,8317143
	condition 5	0,8585	1,4155	1,1135	0,9805	0,5475	0,616	0,3445	0,8394286
	condition 6	0,83	1,4125	1,136	1,046	0,6865	0,696	0,495	0,9002857
	condition 7	0,8285	1,121	0,9875	0,8935	0,56	0,6695	0,3755	0,7765
conc. 7,5%	condition 8	0,8155	1,4295	1,1965	0,896	0,7625	0,6775	0,384	0,8802143
	condition 9	1,7165	1,017	1,0325	1,0015	0,489	0,5915	0,4905	0,9055
	condition10	0,271	0,31175	0,308	0,3155	0,099	0,409	0,225	0,2770357
	condition 1	0,694	0,7965	1,0325	0,858	0,066	0,614	0,3515	0,6303571
	condition 2	0,3915	0,2235	0,481	0,6505	0,2145	0,3725	0,157	0,3557857
	condition 3	0,8035	0,9975	0,9165	0,892	0,5586	0,623	0,3485	0,7342286
	condition 4	0,762	1,251	1,076	1,0095	0,583	0,5905	0,451	0,8175714
	condition 5	0,824	1,479	1,825	0,9265	0,598	0,561	0,419	0,9475
	condition 6	0,788	1,4245	1,17	1,061	0,6925	0,676	0,4915	0,9005
	condition 7	0,7965	1,191	0,9555	0,922	0,3795	0,629	0,438	0,7587857
conc. 10%	condition 8	0,7735	1,4295	1,2145	1,0285	0,664	0,746	0,4	0,8937143
	condition 9	1,706	1,02975	1,099	0,9605	0,527	0,571	0,521	0,9163214
	condition10	0,247	0,359	0,296	0,422	0,1255	0,3805	0,2305	0,2943571
	condition 1	0,776	0,9295	1,037	0,9775	0,561	0,6695	0,4415	0,7702857
	condition 2	0,3785	0,255	0,426	0,608	0,2195	0,4895	0,1895	0,3665714
	condition 3	0,81	0,9965	0,976	0,9225	0,641	0,654	0,2995	0,7570714
	condition 4	0,8	1,367	1,112	0,998	0,7095	0,665	0,366	0,8596429
	condition 5	0,834	1,276	1,066	0,924	0,692	0,602	0,388	0,826
	condition 6	0,751	1,3775	1,1655	1,0925	0,712	0,733	0,4875	0,9027143
	condition 7	0,822	0,918	1,0145	0,9165	0,5425	0,7145	0,3875	0,7593571
conc. 12,5%	condition 8	0,841	1,4555	1,2495	0,963	0,795	0,79	0,3715	0,9236429
	condition 9	1,6585	1,0305	1,066	0,995	0,573	0,5605	0,511	0,9135
	condition 10	0,2275	0,3705	0,269	0,472	0,151	0,4	0,189	0,297

#### SERUM B

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
témoin	Conjugate	0,073	0,1485	0,1	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,1047143
	Milieu B	0,0675	0,0975	0,1185	0,0465	0,0695	0,209	0,0755	0,0977143

	Positif	1,2735	1,816	1,6045	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,2124286
	condition 1	0,7005	1,053	0,5835	0,9885	0,379	0,6345	0,3895	0,6755
	condition 2	0,141	0,4655	0,269	0,359	0,1245	0,4645	0,173	0,2852143
	condition 3	0,6955	0,9575	0,658	0,9035	0,4105	0,6235	0,4075	0,6651429
	condition 4	1,0805	1,287	0,6885	0,9805	0,5735	0,6395	0,402	0,8073571
conc. 7,5%	condition 5	1,0345	1,073	0,827	0,982	0,62	0,5875	0,3745	0,7855
	condition 6	1,03	1,292	0,6535	1,0955	0,61	0,637	0,4885	0,8295
	condition 7	0,636	0,9645	0,5675	0,891	0,452	0,594	0,3935	0,6426429
	condition 8	0,88	1,3945	1,016	1,0205	0,6385	0,7285	0,3335	0,8587857
	condition 9	1,817	1,1065	1,171	1,042	0,55	0,577	0,5245	0,9697143
	condition10	0,233	0,5895	0,749	0,43	0,1565	0,221	0,3105	0,3842143
	condition 1	0,8205	0,9145	1,0975	1,0705	0,371	0,697	0,428	0,7712857
	condition 2	0,7145	0,285	0,414	0,559	0,1145	0,424	0,2365	0,3925
	condition 3	0,836	0,8265	0,9995	0,883	0,3365	0,615	0,4385	0,705
	condition 4	1,058	0,959	1,112	1,0365	0,4505	0,566	0,4175	0,7999286
conc. 10%	condition 5	0,9735	1,1875	1,0885	0,9915	0,522	0,5015	0,4075	0,8102857
	condition 6	1,0355	1,2545	1,206	1,1185	0,625	0,5785	0,42	0,8911429
	condition 7	0,588	0,7825	0,9695	0,877	0,493	0,642	0,334	0,6694286
	condition 8	0,5855	1,238	1,373	1,0345	0,671	0,599	0,365	0,838
	condition 9	1,897	1,084	1,117	1,051	0,5025	0,5235	0,5415	0,9595
	condition10	0,2375	0,54725	0,6235	0,471	0,1455	0,19	0,2755	0,35575
	condition 1	0,759	0,927	0,995	0,949	0,5755	0,647	0,4955	0,764
	condition 2	0,1585	1,0045	0,267	0,4625	0,1525	0,334	0,295	0,382
	condition 3	0,814	1,1185	0,8545	0,869	0,5145	0,59	0,521	0,7545
	condition 4	1,0235	1,5305	1,0115	1,1305	0,591	0,616	0,684	0,941
	condition 5	1,2155	1,555	1,04	1,063	0,636	0,556	0,6145	0,9542857
conc. 12,5%	condition 6	1,308	1,5445	1,1045	0,981	0,4755	0,5575	0,572	0,9347143
	condition 7	0,7465	1,2395	0,88	0,9675	0,3575	0,425	0,527	0,7347143
	condition 8	1,3195	0,97	1,1435	1,138	0,5845	0,573	0,6675	0,9137143
	condition 9	1,9135	1,10925	1,1555	1,063	0,4575	0,433	0,618	0,96425
	condition10	0,2455	0,53575	0,6165	0,455	0,1275	0,1835	0,2365	0,3428929

## SERUM C

		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES									
	Conjugate	0,0705	0,108	0,111	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,1001429
témoins	Milieu C	0,0655	0,0995	0,07	0,0515	0,0705	0,1285	0,0565	0,0774286
	Positif	1,519	1,754	1,4975	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,2233571
	condition 1	0,527	1,0235	0,8805	0,923	0,599	0,5905	0,5185	0,7231429
	condition 2	0,1435	0,1955	0,3025	0,345	0,2	0,454	0,3935	0,2905714
	condition 3	0,736	1,012	0,776	0,7585	0,5785	0,5485	0,4995	0,7012857
	condition 4	0,44	1,4605	0,8505	1,0175	0,642	0,547	0,6305	0,7982857
conc. 7,5%	condition 5	1,231	1,42	1,0125	0,981	0,5955	0,5235	0,629	0,9132143
	condition 6	0,923	1,556	1,011	1,0255	0,5405	0,5405	0,5315	0,8754286
	condition 7	0,697	1,1565	0,827	0,9175	0,416	0,4595	0,5	0,7105
	condition 8	1,092	1,259	1,1015	1,0285	0,551	0,473	0,629	0,8762857
	condition 9	1,771	0,91975	0,9525	0,887	0,551	0,5365	0,5235	0,8773214
	condition10	0,2305	0,31875	0,3005	0,337	0,152	0,2345	0,242	0,2593214
	condition 1	0,705	1,0285	0,8775	1,0055	0,693	0,586	0,3665	0,7517143
	condition 2	0,1645	0,3065	0,307	0,5155	0,275	0,4775	0,1595	0,3150714
	condition 3	0,7975	1,033	0,737	0,847	0,547	0,6485	0,449	0,7227143

conc. 10%	condition 4	1,1645	1,4305	0,967	1,0355	0,551	0,577	0,5315	0,8938571
	condition 5	1,29	1,43	0,994	1,0245	0,58	0,598	0,455	0,9102143
	condition 6	0,9525	1,5285	1,011	1,013	0,6225	0,635	0,5305	0,899
	condition 7	0,7645	1,2005	0,872	0,9635	0,5285	0,5225	0,4975	0,7641429
	condition 8	1,226	1,3055	1,1195	1,131	0,646	0,5095	0,6495	0,941
	condition 9	1,7175	0,881	0,915	0,847	0,586	0,583	0,5415	0,8672857
	condition10	0,2165	0,3125	0,307	0,318	0,1815	0,22	0,242	0,2567857
	condition 1	0,9035	0,913	0,8515	1,005	0,897	0,602	0,4875	0,8085
	condition 2	0,1745	0,6005	0,2835	0,6055	0,34	0,383	0,1945	0,3687857
	condition 3	0,918	0,917	0,681	0,8925	0,6335	0,605	0,456	0,729
conc. 12,5%	condition 4	1,4155	1,406	0,818	1,0305	0,8195	0,581	0,508	0,9397857
	condition 5	1,341	1,4305	0,854	1,0085	0,6585	0,584	0,5665	0,9204286
	condition 6	1,0455	1,524	0,899	1,055	0,5835	0,6215	0,513	0,8916429
	condition 7	0,799	0,87	0,6965	0,916	0,5365	0,55	0,599	0,7095714
	condition 8	1,323	1,1515	1,004	1,1135	0,6625	0,5995	0,648	0,9288571
	condition 9	1,7625	0,916	0,867	0,965	0,5565	0,4955	0,5525	0,8735714
	condition10	0,227	0,4285	0,2725	0,5845	0,1845	0,193	0,282	0,3102857

## SERUM D

		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES	Conjugate	0,0695	0,1235	0,111	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,1022143
témoins	Milieu D	0,0855	0,1205	0,0655	0,0465	0,0675	0,1175	0,08	0,0832857
	Positif	1,427	1,551	1,4975	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,1812143
conc. 7,5%	condition 1	0,6265	0,2975	0,908	1,033	0,67	0,5715	0,3615	0,6382857
	condition 2	0,198	0,2205	0,3055	0,588	0,203	0,3105	0,311	0,3052143
	condition 3	0,864	0,8175	0,8125	1,1835	0,6335	0,522	0,3325	0,7379286
	condition 4	1,0755	1,459	0,891	1,103	0,6885	0,481	0,3535	0,8645
	condition 5	1,2345	1,457	1,045	1,108	0,5495	0,517	0,4065	0,9025
	condition 6	0,96	1,4615	0,9695	1,0535	0,699	0,621	0,3955	0,88
	condition 7	0,7595	0,82	0,7925	0,881	0,521	0,642	0,3275	0,6776429
	condition 8	1,1855	0,692	1,1255	1,11	0,636	0,5535	0,626	0,8469286
	condition 9	1,92	0,907	0,759	1,055	0,4845	0,4265	0,5495	0,8716429
	condition10	0,2175	0,46025	0,2205	0,7	0,1345	0,1215	0,146	0,28575
conc. 10%	condition 1	0,712	0,619	1,1675	1,037	0,491	0,4825	0,39	0,6998571
	condition 2	0,168	0,177	0,3435	0,3745	0,151	0,2255	0,233	0,2389286
	condition 3	0,7425	0,599	1,0165	0,9105	0,403	0,3785	0,4025	0,6360714
	condition 4	1,095	1,0815	1,231	1,097	0,4595	0,374	0,3985	0,8195
	condition 5	1,1415	0,9795	1,3065	1,1695	0,417	0,4095	0,414	0,8339286
	condition 6	0,7415	1,0505	1,2715	1,093	0,6495	0,456	0,4755	0,8196429
	condition 7	0,6515	0,716	1,082	0,9735	0,5935	0,4585	0,3865	0,6945
	condition 8	1,066	0,852	1,3435	1,1395	0,4695	0,5365	0,473	0,84
	condition 9	1,7755	0,96375	0,844	1,0835	0,483	0,493	0,5585	0,8858929
	condition10	0,2265	0,4925	0,251	0,734	0,1815	0,17	0,1375	0,3132857
conc. 12,5%	condition 1	0,728	0,6955	1,097	1,141	0,6645	0,434	0,312	0,7245714
	condition 2	0,1755	0,399	0,3225	0,601	0,314	0,215	0,159	0,3122857
	condition 3	0,751	0,6235	0,9925	0,9735	0,4845	0,2925	0,3825	0,6428571
	condition 4	1,134	0,8775	1,2485	1,166	0,547	0,432	0,472	0,8395714
	condition 5	1,211	1,0225	1,2525	1,1075	0,501	0,389	0,5155	0,857
	condition 6	0,752	1,082	1,2765	1,174	0,527	0,4505	0,532	0,8277143
	condition 7	0,661	0,49	1,068	1,08	0,3755	0,5	0,424	0,6569286

	condition 8	1,0175	0,7805	1,293	1,2355	0,5715	0,5225	0,5375	0,8511429
	condition 9	1,65	0,93875	0,779	1,0985	0,4765	0,5315	0,5745	0,8641071
	condition10	0,2275	0,4445	0,2775	0,6115	0,1785	0,172	0,145	0,2937857
<b>SERUM E</b>									
		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES	Conjugate	0,0695	0,1235	0,111	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,1022143
témoins	Milieu E	0,0535	0,112	0,055	0,046	0,053	0,136	0,0595	0,0735714
	Positif	1,427	1,551	1,4975	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,1812143
	condition 1	0,7195	0,6455	1,233	1,659	0,1925	0,4165	0,3635	0,7470714
	condition 2	0,169	0,2615	0,3855	0,312	0,0945	0,2135	0,267	0,2432857
	condition 3	0,8825	0,5765	1,117	0,976	0,411	0,391	0,3165	0,6672143
	condition 4	1,198	1,0095	1,2405	1,1185	0,404	0,448	0,365	0,8262143
conc. 7,5%	condition 5	1,216	0,986	1,248	1,164	0,4815	0,3895	0,3555	0,8343571
	condition 6	0,776	1,063	1,243	1,211	0,4735	0,4575	0,4655	0,8127857
	condition 7	0,677	0,627	1,141	1,077	0,343	0,4705	0,379	0,6735
	condition 8	1,078	0,7715	1,2905	1,217	0,4575	0,5395	0,451	0,8292857
	condition 9	1,5525	1,22275	1,1975	1,248	0,494	0,8105	0,5035	1,0041071
	condition10	0,2145	0,51775	0,533	0,5025	0,135	0,438	0,2155	0,3651786
	condition 1	0,8085	0,294	1,1735	1,038	0,5135	0,5005	0,4245	0,6789286
	condition 2	0,2	0,191	0,5675	0,5235	0,2245	0,259	0,23	0,3136429
	condition 3	0,8445	0,54	0,883	0,9525	0,388	0,441	0,384	0,6332857
	condition 4	1,214	0,9845	1,131	1,095	0,469	0,5035	0,416	0,8304286
conc. 10%	condition 5	1,2685	1,058	1,0285	1,006	0,528	0,3685	0,47	0,8182143
	condition 6	0,9645	1,0235	1,0165	1,1455	0,5035	0,5045	0,464	0,8031429
	condition 7	0,755	0,648	0,944	0,986	0,442	0,4765	0,4505	0,6717143
	condition 8	1,05	0,936	1,2215	1,188	0,43	0,515	0,6575	0,8568571
	condition 9	1,572	1,1955	1,181	1,21	0,5305	0,7845	0,542	1,0022143
	condition10	0,244	0,53275	0,5165	0,549	0,157	0,343	0,305	0,3781786
	condition 1	0,9475	0,474	1,3	0,9265	0,518	0,6345	0,4465	0,7495714
	condition 2	0,18	0,204	0,5795	0,525	0,2615	0,336	0,227	0,3304286
	condition 3	0,918	0,4765	1,0885	0,995	0,4245	0,6485	0,4145	0,7093571
	condition 4	1,1695	0,8755	1,2895	1,086	0,477	0,504	0,429	0,8329286
	condition 5	1,333	0,9535	1,15	1,14	0,382	0,467	0,4925	0,8454286
conc. 12,5%	condition 6	0,916	1,004	1,279	1,1955	0,3465	0,5505	0,4675	0,8227143
	condition 7	0,8325	0,5905	1,1145	1,0275	0,361	0,5435	0,421	0,6986429
	condition 8	1,333	0,8915	1,379	1,1845	0,5295	0,7205	0,631	0,9527143
	condition 9	1,716	1,131	1,1505	1,1115	0,567	0,736	0,5765	0,9983571
	condition10	0,245	0,53075	0,5235	0,538	0,155	0,297	0,319	0,3726071

## SERUM F

		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES	Conjugate	0,074	0,0605	0,111	0,059	0,083	0,193	0,0765	0,0938571
témoins	Milieu F	0,068	0,077	0,064	0,0495	0,0625	0,138	0,06	0,0741429
	Positif	1,2365	1,6355	1,4975	1,2425	1,0275	1,204	0,319	1,1660714
	condition 1	0,537	0,989	1,2155	0,792	0,229	0,6385	0,599	0,7142857
	condition 2	0,15	0,2265	0,464	0,292	0,1175	0,395	0,5065	0,3073571
	condition 3	0,5745	0,143	1,069	0,7125	0,4355	0,6105	0,535	0,5828571
	condition 4	0,9055	1,3275	1,3055	0,8255	0,4445	0,6225	0,681	0,8731429
conc. 7,5%	condition 5	1,0045	1,2935	1,273	0,8635	0,4355	0,555	0,6715	0,8709286

	condition 6	0,7475	1,303	1,26	0,886	0,5335	0,6005	0,64	0,8529286
	condition 7	0,6785	1,0005	1,0935	0,759	0,4165	0,6175	0,6195	0,7407143
	condition 8	0,847	1,2895	1,327	0,8325	0,652	0,584	0,6785	0,8872143
	condition 9	1,728	1,12025	1,293	0,9475	0,482	0,8475	0,6435	1,0088214
	condition10	0,212	0,64775	0,69	0,6055	0,1115	0,522	0,318	0,4438214
	condition 1	0,304	0,9505	1,2165	0,6955	0,397	0,661	0,603	0,6896429
	condition 2	0,084	0,2065	0,4125	0,4895	0,17	0,36	0,2745	0,2852857
	condition 3	0,5885	0,8605	1,136	0,679	0,159	0,6	0,5945	0,6596429
	condition 4	1,047	1,223	1,188	0,881	0,5715	0,67	0,7405	0,903
conc. 10%	condition 5	1,0835	1,2395	1,2115	0,84	0,601	0,593	0,6675	0,8908571
	condition 6	0,615	1,2005	1,233	0,9225	0,547	0,6285	0,684	0,8329286
	condition 7	0,609	0,901	1,049	0,8255	0,458	0,619	0,641	0,7289286
	condition 8	1,131	0,9135	1,325	0,941	0,582	0,566	0,731	0,8842143
	condition 9	1,778	1,14075	1,2895	0,992	0,53	0,807	0,6145	1,0216786
	condition10	0,223	0,556	0,6215	0,4905	0,147	0,5555	0,3145	0,4154286
	condition 1	0,5735	0,7445	1,2215	0,687	0,369	0,679	0,507	0,6830714
	condition 2	0,132	0,374	0,395	0,3655	0,357	0,5345	0,441	0,3712857
	condition 3	0,626	0,8185	1,1165	0,778	0,212	0,564	0,547	0,666
	condition 4	1,04	1,269	1,3025	0,93	0,5275	0,727	0,687	0,9261429
	condition 5	1,1585	1,1685	1,2815	0,8965	0,589	0,665	0,636	0,9135714
conc. 12,5%	condition 6	0,5845	1,2585	1,3315	0,9625	0,5195	0,64	0,5455	0,8345714
	condition 7	0,5785	0,813	1,0765	0,745	0,404	0,648	0,473	0,6768571
	condition 8	1,1135	0,835	1,4565	0,9525	0,548	0,6585	0,7085	0,8960714
	condition 9	1,8565	1,1165	1,217	1,016	0,5455	0,813	0,647	1,0302143
	condition 10	0,2215	0,54825	0,648	0,4485	0,161	0,6475	0,2755	0,4214643

## SERUM G

		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES									
	Conjugué	0,106	0,0885	0,1115	0,0795	0,075	0,164	0,1405	0,1092857
témoins	Milieu G	0,084	0,098	0,1115	0,0925	0,0685	0,0915	0,081	0,0895714
	Positif	1,867	0,8505	1,3445	1,2465	1,038	1,041	0,4345	1,1174286
	condition 1	1,8585	0,18	1,0675	1,048	0,6635	0,6695	0,485	0,8531429
	condition 2	0,4845	0,1095	0,3485	0,5575	0,166	0,464	0,3005	0,3472143
	condition 3	1,8355	0,1535	0,929	0,9655	0,412	0,6075	0,4335	0,7623571
	condition 4	2,046	0,4895	1,2235	1,1235	0,5665	0,703	0,566	0,9597143
conc. 7,5%	condition 5	2,106	0,407	1,125	1,103	0,5205	0,6555	0,5875	0,9292143
	condition 6	1,8975	0,532	1,128	1,1625	0,6205	0,712	0,5885	0,9487143
	condition 7	1,9375	0,2475	1,041	0,9645	0,4965	0,58	0,4985	0,8236429
	condition 8	2,059	0,4695	1,2905	1,1395	0,6005	0,6155	0,47	0,9492143
	condition 9	1,729	1,07325	1,128	1,0185	0,561	0,784	0,4875	0,96875
	condition10	0,2205	0,4545	0,4255	0,4835	0,129	0,3175	0,122	0,3075
	condition 1	1,9635	0,1905	1,27	1,0285	0,566	0,616	0,465	0,8713571
	condition 2	0,37	0,1465	0,4175	0,4675	0,2205	0,3655	0,244	0,3187857
	condition 3	1,7515	0,1815	1,0465	0,9195	0,5185	0,6185	0,5045	0,7915
	condition 4	2,0075	0,436	1,3125	1,069	0,5765	0,651	0,594	0,9495
conc. 10%	condition 5	1,987	0,438	1,246	1,09	0,563	0,565	0,5925	0,9259286
	condition 6	1,7345	0,4815	1,2805	1,124	0,7145	0,6505	0,605	0,9415
	condition 7	1,6815	0,2395	1,281	0,9505	0,564	0,546	0,477	0,8199286
	condition 8	2,075	0,5335	1,466	1,1775	0,681	0,608	0,516	1,0081429
	condition 9	1,709	1,07575	1,124	1,0275	0,5745	0,735	0,541	0,9695357

	condition10	0,212	0,5225	0,5105	0,5345	0,1305	0,3605	0,3945	0,3807143
	condition 1	1,8845	0,1435	0,834	1,0105	0,5285	0,6275	0,3425	0,7672857
	condition 2	0,417	0,2655	0,291	0,418	0,276	0,382	0,177	0,3180714
	condition 3	1,7795	0,199	0,7605	0,951	0,477	0,655	0,4175	0,7485
	condition 4	1,964	0,373	0,856	1,1385	0,5705	0,7065	0,5405	0,8784286
	condition 5	2,0255	0,367	0,938	1,0925	0,6215	0,575	0,446	0,8665
conc. 12,5%	condition 6	1,987	0,4605	1,0205	1,1325	0,628	0,657	0,495	0,9115
	condition 7	1,776	0,246	0,802	0,94	0,4125	0,664	0,415	0,7507857
	condition 8	2,0045	0,527	1,0185	1,186	0,719	0,6255	0,5025	0,9404286
	condition 9	1,698	1,0755	1,108	1,043	0,5645	0,709	0,4825	0,9543571
	condition 10	0,2025	0,62175	0,607	0,6365	0,1325	0,4065	0,669	0,4679643

## SERUM H

		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
AMYGDALES	Conjugué	0,106	0,0885	0,1115	0,0795	0,075	0,164	0,1405	0,1092857
témoins	Milieu H	0,1065	0,0705	0,104	0,057	0,06	0,092	0,069	0,0798571
	Positif	1,867	0,8505	1,3445	1,2465	1,038	1,041	0,4345	1,1174286
	condition 1	1,65	0,1665	0,5825	1,03	0,5395	0,587	0,5575	0,7304286
	condition 2	0,366	0,146	0,244	0,565	0,184	0,3115	0,2285	0,2921429
	condition 3	1,838	0,136	0,699	0,8895	0,5905	0,6525	0,501	0,7580714
	condition 4	2,1115	0,146	0,824	1,098	0,4995	0,6475	0,5505	0,8395714
conc. 7,5%	condition 5	2,094	0,1575	0,873	0,9925	0,6375	0,624	0,559	0,8482143
	condition 6	1,689	0,1485	0,8795	1,102	0,6815	0,72	0,51	0,8186429
	condition 7	1,646	0,173	0,7625	0,813	0,577	0,6	0,494	0,7236429
	condition 8	2,043	0,119	1,027	1,1415	0,6885	0,6665	0,504	0,8842143
	condition 9	1,764	0,946	0,856	1,036	0,489	0,2525	0,6005	0,8491429
	condition10	0,231	0,34275	0,3155	0,37	0,122	0,1615	0,1765	0,2456071
	condition 1	1,84	0,1895	0,566	1,086	0,5375	0,6225	0,536	0,7682143
	condition 2	0,367	0,1075	0,247	0,706	0,2145	0,3055	0,316	0,3233571
	condition 3	1,772	0,2175	0,7195	0,917	0,5695	0,616	0,513	0,7606429
	condition 4	1,974	0,272	0,874	1,1175	0,5695	0,6685	0,5975	0,8675714
conc. 10%	condition 5	2,0375	0,358	0,9055	1,086	0,652	0,5965	0,561	0,8852143
	condition 6	1,8345	0,4275	0,8945	0,8035	0,647	0,6455	0,562	0,8306429
	condition 7	1,7075	0,2395	0,7685	0,533	0,5825	0,6055	0,527	0,7090714
	condition 8	1,9975	0,361	0,9865	1,1545	0,6875	0,657	0,5355	0,9113571
	condition 9	1,7355	0,925	0,8455	1,0045	0,6085	0,49	0,578	0,8838571
	condition10	0,2805	0,5125	0,379	0,646	0,156	0,2565	0,1315	0,3374286
	condition 1	1,7495	0,1585	0,7375	1,1375	0,567	0,688	0,5505	0,7983571
	condition 2	0,2915	0,1745	0,25	0,7805	0,2175	0,358	0,4035	0,3536429
	condition 3	1,5415	0,1895	0,7205	0,9575	0,448	0,6415	0,521	0,7170714
	condition 4	1,9605	0,3765	0,8965	1,1895	0,5645	0,696	0,6385	0,9031429
	condition 5	2,1535	0,301	0,923	1,1585	0,6045	0,607	0,6	0,9067857
conc. 12,5%	condition 6	1,8525	0,5795	0,929	0,8135	0,657	0,7	0,5745	0,8722857
	condition 7	1,679	0,2725	0,746	0,39	0,5835	0,5925	0,561	0,6892143
	condition 8	2,0785	0,4035	0,9775	1,0615	0,707	0,654	0,5995	0,9259286
	condition 9	1,8015	0,92675	0,891	0,9625	0,654	0,709	0,5055	0,9214643
	condition 10	0,237	0,64375	0,422	0,8655	0,1715	0,333	0,13	0,4003929

## SERUM I

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
témoin	Conjugate	0,1005	0,0885	0,109	0,0795	0,075	0,164	0,1405	0,1081429
	Milieu I	0,079	0,0855	0,074	0,055	0,056	0,07	0,06	0,0685
	Positif	2,0415	0,8505	1,428	1,2465	1,038	1,041	0,4345	1,1542857
conc. 7,5%	condition 1	1,761	0,1685	0,7795	0,941	0,5485	0,6335	0,48	0,7588571
	condition 2	0,2655	0,1025	0,269	0,611	0,1775	0,31	0,171	0,2723571
	condition 3	1,592	0,1785	0,772	0,8715	0,2985	0,6595	0,421	0,6847143
	condition 4	1,9825	0,288	0,9045	1,041	0,543	0,6185	0,4955	0,839
	condition 5	2,0745	0,2845	0,8715	1,0885	0,569	0,5835	0,432	0,8433571
	condition 6	1,19	0,33	0,828	1,127	0,5655	0,6415	0,462	0,7348571
	condition 7	1,7455	0,1915	0,7835	1,001	0,476	0,624	0,3805	0,7431429
	condition 8	2,027	0,3545	0,6515	0,976	0,5105	0,5765	0,4635	0,7942143
	condition 9	1,857	0,8965	0,856	0,937	0,541	0,7305	0,5925	0,9157857
	condition 10	0,212	0,3505	0,2935	0,4075	0,127	0,3735	0,1805	0,2777857
conc. 10%	condition 1	1,747	0,189	0,7645	0,992	0,5025	0,692	0,5085	0,7707857
	condition 2	0,2225	0,141	0,3315	0,4925	0,185	0,3425	0,165	0,2685714
	condition 3	1,6705	0,222	0,8045	0,882	0,397	0,6575	0,448	0,7259286
	condition 4	2,1625	0,2575	0,9265	1,047	0,5395	0,6485	0,5005	0,8688571
	condition 5	2,015	0,236	0,928	1,108	0,5675	0,5685	0,423	0,8351429
	condition 6	2,048	0,3175	0,9025	1,1315	0,6135	0,6655	0,46	0,8769286
	condition 7	1,8575	0,194	0,785	1,031	0,4925	0,6265	0,417	0,7719286
	condition 8	2,0105	0,343	0,994	1,048	0,568	0,65	0,512	0,8750714
	condition 9	1,787	0,7235	0,5565	0,8905	0,522	0,8385	0,573	0,8415714
	condition 10	0,221	0,3435	0,331	0,356	0,135	0,339	0,208	0,2762143
conc. 12,5%	condition 1	1,494	0,2225	0,8265	0,95	0,4385	0,7205	0,453	0,7292857
	condition 2	0,3225	0,165	0,3375	0,433	0,1885	0,3805	0,1585	0,2836429
	condition 3	1,6975	0,215	0,804	0,917	0,4855	0,655	0,433	0,7438571
	condition 4	2,049	0,363	0,959	1,053	0,548	0,656	0,476	0,872
	condition 5	2,026	0,2925	0,987	1,0785	0,562	0,552	0,404	0,8431429
	condition 6	2,0675	0,268	0,973	1,0975	0,66	0,6515	0,447	0,8806429
	condition 7	1,6805	0,2105	0,8365	1,023	0,461	0,6445	0,42	0,7537143
	condition 8	2,1075	0,352	1,036	1,07	0,583	0,6495	0,5095	0,9010714
	condition 9	1,762	0,5915	0,3155	0,8675	0,4875	0,8615	0,6065	0,7845714
	condition 10	0,2035	0,331	0,3595	0,3025	0,1245	0,299	0,2225	0,2632143
<b>SERUM T</b>									
AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
témoin	Conjugate	0,0895	0,0885	0,108	0,0795	0,075	0,164	0,1405	0,1064286
	Milieu T	0,068	0,106	0,067	0,0495	0,0585	0,0945	0,063	0,0723571
	Positif	1,8235	0,44415	1,4485	1,2465	1,038	1,041	0,4345	1,0580214
conc. 7,5%	condition 1	1,415	0,171	0,803	1,022	0,2675	0,6645	0,4195	0,6803571
	condition 2	0,2755	0,1225	0,2455	0,358	0,1035	0,2405	0,1625	0,2154286
	condition 3	1,669	0,159	0,7805	0,8925	0,238	0,5245	0,43	0,6705
	condition 4	1,9805	0,31	1,008	1,001	0,4455	0,5215	0,4645	0,8187143
	condition 5	2,016	0,287	0,993	1,0125	0,606	0,492	0,4315	0,834
	condition 6	2,0825	0,2765	1,0165	1,0405	0,567	0,533	0,4655	0,8545
	condition 7	1,6705	0,179	0,7845	0,9725	0,296	0,542	0,4335	0,6968571

	condition 8	2,0555	0,34	1,045	0,9905	0,427	0,6055	0,582	0,8636429
	condition 9	1,8405	0,43825	0,387	0,4895	0,6355	0,745	0,5595	0,7278929
	condition 10	0,2165	0,2565	0,314	0,199	0,1255	0,425	0,201	0,2482143
conc. 10%	condition 1	1,221	0,1695	0,8075	1,0145	0,3955	0,7005	0,427	0,6765
	condition 2	0,184	0,149	0,29	0,4725	0,1495	0,2795	0,213	0,2482143
	condition 3	1,5985	0,1455	0,772	0,9145	0,3775	0,5485	0,466	0,6889286
	condition 4	1,9075	0,4555	0,9885	1,0095	0,558	0,568	0,4815	0,8526429
	condition 5	1,947	0,439	1,056	1,0475	0,6565	0,5055	0,483	0,8763571
	condition 6	1,9135	0,462	1,021	1,0365	0,636	0,56	0,466	0,8707143
	condition 7	1,52	0,577	0,766	0,92	0,369	0,5575	0,4615	0,7387143
	condition 8	1,98	0,504	1,005	1,014	0,5805	0,5835	0,5615	0,8897857
	condition 9	1,7895	0,3905	0,407	0,374	0,6575	0,7465	0,6015	0,7095
	condition 10	0,2045	0,2195	0,3105	0,1285	0,0975	0,351	0,2095	0,2172857
conc. 12,5%	condition 1	1,4805	0,163	0,74	1,0045	0,525	0,617	0,465	0,7135714
	condition 2	0,209	0,107	0,278	0,5	0,1675	0,3265	0,331	0,2741429
	condition 3	1,474	0,207	0,6525	0,9055	0,5355	0,577	0,4795	0,6901429
	condition 4	1,8935	0,5835	0,9005	1,0045	0,6265	0,5975	0,4965	0,8717857
	condition 5	1,9345	0,518	0,976	1,0825	0,706	0,529	0,5015	0,8925
	condition 6	1,963	0,5435	0,919	1,087	0,7125	0,577	0,4835	0,8979286
	condition 7	1,4575	0,323	0,7245	0,873	0,579	0,549	0,463	0,7098571
	condition 8	2,018	0,5845	0,9075	1,016	0,7335	0,515	0,5045	0,897
	condition 9	1,7315	0,36225	0,4335	0,291	0,6195	0,636	0,6525	0,6751786
	condition 10	0,2365	0,20225	0,3405	0,064	0,101	0,335	0,208	0,2124643

**TABLEAU IIIb : Resultats du dosage des immunoglobulines par ELISA (type IgG)**

**IgG**

**SERUM A**

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
témoin	Conjugate	0,096	0,2615	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,1921875
	Milieu A	0,0815	0,251	0,155	0,118	0,1775	0,218	0,2235	0,1530625
	Positif	1,0625	0,884	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,8055625
conc. 7,5%	condition 1	0,811	0,678	0,9415	0,605	0,737	0,636	0,6425	0,631375
	condition 2	0,733	0,427	0,7885	0,51	0,4725	0,5365	0,514	0,4976875
	condition 3	0,785	0,5665	0,4125	0,596	0,6545	0,705	0,6795	0,549875
	condition 4	0,7575	0,6555	0,602	0,6225	0,676	0,6855	0,6035	0,5753125
	condition 5	0,8585	0,6065	0,5695	0,6375	0,783	0,7275	0,6455	0,6035
	condition 6	0,83	0,585	0,5485	0,5675	0,692	0,668	0,591	0,56025
	condition 7	0,8285	0,582	0,6785	0,6105	0,74	0,684	0,635	0,5948125
	condition 8	0,8155	0,649	0,8185	0,601	0,7305	0,596	0,548	0,5948125
	condition 9	1,4155	0,62075	0,55	0,6915	0,4665	0,7485	0,635	0,64096875
	condition 10	0,627	0,4985	0,433	0,564	0,3815	0,742	0,483	0,466125
	condition 1	0,694	0,678	1,0945	0,5885	0,704	0,5705	0,5935	0,615375
	condition 2	0,3915	0,463	0,714	0,546	0,6685	0,528	0,514	0,478125



	condition 3	0,8035	0,624	0,5495	0,6225	0,6705	0,6835	0,655	0,5760625
	condition 4	0,762	0,723	0,584	0,636	0,658	0,6915	0,623	0,5846875
conc. 10%	condition 5	0,824	0,7215	0,577	0,5985	0,7135	0,638	0,591	0,5829375
	condition 6	0,788	0,661	0,542	0,5645	0,837	0,615	0,596	0,5754375
	condition 7	0,7965	0,634	0,718	0,5855	0,8915	0,621	0,6025	0,606125
	condition 8	0,7735	0,727	0,703	0,613	0,9745	0,5855	0,555	0,6164375
	condition 9	1,395	0,65	0,5495	0,7505	0,4505	0,733	0,6245	0,644125
	condition 10	0,5885	0,51275	0,4215	0,604	0,399	0,649	0,488	0,45784375
	condition 1	0,776	0,6245	0,8405	0,6305	0,68	0,771	0,754	0,6345625
	condition 2	0,3785	0,5325	0,648	0,5635	0,4485	0,574	0,5105	0,4569375
	condition 3	0,81	0,5435	0,61	0,6155	0,6345	0,7215	0,6575	0,5740625
	condition 4	0,8	0,656	0,542	0,6355	1,095	0,604	0,5585	0,611375
	condition 5	0,834	0,632	0,6035	0,605	0,7775	0,6445	0,6075	0,588
Concentrat°	condition 6	0,751	0,631	0,564	0,6115	0,8885	0,615	0,5935	0,5818125
12.5%	condition 7	0,822	0,601	0,6775	0,606	0,787	0,6575	0,634	0,598125
	condition 8	0,841	0,6555	0,7775	0,69	0,9495	0,6105	0,589	0,639125
	condition 9	1,3685	0,6485	0,51	0,787	0,452	0,749	0,6045	0,6399375
	condition 10	0,563	0,4875	0,385	0,59	0,383	0,532	0,5415	0,43525

## SERUM B

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,096	0,2615	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,1921875
témoins	Milieu B	0,1345	0,251	0,2485	0,154	0,173	0,166	0,176	0,162875
	Positif	1,0625	0,884	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,8055625
	condition 1	0,693	0,653	0,872	0,6235	0,603	0,6615	0,6605	0,5958125
	condition 2	0,384	0,4775	0,7495	0,5105	0,5265	0,5635	0,5375	0,468625
	condition 3	0,7685	0,6105	0,65	0,611	0,5455	0,703	0,676	0,5705625
	condition 4	0,8025	0,7265	0,558	0,6355	0,7655	0,6725	0,6225	0,597875
conc. 7,5%	condition 5	0,7875	0,6365	0,569	0,589	0,734	0,6605	0,6095	0,57325
	condition 6	0,752	0,6635	0,562	0,5955	0,774	0,589	0,572	0,5635
	condition 7	0,791	0,634	0,5695	0,571	0,858	0,6445	0,631	0,587375
	condition 8	0,7775	0,7115	0,8465	0,6085	0,7815	0,673	0,5715	0,62125
	condition 9	1,387	0,63425	0,5965	0,672	0,5245	0,6955	0,6875	0,64965625
	condition 10	0,548	0,45	0,494	0,406	0,462	0,631	0,705	0,462
	condition 1	0,7115	0,499	0,6805	0,64	0,703	0,804	0,799	0,604625
	condition 2	0,5635	0,708	0,9245	0,59	0,4185	0,516	0,487	0,5259375
	condition 3	0,524	0,6485	0,753	0,646	0,6125	0,654	0,64	0,55975
	condition 4	0,779	0,655	0,536	0,6215	0,6135	0,634	0,588	0,553375
conc. 10%	condition 5	0,767	0,6875	0,777	0,6295	0,942	0,583	0,55	0,617
	condition 6	0,751	0,7365	0,6545	0,6065	0,715	0,487	0,497	0,5559375
	condition 7	0,785	0,639	0,6925	0,6005	1,1165	0,65	0,636	0,6399375
	condition 8	0,7725	0,641	0,8055	0,681	0,746	0,604	0,566	0,602
	condition 9	1,4065	0,627	0,553	0,701	0,506	0,6975	0,6435	0,6418125
	condition 10	0,561	0,452	0,4755	0,4285	0,43	0,5985	0,608	0,4441875
	condition 1	0,8755	0,5915	0,709	0,576	0,6615	0,585	0,5495	0,5685
	condition 2	0,434	0,467	0,649	0,456	0,32	0,468	0,4305	0,4030625
	condition 3	0,8495	0,545	0,6105	0,5235	0,988	0,6145	0,571	0,58775
	condition 4	0,8805	0,6345	0,547	0,552	0,5755	0,619	0,543	0,5439375
	condition 5	0,9015	0,627	0,5455	0,534	0,469	0,627	0,574	0,53475
Concentrat°	condition 6	0,782	0,7405	0,533	0,545	0,456	0,6045	0,551	0,5265

12.5%	condition 7	0,8085	0,562	0,57	0,5505	0,4485	0,5915	0,568	0,512375
	condition 8	0,8315	0,658	0,735	0,525	0,4545	0,6675	0,64	0,5639375
	condition 9	1,426	0,63025	0,5615	0,699	0,5135	0,659	0,601	0,63628125
	condition 10	0,609	0,51225	0,475	0,5495	0,3865	0,549	0,5135	0,44934375

## SERUM C

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,1085	0,469	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,2196875
témoins	Milieu C	0,0905	0,2065	0,1965	0,0885	0,164	0,182	0,1405	0,1335625
	Positif	1,2135	0,9225	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,82925
	condition 1	0,8415	0,6855	0,7765	0,5335	0,5615	0,556	0,539	0,5616875
	condition 2	0,4085	0,516	0,6845	0,437	0,35	0,437	0,4185	0,4064375
	condition 3	0,775	0,606	0,5855	0,5095	0,512	0,5195	0,478	0,4981875
	condition 4	0,62	0,6755	0,523	0,5235	0,5205	0,5585	0,506	0,490875
conc. 7,5%	condition 5	0,9195	0,684	0,553	0,531	0,4725	0,6365	0,579	0,5469375
	condition 6	0,8555	0,8075	0,5565	0,5505	0,5165	0,5375	0,5085	0,5415625
	condition 7	0,792	0,5675	0,5815	0,555	0,4905	0,521	0,51	0,5021875
	condition 8	0,8445	0,5865	0,6725	0,535	0,4655	0,611	0,566	0,547625
	condition 9	1,44	0,558	0,487	0,629	0,5185	0,6155	0,593	0,605125
	condition 10	0,568	0,444	0,4485	0,4395	0,4095	0,431	0,6105	0,418875
	condition 1	0,8605	0,535	0,6605	0,556	0,5625	0,589	0,5415	0,538125
	condition 2	0,4215	0,538	0,5745	0,496	0,355	0,461	0,408	0,40675
	condition 3	0,862	0,5525	0,6025	0,532	0,486	0,595	0,5375	0,5209375
	condition 4	0,891	0,6605	0,5215	0,5275	0,5225	0,558	0,496	0,522125
conc. 10%	condition 5	0,8855	0,617	0,5205	0,543	0,5295	0,608	0,549	0,5315625
	condition 6	0,8255	0,7205	0,4935	0,5645	0,4955	0,6365	0,585	0,540125
	condition 7	0,847	0,577	0,518	0,5855	0,4405	0,603	0,5795	0,5188125
	condition 8	0,862	0,6545	0,6425	0,595	0,4765	0,7245	0,692	0,580875
	condition 9	1,3865	0,57725	0,5015	0,653	0,5345	0,538	0,6735	0,60803125
	condition 10	0,5695	0,48175	0,477	0,4865	0,4305	0,3955	0,647	0,43596875
	condition 1	0,891	0,602	0,6055	0,577	0,6105	0,5895	0,5565	0,554
	condition 2	0,481	0,53	0,3915	0,484	0,3705	0,5075	0,4505	0,401875
	condition 3	0,876	0,6105	0,445	0,565	0,492	0,5805	0,5235	0,5115625
	condition 4	0,7795	0,7225	0,442	0,561	0,609	0,5685	0,489	0,5214375
	condition 5	0,866	0,749	0,454	0,5465	0,444	0,653	0,567	0,5349375
Concentrat°	condition 6	0,861	0,7585	0,423	0,556	0,4765	0,587	0,5245	0,5233125
12.5%	condition 7	0,87	0,6805	0,4765	0,55	0,487	0,6475	0,594	0,5381875
	condition 8	0,886	0,761	0,546	0,5155	0,4575	0,7395	0,693	0,5748125
	condition 9	1,373	0,60075	0,5215	0,68	0,5235	0,6405	0,5905	0,61621875
	condition 10	0,509	0,498	0,451	0,545	0,4015	0,4565	0,5245	0,4231875

## SERUM D

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,099	0,469	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,2185
témoins	Milieu D	0,0935	0,172	0,184	0,0825	0,212	0,147	0,127	0,12725
	Positif	1,2615	0,9225	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,83525
	condition 1	0,8585	0,2275	0,6505	0,5975	0,562	0,5285	0,476	0,4875625
	condition 2	0,4175	0,1685	0,4775	0,493	0,477	0,4825	0,4255	0,3676875
	condition 3	0,878	0,237	0,498	0,5735	0,458	0,5805	0,4935	0,4648125
	condition 4	0,8045	0,171	0,5245	0,574	0,782	0,5395	0,456	0,4814375

conc. 7,5%	condition 5	0,8185	0,263	0,554	0,5625	0,4375	0,5755	0,486	0,462125
	condition 6	0,8655	0,1625	0,565	0,5555	0,7715	0,566	0,5115	0,4996875
	condition 7	0,8585	0,177	0,784	0,5585	0,3835	0,5995	0,551	0,489
	condition 8	0,8805	0,1425	0,8045	0,538	0,485	0,572	0,5225	0,493125
	condition 9	1,375	0,365	0,51	0,635	0,4635	0,695	0,544	0,5734375
	condition 10	0,5155	0,099	0,394	0,51	0,3235	0,5415	0,557	0,3675625
	condition 1	0,907	0,2675	0,4345	0,428	0,596	0,64	0,5935	0,4833125
	condition 2	0,492	0,1985	0,334	0,307	0,3715	0,561	0,5125	0,3470625
	condition 3	0,905	0,2555	0,427	0,4585	0,478	0,6895	0,627	0,4800625
	condition 4	0,879	0,1995	0,404	0,414	0,481	0,685	0,589	0,4564375
conc. 10%	condition 5	0,78	0,286	0,3885	0,495	0,47	0,675	0,5875	0,46025
	condition 6	0,899	0,2085	0,3745	0,457	0,471	0,698	0,615	0,465375
	condition 7	0,9055	0,2765	0,404	0,503	0,4535	0,712	0,657	0,4889375
	condition 8	0,9425	0,223	0,422	0,552	0,478	0,804	0,709	0,5163125
	condition 9	1,3685	0,485	0,512	0,6115	0,458	0,6805	0,5575	0,584125
	condition 10	0,508	0,133	0,41	0,552	0,334	0,503	0,539	0,372375
	condition 1	0,88	0,218	0,4655	0,379	0,5685	0,6245	0,5805	0,4645
	condition 2	0,4845	0,1865	0,364	0,3625	0,35	0,5175	0,473	0,34225
	condition 3	0,894	0,243	0,428	0,507	0,4885	0,657	0,6	0,4771875
	condition 4	0,864	0,1915	0,4335	0,4125	0,519	0,636	0,565	0,4526875
Concentrat° 12.5%	condition 5	0,8385	0,251	0,438	0,43	0,435	0,675	0,5855	0,456625
	condition 6	0,962	0,136	0,433	0,489	0,4755	0,641	0,5705	0,463375
	condition 7	0,919	0,238	0,411	0,4715	0,4905	0,5925	0,5495	0,459
	condition 8	0,913	0,2115	0,4485	0,461	0,4845	0,7345	0,6555	0,4885625
	condition 9	1,389	0,32	0,538	0,649	0,43	0,683	0,5495	0,5698125
	condition 10	0,582	0,125	0,413	0,569	0,336	0,491	0,518	0,37925

## SERUM E

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7	
témoins	Conjugate	0,099	0,469	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,2185	
	Milieu E	0,085	0,103	0,075	0,0855	0,1895	0,1755	0,156	0,1086875	
	Positif	1,2615	0,9225	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,83525	
	condition 1	0,9515	0,292	0,419	0,477	0,422	0,647	0,5915	0,475	
	condition 2	0,521	0,189	0,367	0,415	0,287	0,573	0,5185	0,3588125	
	condition 3	0,8465	0,205	0,3845	0,5315	0,421	0,673	0,5925	0,45675	
	condition 4	0,871	0,1975	0,4475	0,4735	0,4475	0,744	0,6455	0,4783125	
	conc. 7,5%	condition 5	0,914	0,257	0,421	0,473	0,5335	0,7035	0,605	0,488375
		condition 6	0,897	0,1905	0,435	0,4875	0,5255	0,625	0,5655	0,46575
		condition 7	0,8715	0,2205	0,417	0,5715	0,4495	0,668	0,603	0,475125
condition 8		0,9115	0,1725	0,4635	0,576	0,4465	0,853	0,775	0,52475	
condition 9		1,4555	0,289	0,6255	0,7875	0,5745	0,72	0,6115	0,6329375	
condition 10		0,5675	0,101	0,468	0,637	0,3805	0,6325	0,5205	0,413375	
condition 1		0,8465	0,2905	0,43	0,5795	0,5465	0,694	0,657	0,5055	
condition 2		0,4735	0,2185	0,3245	0,47	0,341	0,588	0,539	0,3693125	
condition 3		0,881	0,282	0,3945	0,5305	0,461	0,7085	0,615	0,4840625	
condition 4		0,876	0,2075	0,433	0,4775	0,4565	0,6445	0,5745	0,4586875	
conc. 10%	condition 5	0,92	0,2155	0,409	0,554	0,5115	0,685	0,5935	0,4860625	
	condition 6	0,9245	0,159	0,4715	0,504	0,491	0,4985	0,5935	0,45525	
	condition 7	0,883	0,207	0,4325	0,5205	0,4645	0,7355	0,68	0,490375	
	condition 8	0,8945	0,156	0,467	0,5515	0,4775	0,815	0,7255	0,510875	

	condition 9	1,491	0,302	0,5735	0,825	0,569	0,664	0,586	0,6263125
	condition 10	0,5665	0,163	0,4665	0,546	0,3855	0,5695	0,5315	0,4035625
	condition 1	0,8685	0,2595	0,4885	0,559	0,537	0,632	0,5895	0,49175
	condition 2	0,4475	0,2035	0,37	0,4555	0,383	0,5195	0,4735	0,3565625
	condition 3	0,882	0,278	0,403	0,5515	0,4605	0,53	0,485	0,44875
	condition 4	0,8905	0,208	0,428	0,4815	0,542	0,5125	0,4685	0,441375
	condition 5	0,9235	0,264	0,512	0,521	0,548	0,623	0,552	0,4929375
Concentrat°	condition 6	0,889	0,185	0,511	0,464	0,4895	0,553	0,5075	0,449875
12.5%	condition 7	0,9285	0,2245	0,498	0,475	0,4605	0,7225	0,671	0,4975
	condition 8	0,8915	0,1755	0,515	0,6215	0,512	0,687	0,631	0,5041875
	condition 9	1,4805	0,299	0,539	0,7565	0,5515	0,6585	0,5595	0,6055625
	condition 10	0,5855	0,2	0,4345	0,498	0,3915	0,552	0,5795	0,405125

## SERUM F

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,1065	0,194	0,1855	0,233	0,317	0,2095	0,235	0,1850625
témoins	Milieu F	0,0925	0,1545	0,3135	0,09	0,283	0,157	0,149	0,1549375
	Positif	1,0235	0,8945	1,303	0,8155	0,947	0,752	0,6805	0,802
	condition 1	0,9175	0,5545	0,859	0,7035	0,4705	0,731	0,6535	0,6111875
	condition 2	0,4165	0,377	0,689	0,5355	0,32	0,668	0,582	0,4485
	condition 3	0,923	0,3485	0,6885	0,648	0,4	0,662	0,5585	0,5285625
	condition 4	0,9275	0,5915	0,558	0,661	0,3425	0,696	0,727	0,5629375
conc. 7,5%	condition 5	0,941	0,6	0,5485	0,647	0,412	0,7375	0,6985	0,5730625
	condition 6	0,942	0,584	0,6175	0,5645	0,392	0,683	0,647	0,55375
	condition 7	0,936	0,5315	0,627	0,597	0,3925	0,6605	0,5665	0,538875
	condition 8	0,814	0,646	0,7875	0,6325	0,4455	0,7595	0,6765	0,5951875
	condition 9	1,535	0,62775	0,538	0,7175	0,4935	0,655	0,6505	0,65215625
	condition 10	0,605	0,4865	0,434	0,539	0,345	0,522	0,6895	0,452625
	condition 1	0,875	0,684	0,9195	0,6205	0,403	0,618	0,561	0,585125
	condition 2	0,367	0,4685	0,9245	0,598	0,3005	0,575	0,546	0,4724375
	condition 3	0,8915	0,607	0,7305	0,652	0,313	0,605	0,5785	0,5471875
	condition 4	0,921	0,691	0,6515	0,6015	0,363	0,6995	0,638	0,5706875
conc. 10%	condition 5	0,9625	0,691	0,609	0,5745	0,408	0,763	0,694	0,58775
	condition 6	0,8865	0,662	0,635	0,59	0,419	0,6255	0,6625	0,5600625
	condition 7	0,8535	0,609	0,75	0,6245	0,428	0,6015	0,521	0,5484375
	condition 8	0,8525	0,7575	0,7845	0,669	0,4815	0,691	0,6255	0,6076875
	condition 9	1,531	0,6015	0,5575	0,6455	0,5495	0,8145	0,623	0,6653125
	condition 10	0,611	0,4795	0,457	0,502	0,3815	0,504	0,6305	0,4456875
	condition 1	0,908	0,6265	0,8885	0,591	0,3875	0,716	0,6225	0,5925
	condition 2	0,466	0,491	0,6745	0,5395	0,289	0,663	0,5985	0,4651875
	condition 3	0,902	0,551	0,701	0,607	0,357	0,639	0,651	0,551
	condition 4	0,901	0,7	0,646	0,703	0,37	0,6915	0,603	0,5768125
	condition 5	0,94	0,646	0,7575	0,765	0,419	0,732	0,739	0,6248125
Concentrat°	condition 6	0,9035	0,6105	0,766	0,6505	0,381	0,675	0,6245	0,576375
12.5%	condition 7	0,938	0,562	0,645	0,68	0,3815	0,6245	0,553	0,55425
	condition 8	0,93	0,683	0,7875	0,772	0,445	0,6865	0,622	0,61575
	condition 9	1,531	0,6175	0,592	0,643	0,5865	1,01	0,589	0,696125
	condition 10	0,5285	0,4835	0,48	0,487	0,4165	0,5005	0,535	0,428875

## SERUM G

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne
-----------	--	---	---	---	---	---	---	---	---------

									Am1-7	
témoins	Conjugate	0,1125	0,128	0,1855	0,3155	0,242	0,2095	0,235	0,1785	
	Milieu G	0,1035	0,106	0,186	0,2125	0,1865	0,1735	0,154	0,14025	
	Positif	1,495	0,4845	1,303	0,833	0,8355	0,752	0,6805	0,7979375	
	condition 1	1,348	0,225	0,55515	0,6465	0,5125	0,632	0,4845	0,55045625	
	condition 2	0,9305	0,192	0,5955	0,578	0,369	0,525	0,5385	0,4660625	
	condition 3	1,3405	0,24	0,6055	0,565	0,4525	0,6455	0,59	0,554875	
	condition 4	1,3345	0,3075	0,56	0,6445	0,4685	0,689	0,642	0,58075	
	conc. 7,5%	condition 5	1,3535	0,277	0,546	0,5965	0,4835	0,7685	0,6205	0,5806875
	condition 6	1,301	0,275	0,5415	0,633	0,535	0,6955	0,5825	0,5704375	
	condition 7	1,2965	0,2215	0,5825	0,561	0,4925	0,672	0,599	0,553125	
conc. 10%	condition 8	1,294	0,2795	0,6155	0,644	0,5435	0,664	0,5705	0,576375	
	condition 9	1,52	0,327	0,581	0,6215	0,5435	0,5655	0,6575	0,602	
	condition 10	0,5865	0,231	0,359	0,541	0,437	0,405	0,6205	0,3975	
	condition 1	1,354	0,2185	0,5325	0,582	0,564	0,639	0,51	0,55	
	condition 2	0,6655	0,204	0,511	0,4895	0,44	0,575	0,6135	0,4373125	
	condition 3	1,319	0,2375	0,531	0,541	0,528	0,7075	0,625	0,561125	
	condition 4	1,302	0,278	0,514	0,598	0,5145	0,748	0,666	0,5775625	
	condition 5	1,3065	0,2795	0,576	0,61	0,545	0,809	0,614	0,5925	
	condition 6	1,3025	0,273	0,588	0,634	0,5635	0,6755	0,605	0,5801875	
	condition 7	1,2315	0,216	0,574	0,579	0,533	0,6675	0,5995	0,5500625	
Concentrat° 12.5%	condition 8	1,2555	0,256	0,659	0,5695	0,6025	0,69	0,5665	0,574875	
	condition 9	1,523	0,395	0,5775	0,73	0,5415	0,615	0,67	0,6315	
	condition 10	0,599	0,275	0,4115	0,6805	0,4005	0,4545	0,674	0,436875	
	condition 1	1,3325	0,2235	0,541	0,595	0,538	0,638	0,2615	0,5161875	
	condition 2	0,717	0,209	0,4365	0,49	0,425	0,4965	0,233	0,375875	
	condition 3	1,294	0,271	0,505	0,5635	0,5115	0,7495	0,3855	0,535	
	condition 4	1,3405	0,289	0,481	0,615	0,549	0,685	0,4345	0,54925	
	condition 5	1,3145	0,267	0,5455	0,6335	0,5575	0,7465	0,504	0,5710625	
	condition 6	1,3145	0,2705	0,5915	0,595	0,572	0,681	0,44	0,5580625	
	condition 7	1,342	0,242	0,512	0,6255	0,6595	0,7265	0,494	0,5751875	
condition 8	1,344	0,258	0,602	0,6105	0,6115	0,701	0,476	0,575375		
condition 9	1,553	0,355	0,538	0,772	0,522	0,6575	0,627	0,6280625		
condition 10	0,5995	0,198	0,4355	0,7085	0,3685	0,466	0,7045	0,4350625		

## SERUM H

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7	
témoins	Conjugate	0,1125	0,128	0,1855	0,3155	0,242	0,2095	0,235	0,1785	
	Milieu H	0,09	0,099	0,154	0,197	0,18	0,148	0,1525	0,1275625	
	Positif	1,495	0,4845	1,303	0,833	0,8355	0,752	0,6805	0,7979375	
	condition 1	1,4285	0,318	0,565	0,66	0,5495	0,616	0,3575	0,5618125	
	condition 2	0,6705	0,196	0,488	0,58	0,3965	0,5195	0,3545	0,400625	
	condition 3	1,325	0,2515	0,497	0,613	0,5215	0,707	0,5425	0,5571875	
	condition 4	1,2465	0,3145	0,449	0,611	0,476	0,637	0,502	0,5295	
	conc. 7,5%	condition 5	1,5025	0,3105	0,492	0,6095	0,53	0,687	0,5485	0,585
	condition 6	1,232	0,2965	0,5285	0,549	0,5875	0,673	0,5335	0,55	
	condition 7	1,268	0,2475	0,5025	0,5705	0,541	0,6755	0,466	0,533875	
condition 8	1,274	0,337	0,5705	0,5595	0,557	0,6875	0,465	0,5563125		
condition 9	1,472	0,452	0,476	0,672	0,5465	0,7465	0,641	0,62575		
condition 10	0,6155	0,263	0,37	0,4655	0,383	0,507	0,43	0,37925		

	condition 1	1,391	0,264	0,5745	0,6395	0,5895	0,6445	0,521	0,578
	condition 2	0,663	0,212	0,5545	0,5885	0,425	0,595	0,449	0,435875
	condition 3	1,2905	0,253	0,5685	0,6155	0,497	0,764	0,616	0,5755625
	condition 4	1,253	0,269	0,544	0,636	0,5405	0,6375	0,498	0,54725
conc. 10%	condition 5	1,3185	0,307	0,647	0,6505	0,611	0,652	0,517	0,587875
	condition 6	1,284	0,279	0,614	0,572	0,585	0,6575	0,5095	0,562625
	condition 7	1,2995	0,2555	0,6305	0,581	0,545	0,683	0,4845	0,559875
	condition 8	1,287	0,3055	0,6395	0,588	0,5725	0,678	0,311	0,5476875
	condition 9	1,5035	0,402	0,4795	0,6545	0,5345	0,754	0,6515	0,6224375
	condition 10	0,563	0,299	0,3585	0,5255	0,409	0,474	0,424	0,381625
	condition 1	1,391	0,3355	0,777	0,9605	0,777	0,6745	0,575	0,6863125
	condition 2	0,6895	0,2655	0,8035	0,5605	0,8035	0,664	0,519	0,5381875
	condition 3	1,331	0,3125	0,8235	0,627	0,8235	0,8255	0,743	0,68575
	condition 4	1,3105	0,368	0,636	0,5545	0,636	0,6975	0,5115	0,58925
	condition 5	1,375	0,3225	0,677	0,587	0,677	0,747	0,5965	0,62275
Concentrat°	condition 6	1,3565	0,3295	0,7155	0,6705	0,7155	0,745	0,3235	0,607
12.5%	condition 7	1,403	0,272	0,7715	0,769	0,7715	0,727	0,2505	0,6205625
	condition 8	1,43	0,3725	0,952	0,733	0,952	0,714	0,178	0,6664375
	condition 9	1,5655	0,395	0,4745	0,642	0,517	0,7005	0,5875	0,61025
	condition 10	0,55	0,263	0,342	0,5615	0,4335	0,4715	0,426	0,3809375

## SERUM I

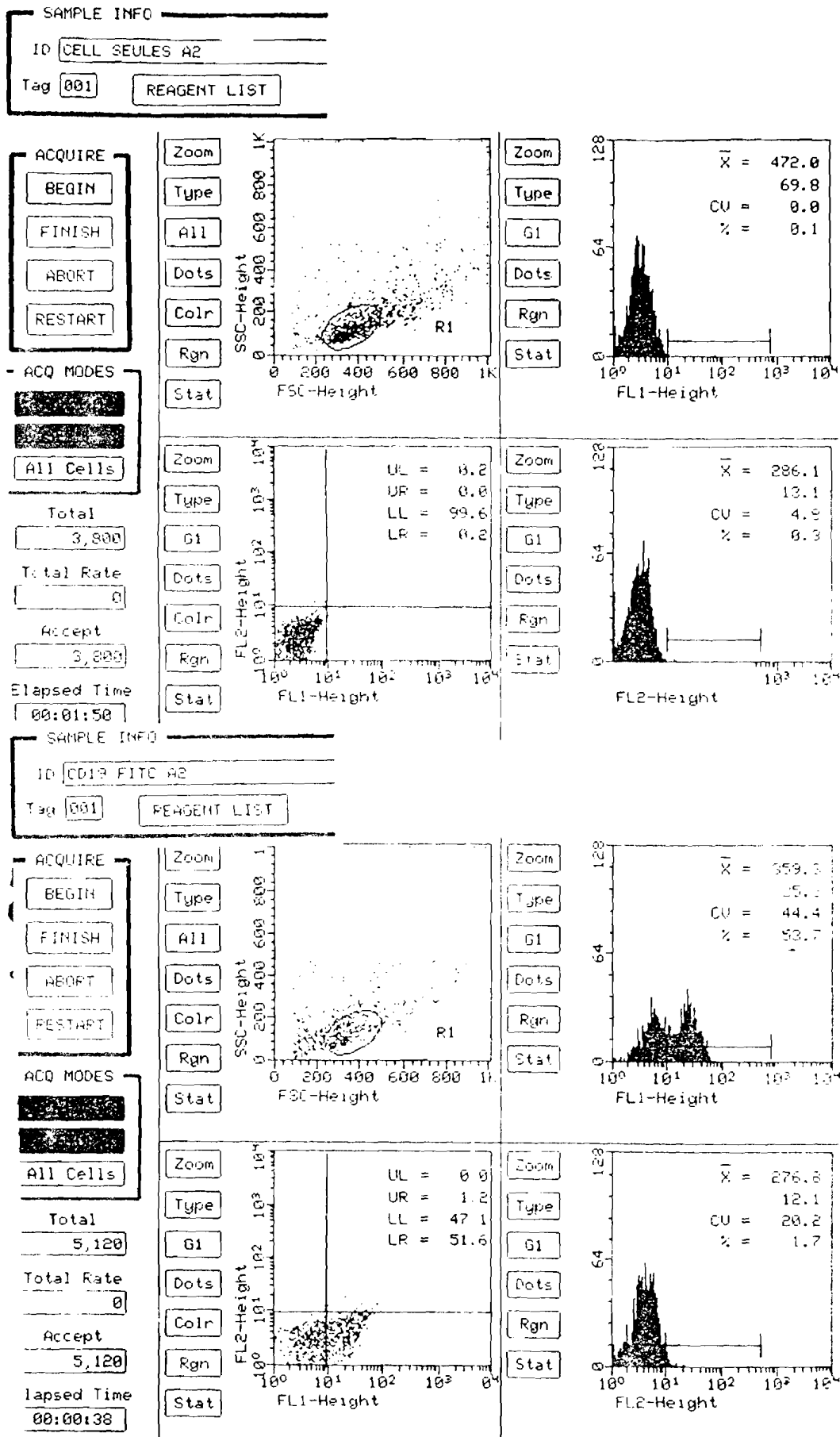
AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,1175	0,128	0,1855	0,3155	0,242	0,2095	0,235	0,179125
témoins	Milieu I	0,099	0,1285	0,556	0,238	0,156	0,158	0,1345	0,18375
	Positif	1,637	0,4845	1,303	0,833	0,8355	0,752	0,6805	0,8156875
	condition 1	1,2935	0,293	0,8005	0,797	0,8005	0,6885	0,611	0,6605
	condition 2	0,596	0,2645	0,63	0,4755	0,63	0,6345	0,492	0,4653125
	condition 3	1,2635	0,2645	0,855	0,66	0,855	0,779	0,6295	0,6633125
	condition 4	1,3005	0,3065	0,742	0,6565	0,742	0,7245	0,382	0,60675
conc. 7,5%	condition 5	1,455	0,329	0,72	0,8005	0,72	0,7195	0,294	0,62975
	condition 6	1,3075	0,342	0,832	0,689	0,832	0,739	0,215	0,6195625
	condition 7	1,4	0,2535	0,745	0,642	0,745	0,71	0,214	0,5886875
	condition 8	1,3565	0,3945	0,552	0,6275	0,552	0,6775	0,1265	0,5358125
	condition 9	1,514	0,41	0,528	0,766	0,543	0,7095	0,6525	0,640375
	condition 10	0,537	0,255	0,333	0,6305	0,4225	0,6465	0,576	0,4250625
	condition 1	1,3825	0,2805	0,8115	0,7045	0,8115	0,7005	0,635	0,66575
	condition 2	0,634	0,217	0,7225	0,596	0,7225	0,5385	0,483	0,4891875
	condition 3	1,355	0,2395	0,8425	0,5995	0,8425	0,7365	0,6045	0,6525
	condition 4	1,3745	0,255	0,735	0,6695	0,735	0,6925	0,5415	0,625375
conc. 10%	condition 5	1,3815	0,277	0,765	0,7095	0,765	0,7305	0,612	0,6550625
	condition 6	1,319	0,326	0,7845	0,7095	0,7845	0,7385	0,621	0,660375
	condition 7	1,3425	0,2405	0,957	0,6315	0,957	0,808	0,6875	0,703
	condition 8	1,338	0,317	1,1075	0,617	1,1075	0,799	0,705	0,748875
	condition 9	1,5135	0,387	0,427	0,715	0,522	0,718	0,635	0,6146875
	condition 10	0,5545	0,165	0,317	0,6075	0,4315	0,6265	0,541	0,405375
	condition 1	1,3175	0,3075	0,722	0,6965	0,722	0,6945	0,601	0,632625
	condition 2	0,6195	0,2655	0,574	0,5335	0,574	0,5995	0,5135	0,4599375

	condition 3	1,379	0,286	0,6745	0,6275	0,6745	0,68	0,557	0,6098125
	condition 4	1,383	0,336	0,6445	0,6815	0,6445	0,676	0,5765	0,61775
	condition 5	1,398	0,293	0,6875	0,6485	0,6875	0,5875	0,4905	0,5990625
Concentrat°	condition 6	1,3665	0,334	0,7825	0,6575	0,7825	0,667	0,568	0,64475
12.5%	condition 7	1,378	0,2625	0,8735	0,6265	0,8735	0,771	0,6735	0,6823125
	condition 8	1,399	0,339	0,9335	0,802	0,9335	0,74	0,647	0,72425
	condition 9	1,5175	0,403	0,317	0,715	0,5955	0,699	0,6045	0,6064375
	condition 10	0,579	0,23	0,3175	0,5365	0,4335	0,5695	0,4915	0,3946875

## SERUM T

AMYGDALES		1	2	3	4	5	6	7	moyenne Am1-7
	Conjugate	0,1175	0,128	0,1855	0,3155	0,242	0,2095	0,235	0,179125
témoins	Milieu T	0,117	0,141	0,172	0,148	0,167	0,1305	0,1265	0,12525
	Positif	1,637	0,4845	1,303	0,833	0,8355	0,752	0,6805	0,8156875
	condition 1	1,488	0,298	0,7525	0,8715	0,7525	0,6245	0,544	0,666375
	condition 2	0,6545	0,2355	0,6385	0,591	0,6385	0,4995	0,431	0,4610625
	condition 3	1,424	0,235	0,7425	0,7005	0,7425	0,658	0,544	0,6308125
	condition 4	1,4395	0,3015	0,7595	0,697	0,7595	0,6425	0,557	0,6445625
conc. 7,5%	condition 5	1,4585	0,3415	0,7625	0,7875	0,7625	0,6525	0,5495	0,6643125
	condition 6	1,456	0,3335	0,78175	0,7425	0,78175	0,628	0,518	0,6551875
	condition 7	1,448	0,2595	0,9865	0,88	0,9865	0,6935	0,61	0,733
	condition 8	1,436	0,3895	0,9465	0,729	0,9465	0,764	0,6945	0,73825
	condition 9	1,526	0,419	0,37	0,6435	0,5615	0,691	0,6285	0,6049375
	condition 10	0,5985	0,287	0,368	0,493	0,4085	0,55	0,5015	0,4008125
	condition 1	1,2735	0,2165	0,612	0,9595	0,509	0,677	0,6115	0,607375
	condition 2	0,5815	0,186	0,4175	0,5735	0,3825	0,6155	0,5205	0,409625
	condition 3	1,399	0,2235	0,508	0,6095	0,445	0,664	0,5595	0,5510625
	condition 4	1,356	0,2825	0,485	0,6645	0,4255	0,703	0,5795	0,562
conc. 10%	condition 5	1,455	0,2695	0,4985	0,646	0,4935	0,7355	0,6265	0,5905625
	condition 6	1,3705	0,276	0,491	0,618	0,4985	0,7075	0,5845	0,56825
	condition 7	1,3295	0,231	0,4995	0,6025	0,4965	0,749	0,6505	0,5698125
	condition 8	1,426	0,2585	0,5545	0,621	0,52	0,771	0,6895	0,6050625
	condition 9	1,539	0,398	0,4425	0,5765	0,537	0,65	0,5825	0,5906875
	condition 10	0,67	2,567	0,359	0,575	0,4665	0,537	0,472	0,7058125
	condition 1	1,396	0,2315	0,54	1,088	0,5695	0,663	0,589	0,634625
	condition 2	0,579	0,1985	0,447	0,561	0,3905	0,641	0,535	0,419
	condition 3	1,4045	0,2505	0,533	0,5255	0,4905	0,695	0,5835	0,5603125
	condition 4	1,37	0,2935	0,541	0,576	0,4665	0,7435	0,6305	0,577625
	condition 5	1,4385	0,273	0,512	0,6085	0,539	0,768	0,6575	0,5995625
Concentrat°	condition 6	698,67	0,252	0,4705	0,5705	0,503	0,7295	0,6205	87,727
12.5%	condition 7	1,32	0,2045	0,5345	0,598	0,5275	0,721	0,627	0,5665625
	condition 8	1,295	0,261	0,5745	0,6255	0,551	0,7705	0,7045	0,59775
	condition 9	1,386	0,299	0,518	0,574	0,568	0,6775	0,59	0,5765625
	condition 10	0,7645	0,184	0,37	0,5695	0,4955	0,566	0,4765	0,42825

**Figure 1** : Résultats de la caractérisation des populations cellulaires étudiés par cytométrie de flux.





**SAMPLE INFO**

ID

Tag

**ACQUIRE**

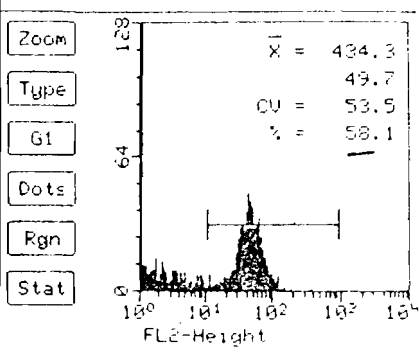
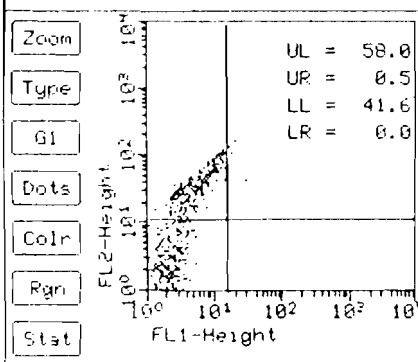
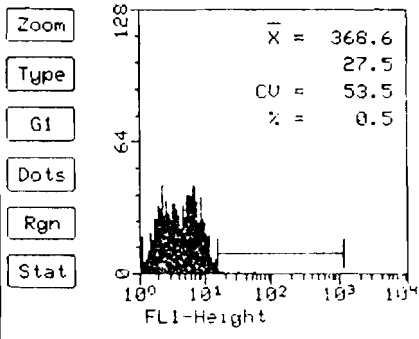
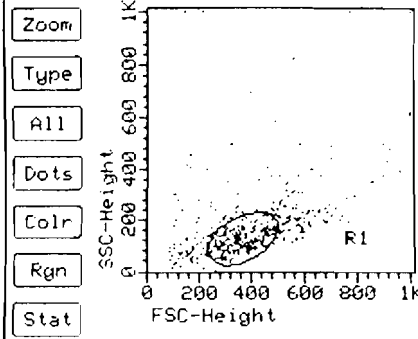
**ACQ MODES**

Total

Total Rate

Accept

Elapsed Time



**SAMPLE INFO**

ID

Tag

**ACQUIRE**

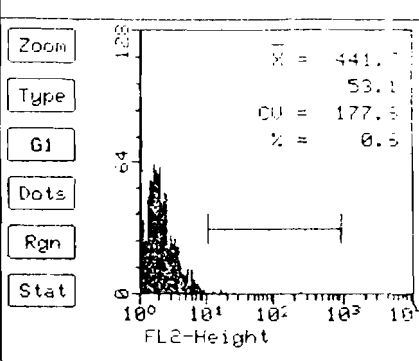
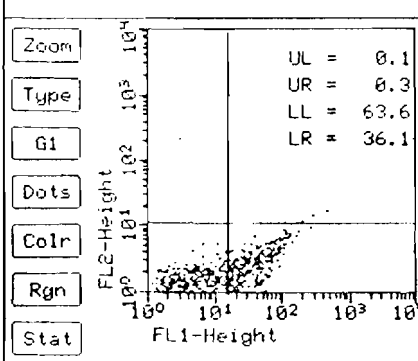
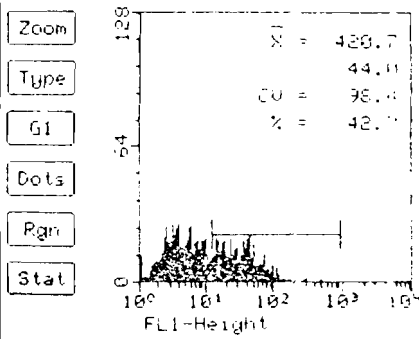
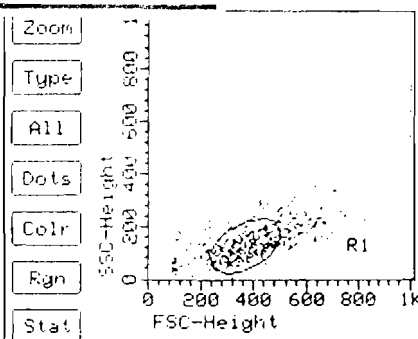
**ACQ MODES**

Total

Total Rate

Accept

Elapsed Time



SAMPLE INFO

ID IgGM FITC A2

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

NEOFT

RESTART

ACQ MODES

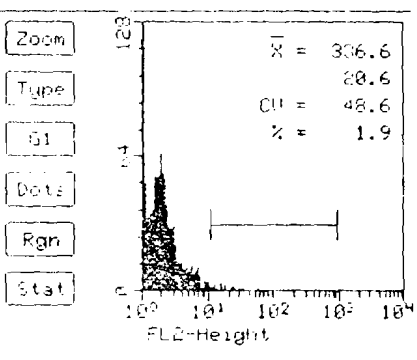
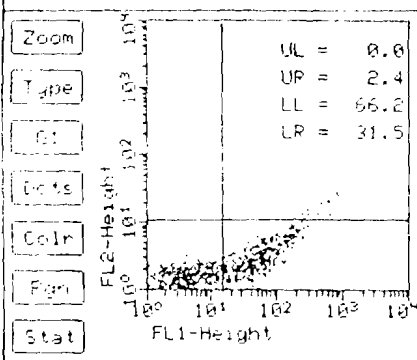
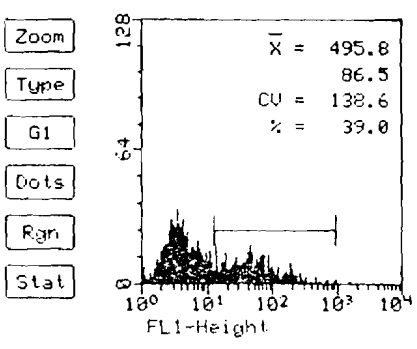
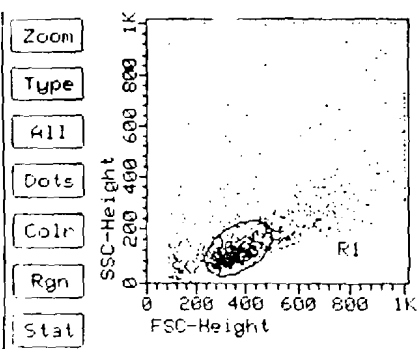
All Cells

Total 7,300

Total Rate 0

Accept 7,300

Elapsed Time 00:01:16



SAMPLE INFO

ID CD3 PE A2

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

NEOFT

RESTART

ACQ MODES

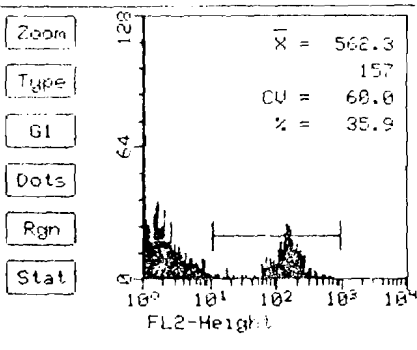
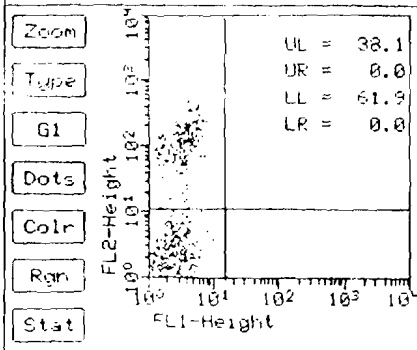
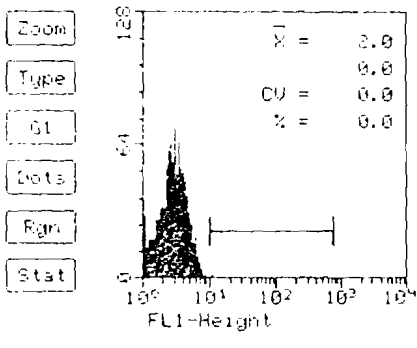
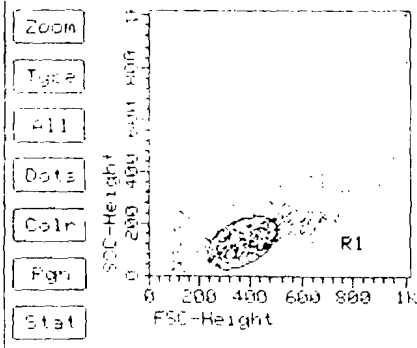
All Cells

Total 6,400

Total Rate 0

Accept 6,400

Elapsed Time 00:01:31

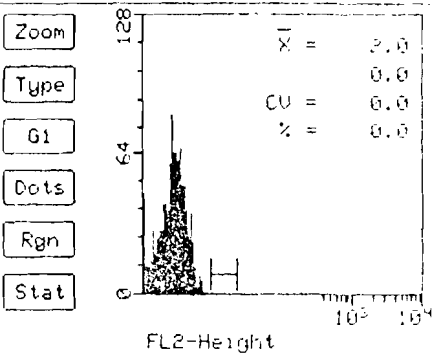
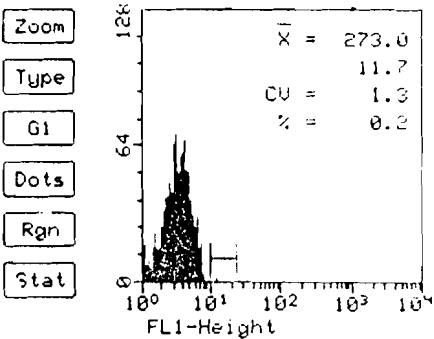
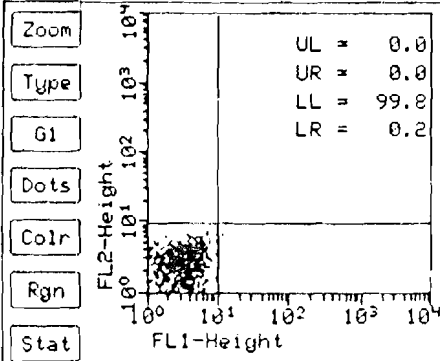
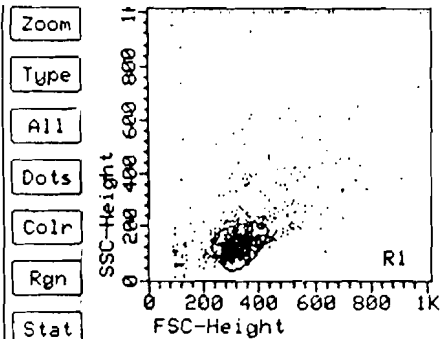


SAMPLE INFO  
 ID CELLULES SEULES A3  
 Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE  
 BEGIN  
 FINISH  
 ABORT  
 RESTART

ACQ MODES  
 All Cells

Total 9,840  
 Total Rate 0  
 Accept 9,840  
 Elapsed Time 00:01:37

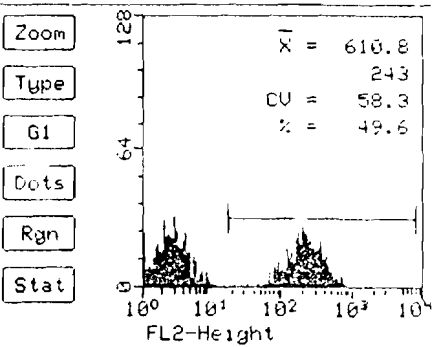
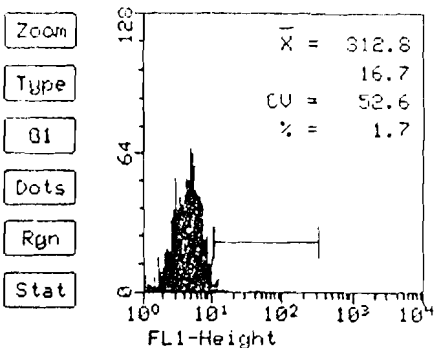
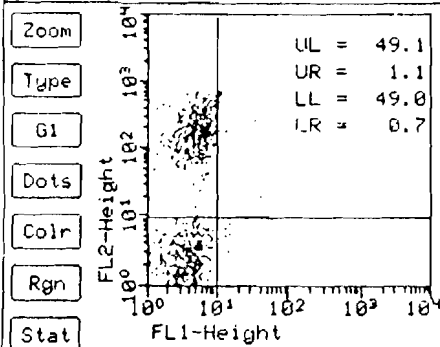
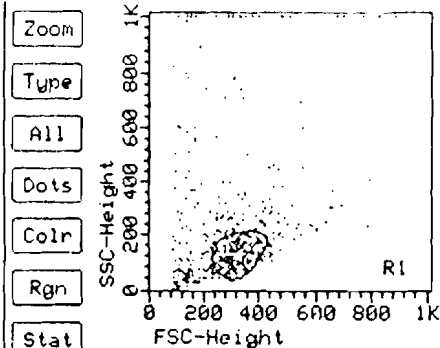


SAMPLE INFO  
 ID CD3 PE A3  
 Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE  
 BEGIN  
 FINISH  
 ABORT  
 RESTART

ACQ MODES  
 All Cells

Total 2,180  
 Total Rate 0  
 Accept 2,180  
 Elapsed Time 00:00:38



SAMPLE INFO

ID CD19 FITC A3

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

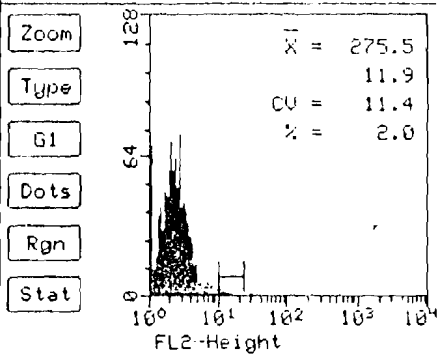
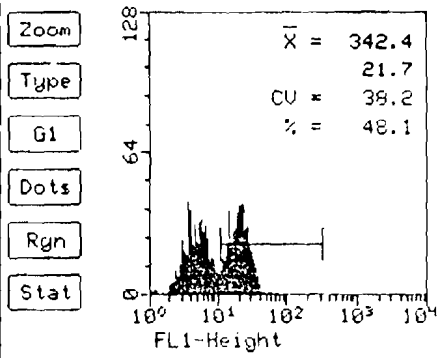
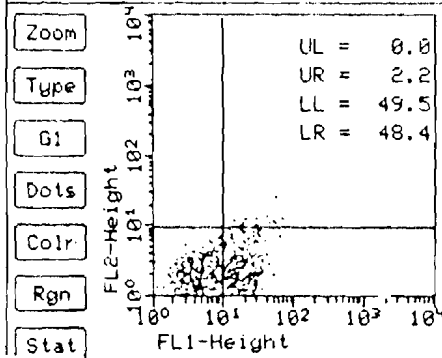
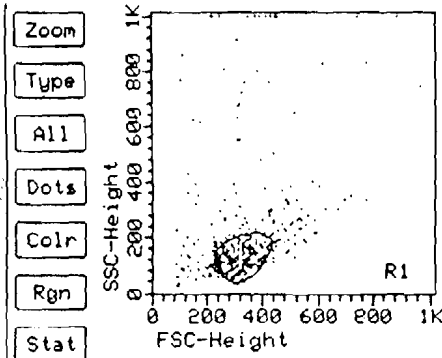
All Cells

Total 6,200

Total Rate 40

Accept 6,200

Elapsed Time



SAMPLE INFO

ID CD48 PE A3

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

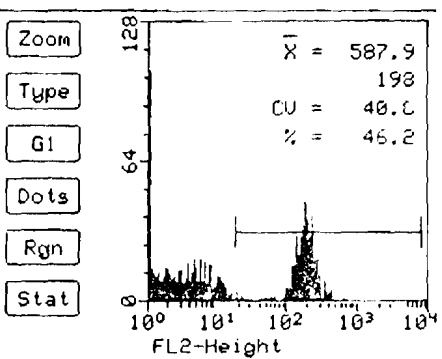
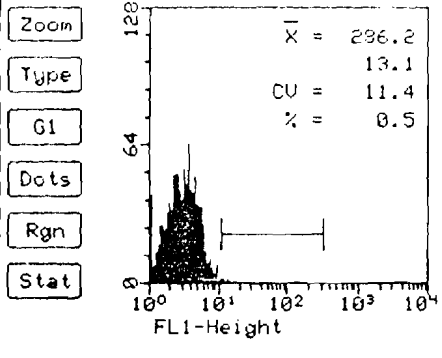
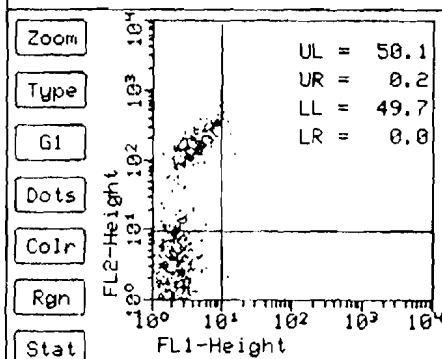
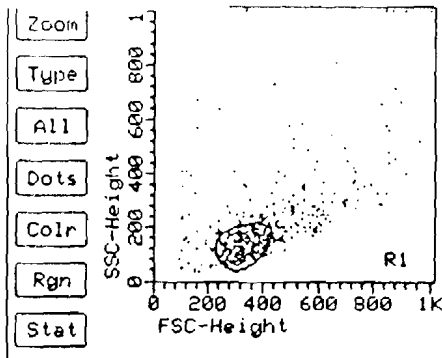
All Cells

Total 5,480

Total Rate 0

Accept 5,480

Elapsed Time 00:00:27



SAMPLE INFO

ID IgM FITC A3

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

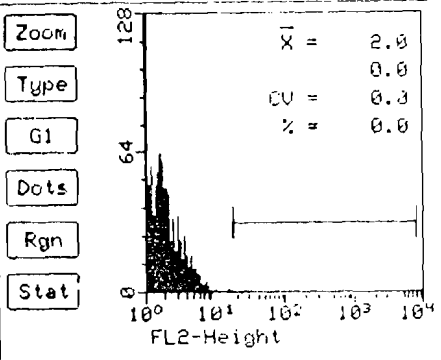
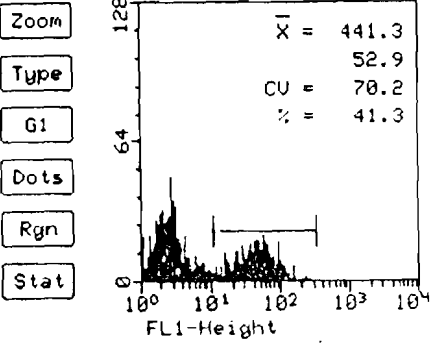
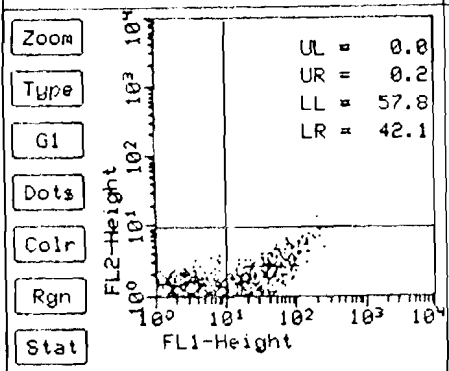
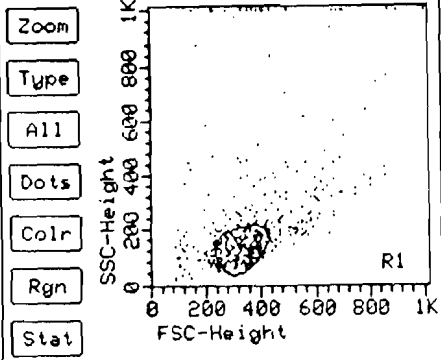
All Cells

Total 7,200

Total Rate 0

Accept 7,200

Elapsed Time 00:00:21



SAMPLE INFO

ID IgG FITC A3

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

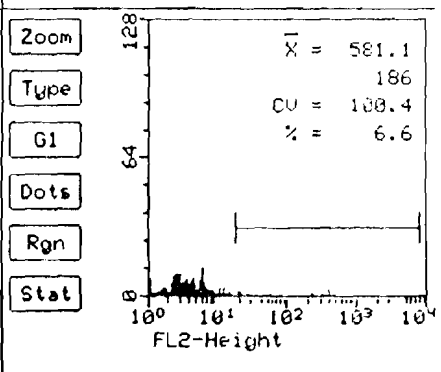
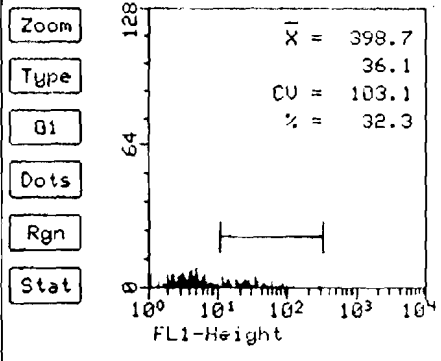
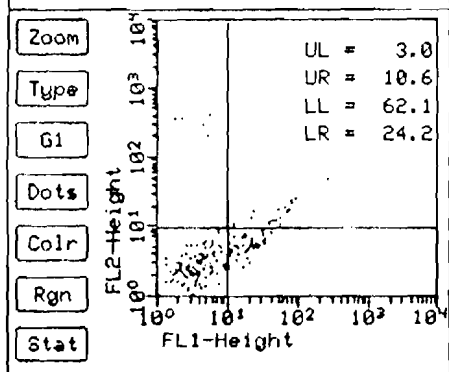
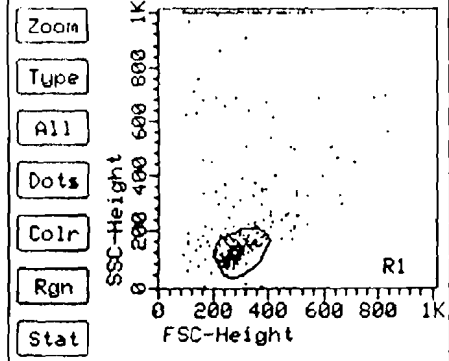
All Cells

Total 1,200

Total Rate 0

Accept 1,200

Elapsed Time 00:01:42



SAMPLE INFO

ID CELLULES SEULES A5

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

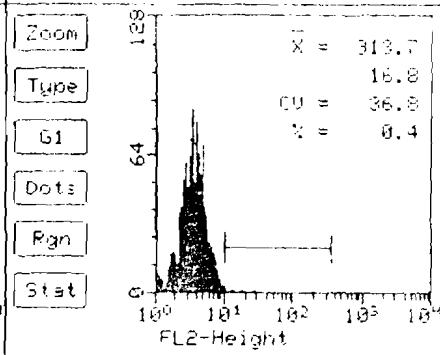
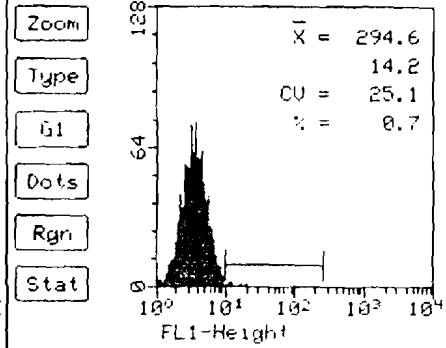
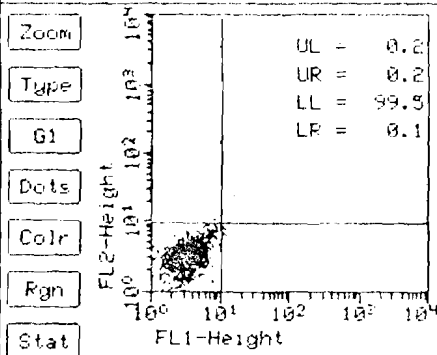
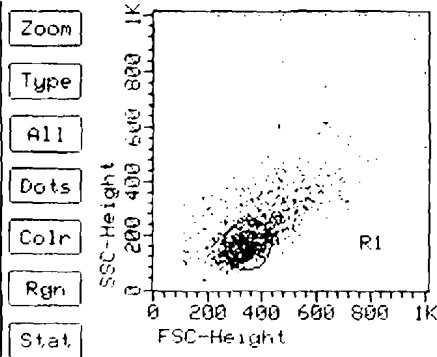
All Cells

Total 39,820

Total Rate 0

Accept 39,820

Elapsed Time 00:04:13



SAMPLE INFO

ID DC19 FITC A5

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

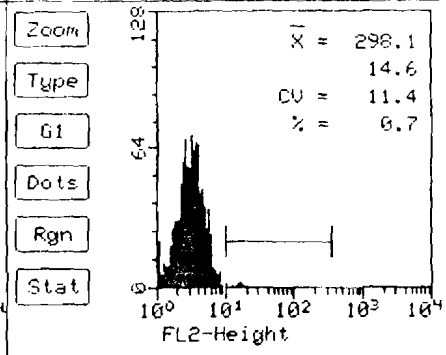
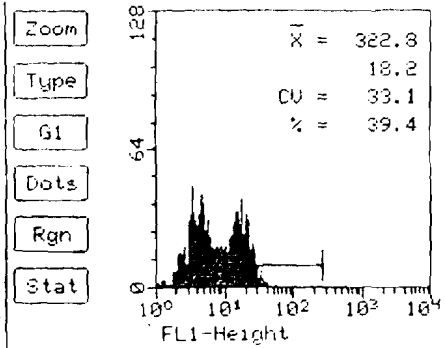
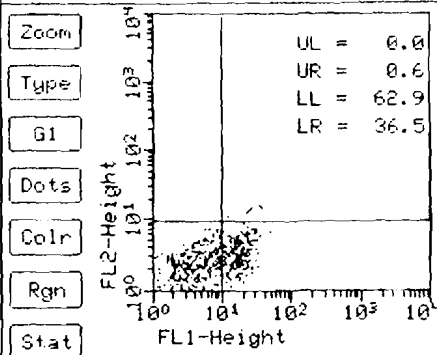
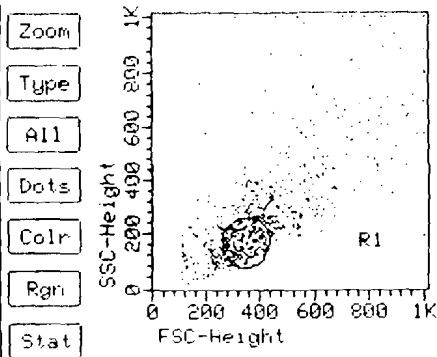
All Cells

Total 6,554

Total Rate 0

Accept 6,554

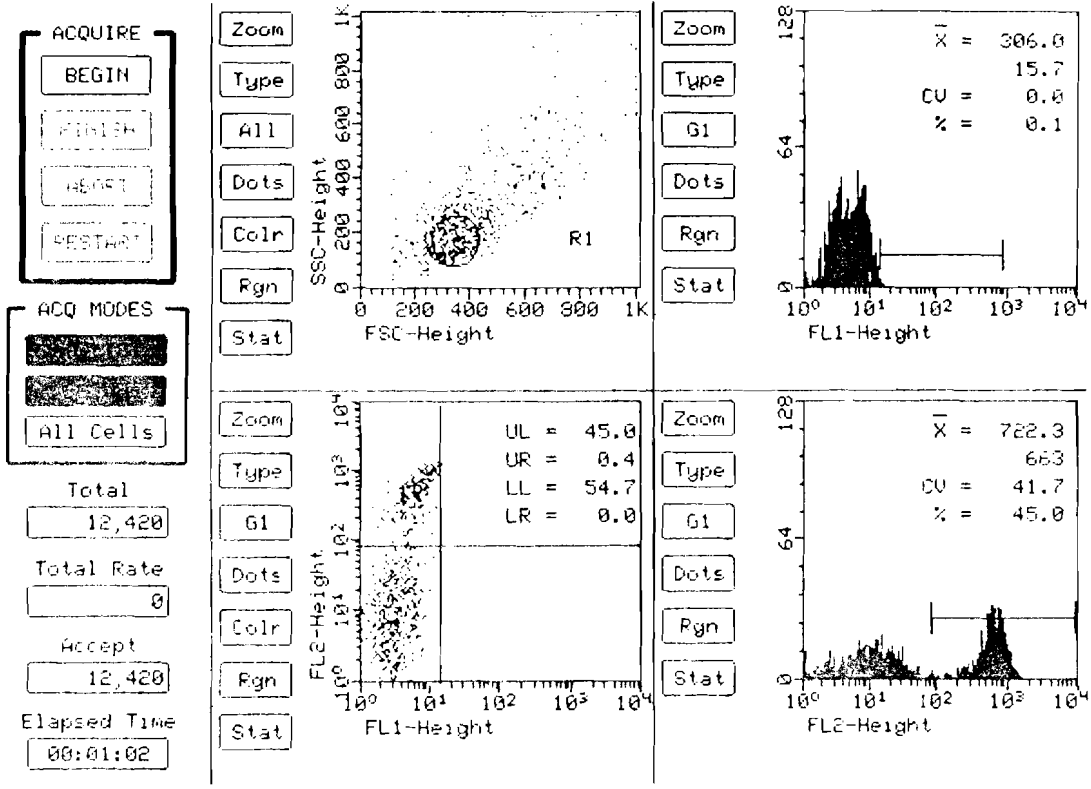
Elapsed Time 00:00:55



SAMPLE INFO

ID CD40 PE A5

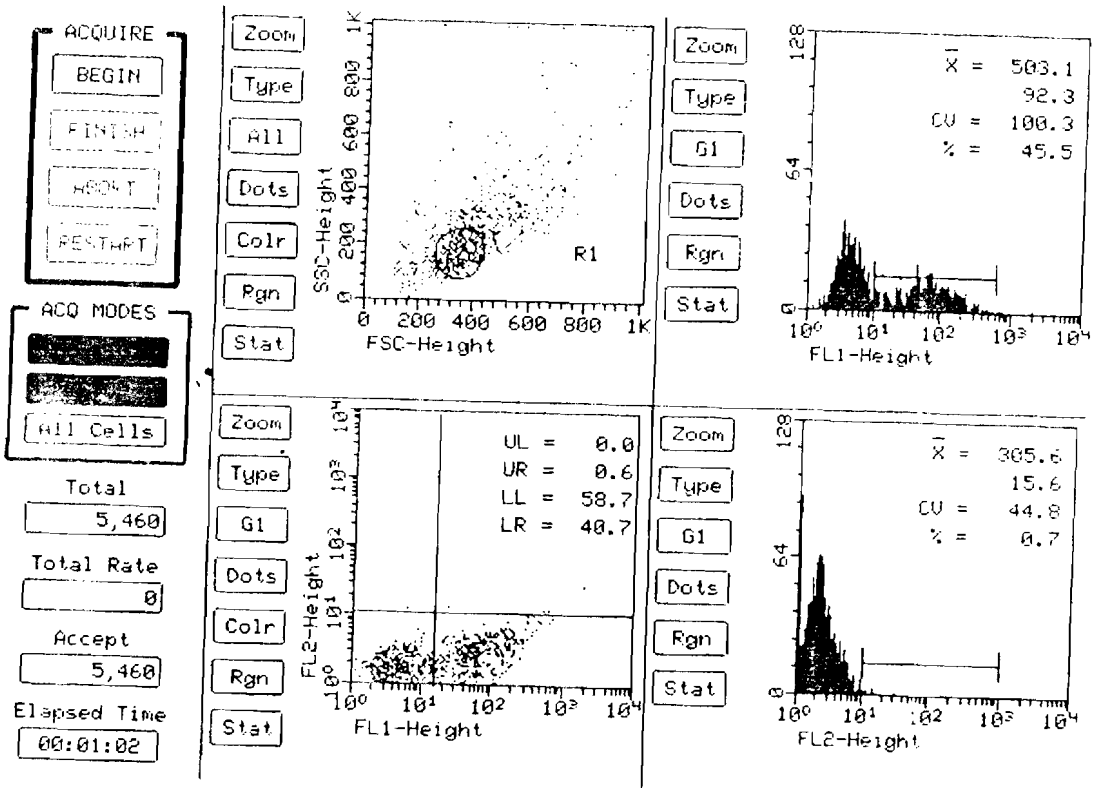
Tag 001 REAGENT LIST



SAMPLE INFO

ID IgG TITC A5

Tag 001 REAGENT LIST



SAMPLE INFO

ID IgM FITC A5

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

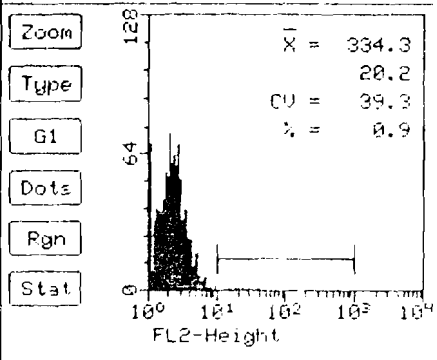
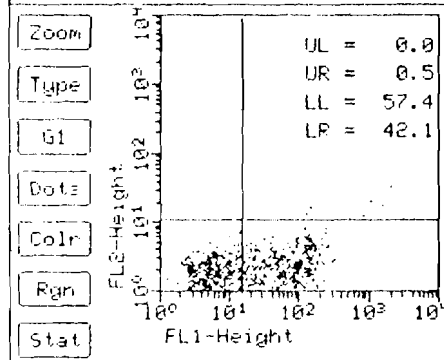
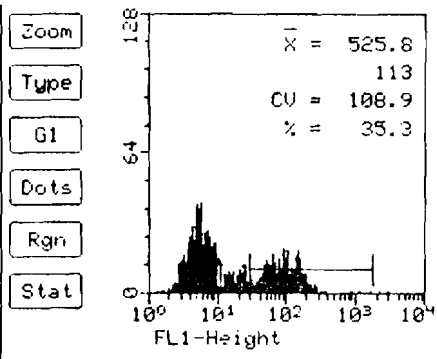
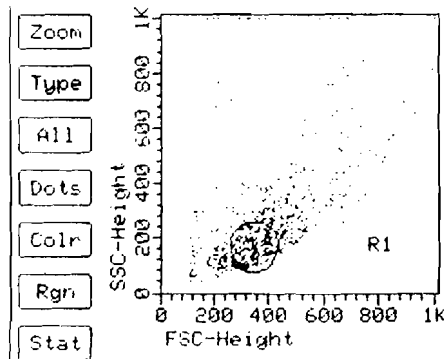
All Cells

Total  
5,000

Total Rate  
0

Accept  
5,000

Elapsed Time  
00:01:39



SAMPLE INFO

ID 003 A5

Tag 001 REAGENT LIST

ACQUIRE

BEGIN

FINISH

ABORT

RESTART

ACQ MODES

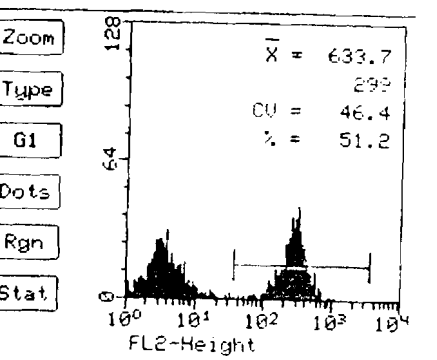
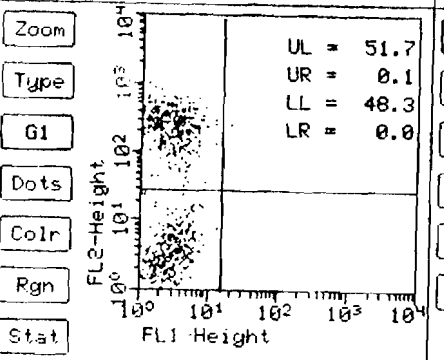
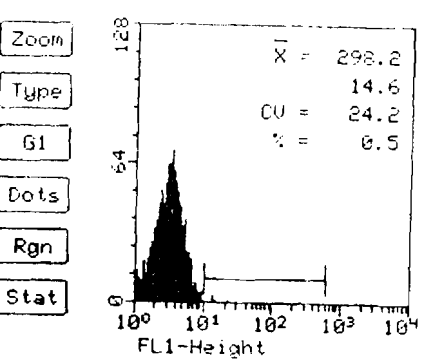
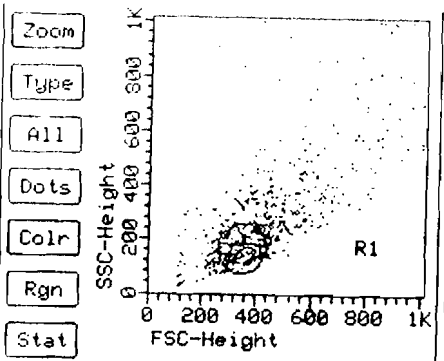
All Cells

Total  
12,640

Total Rate  
0

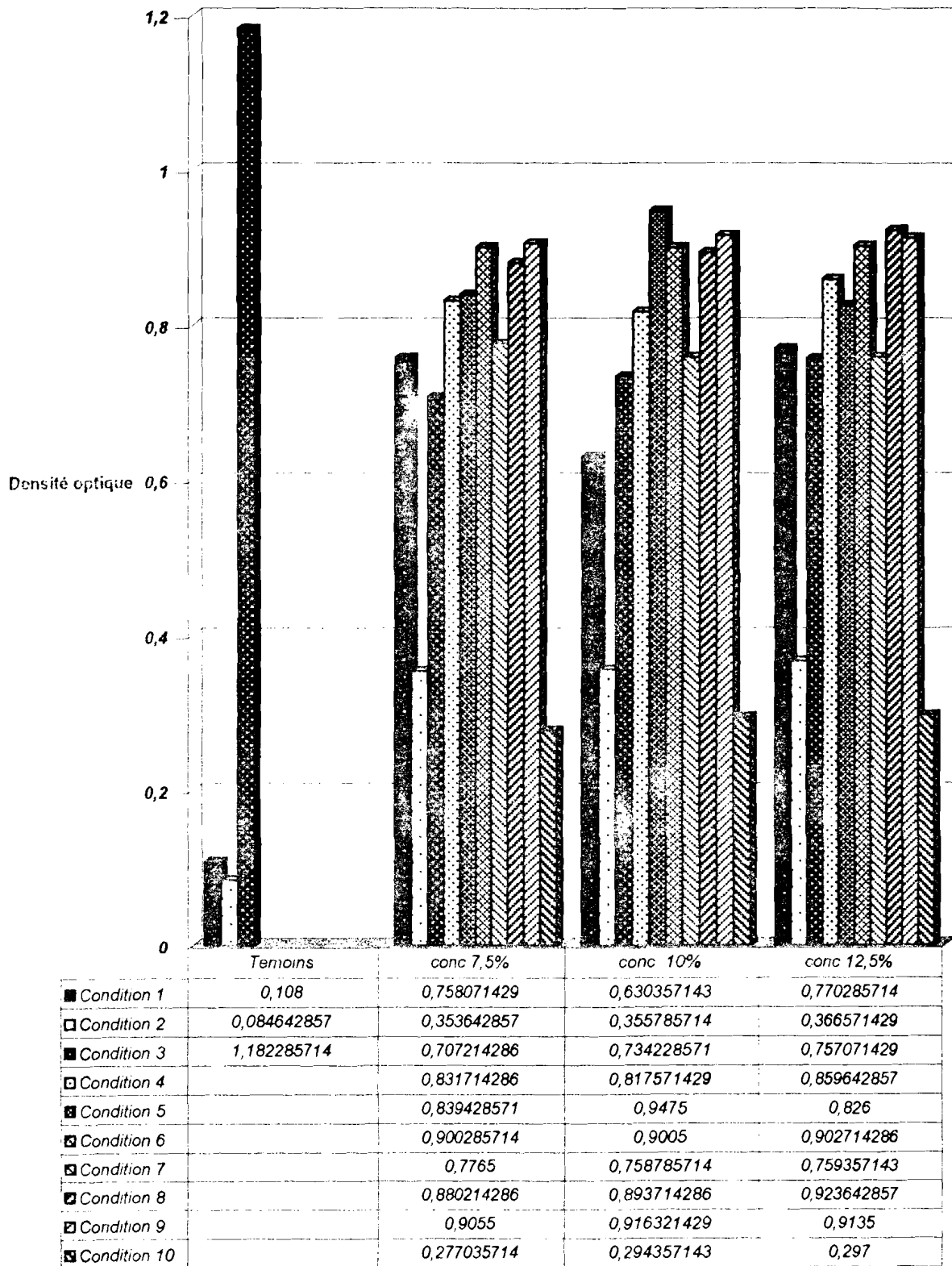
Accept  
12,640

Elapsed Time  
00:00:56



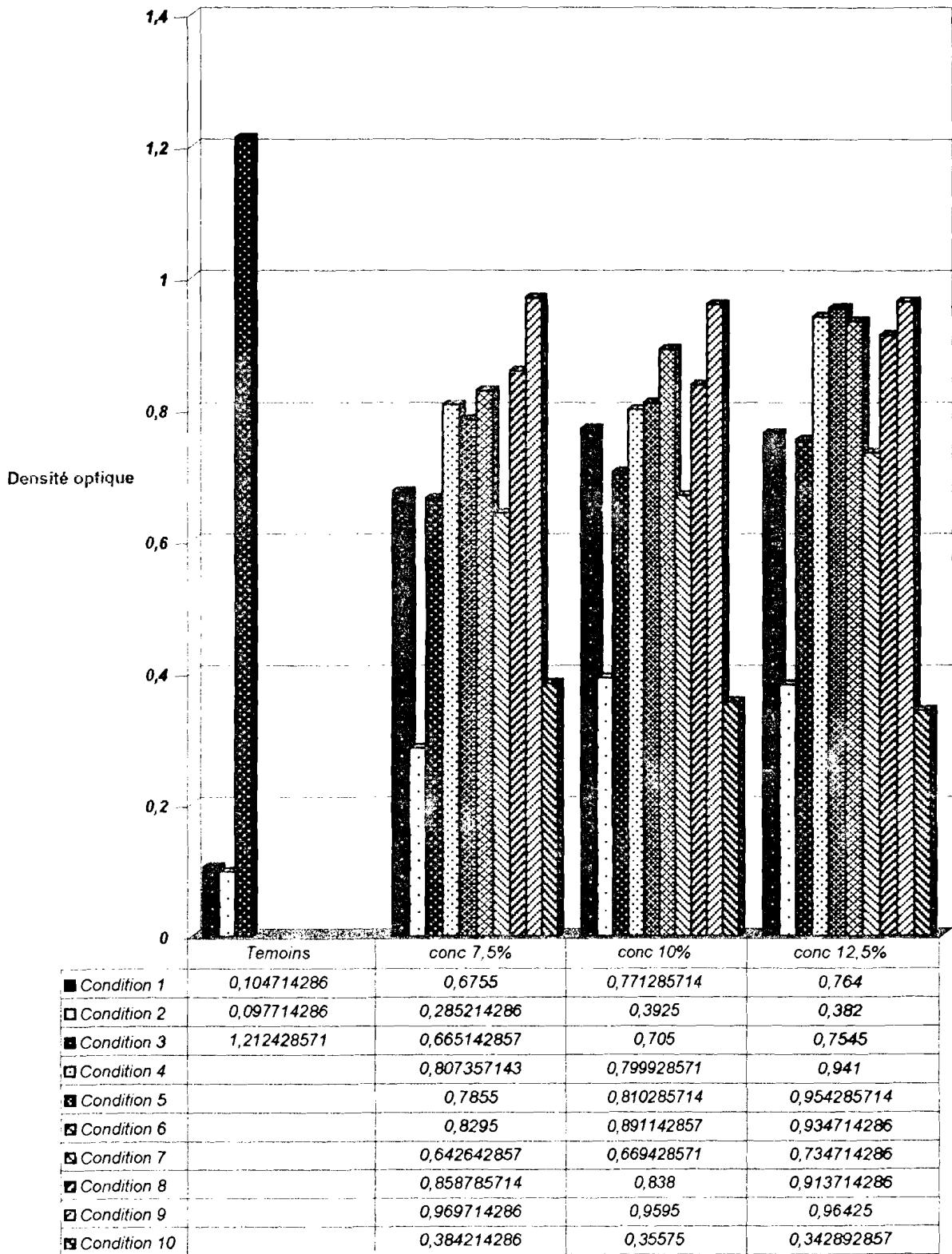


SERUM A - IgM

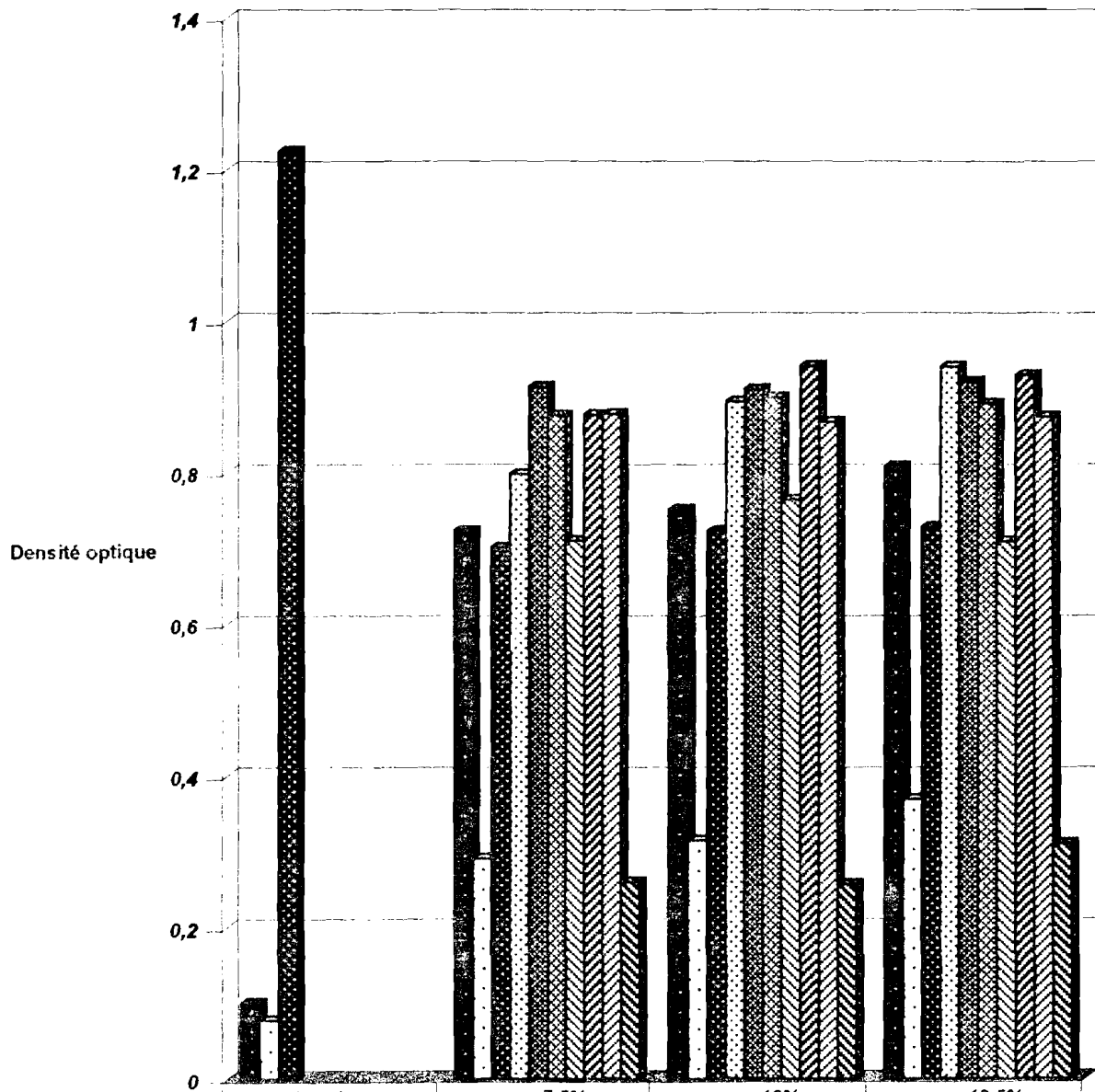


**Figure 2a** : Influence des différentes conditions de culture sur la production d'immunoglobulines de type IgM.

### SERUM B - IgM

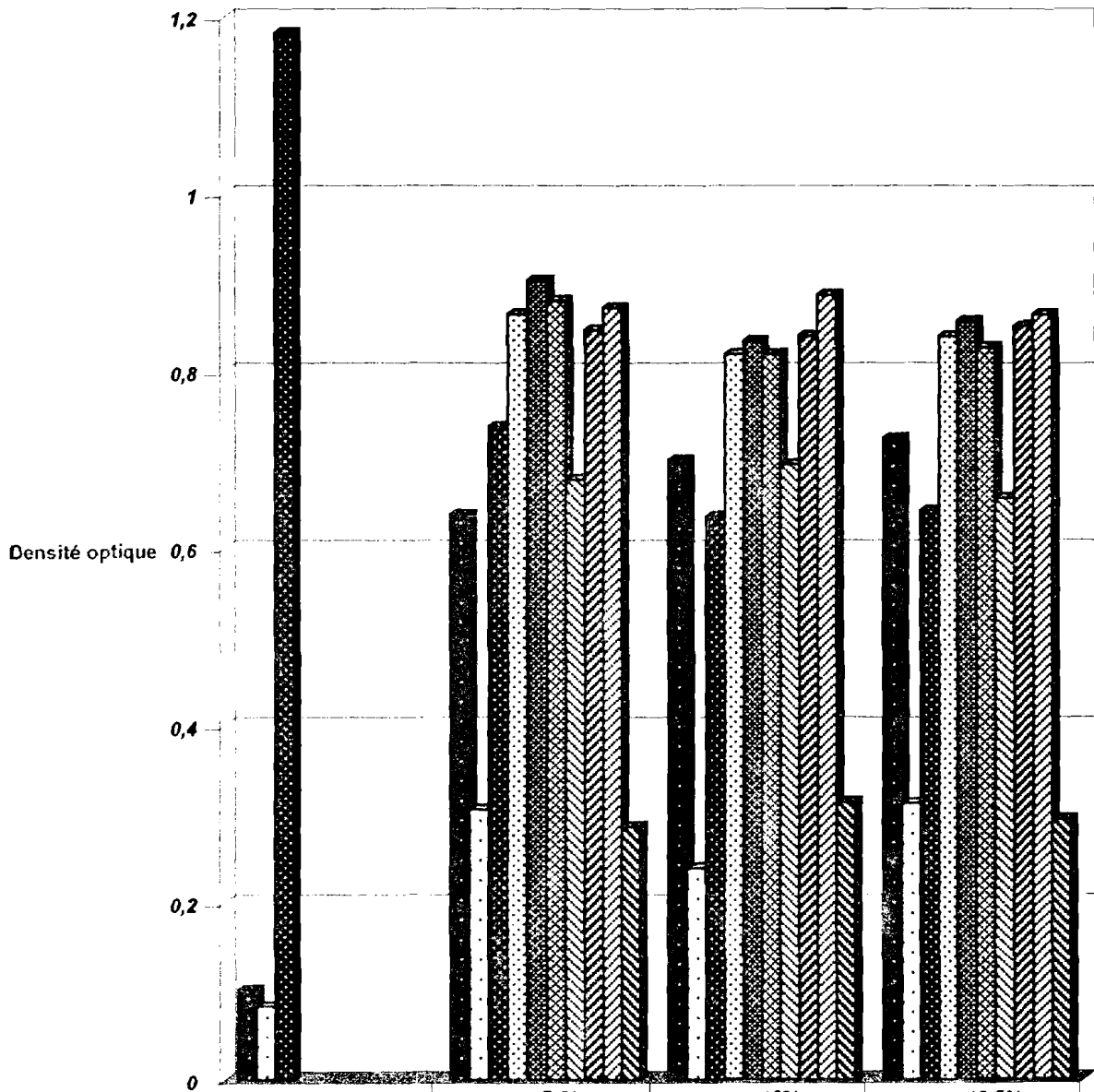


### SERUM C -IgM



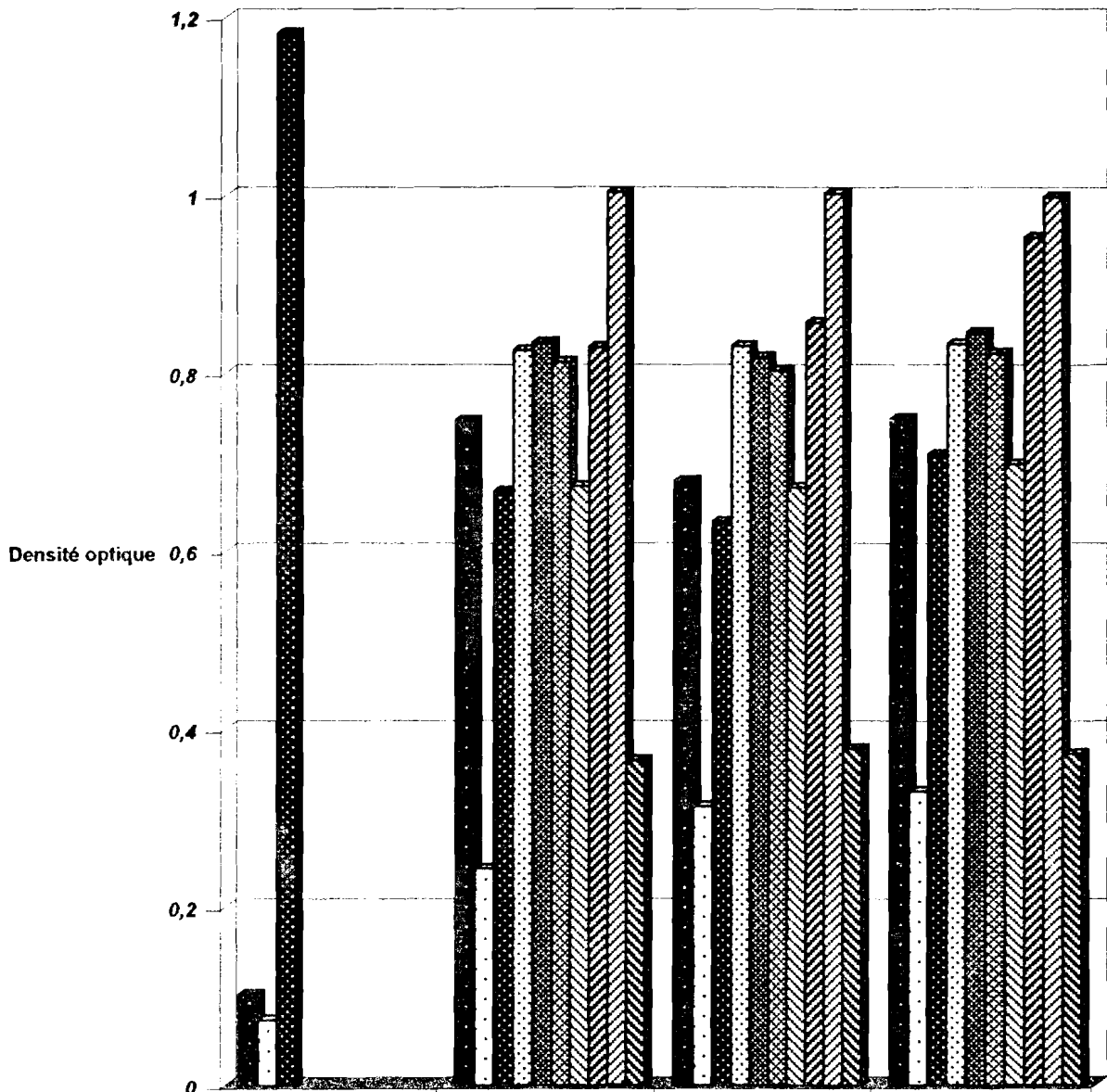
	temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,100142857	0,723142857	0,751714286	0,8085
□ Condition 2	0,077428571	0,290571429	0,315071429	0,368785714
■ Condition 3	1,223357143	0,701285714	0,722714286	0,729
□ Condition 4		0,798285714	0,893857143	0,939785714
■ Condition 5		0,913214286	0,910214286	0,920428571
□ Condition 6		0,875428571	0,899	0,891642857
■ Condition 7		0,7105	0,764142857	0,709571429
□ Condition 8		0,876285714	0,941	0,928857143
■ Condition 9		0,877321429	0,867285714	0,873571429
□ Condition 10		0,259321429	0,256785714	0,310285714

### SERUM D - IgM



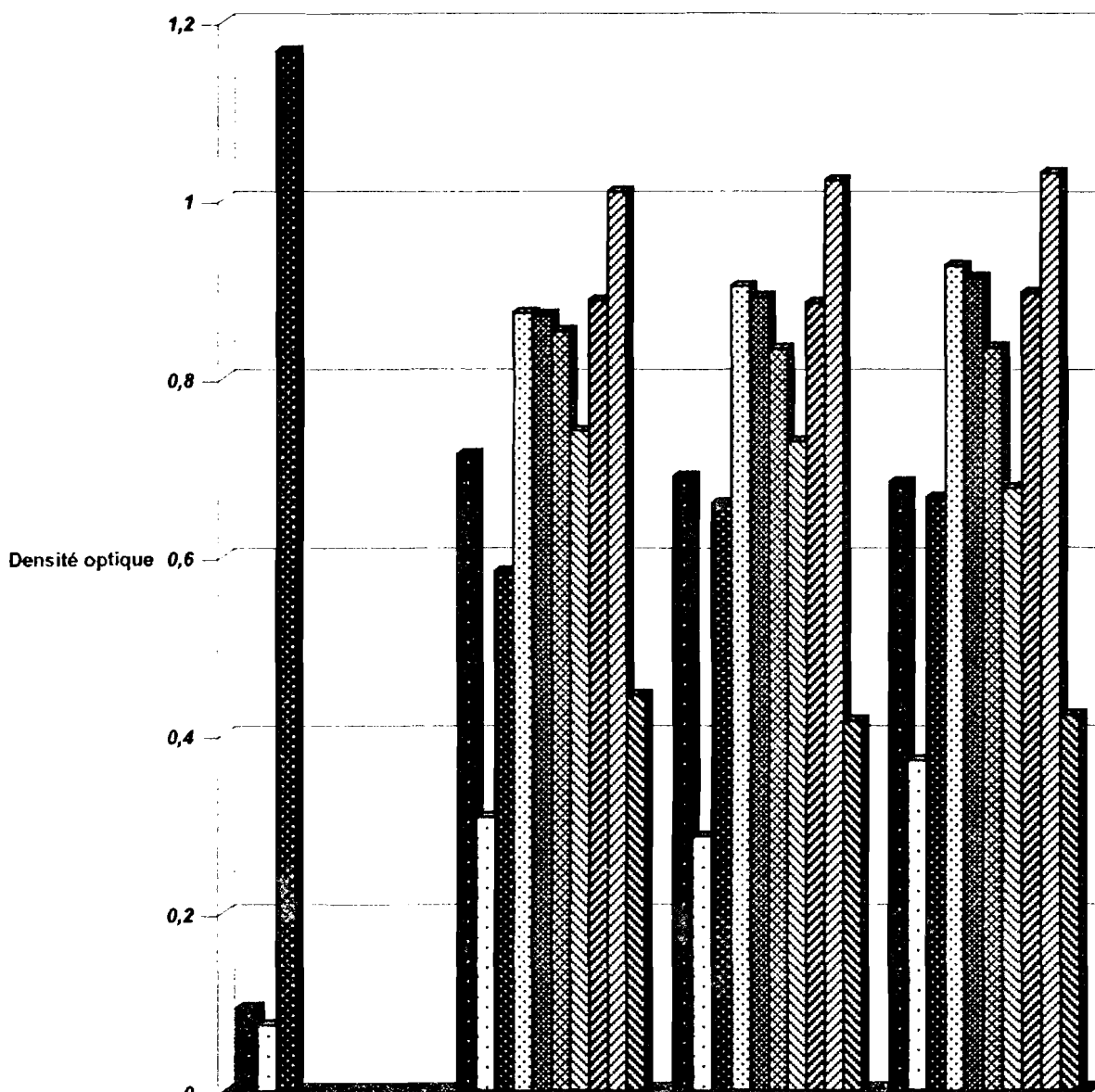
	témoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,102214286	0,638285714	0,699857143	0,724571429
□ Condition 2	0,083285714	0,305214286	0,238928571	0,312285714
■ Condition 3	1,181214286	0,737928571	0,636071429	0,642857143
□ Condition 4		0,8645	0,8195	0,839571429
■ Condition 5		0,9025	0,833928571	0,857
□ Condition 6		0,88	0,819642857	0,827714286
■ Condition 7		0,677642857	0,6945	0,656928571
□ Condition 8		0,846928571	0,84	0,851142857
■ Condition 9		0,871642857	0,885892857	0,864107143
□ Condition 10		0,28575	0,313285714	0,293785714

### SERUM E - IgM



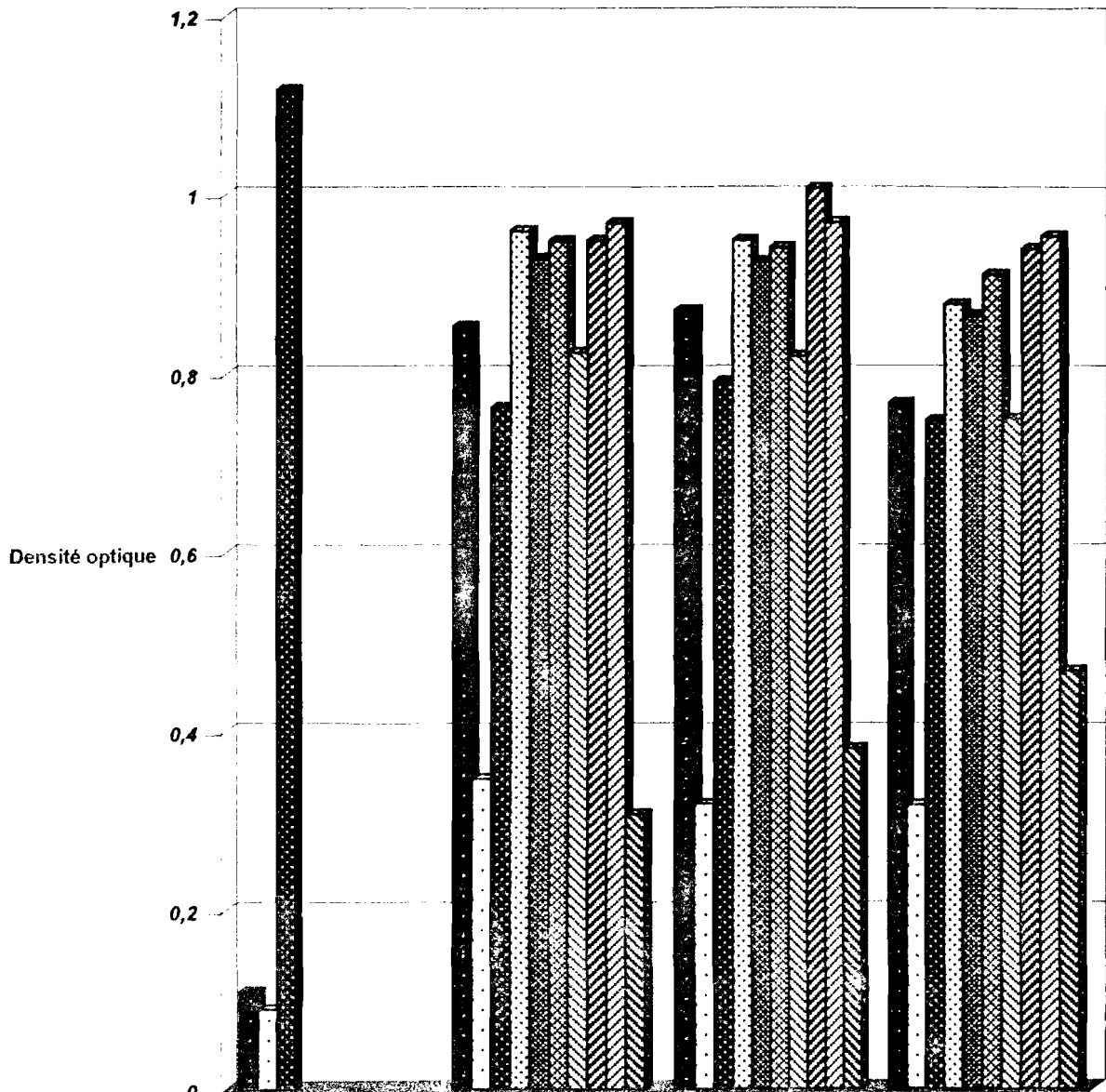
	<i>témoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ Condition 1	0,102214286	0,747071429	0,678928571	0,749571429
□ Condition 2	0,073571429	0,243285714	0,313642857	0,330428571
■ Condition 3	1,181214286	0,667214286	0,633285714	0,709357143
□ Condition 4		0,826214286	0,830428571	0,832928571
■ Condition 5		0,834357143	0,818214286	0,845428571
□ Condition 6		0,812785714	0,803142857	0,822714286
■ Condition 7		0,6735	0,671714286	0,698642857
□ Condition 8		0,829285714	0,856857143	0,952714286
■ Condition 9		1,004107143	1,002214286	0,998357143
□ Condition 10		0,365178571	0,378178571	0,372607143

### SERUM F - IgM



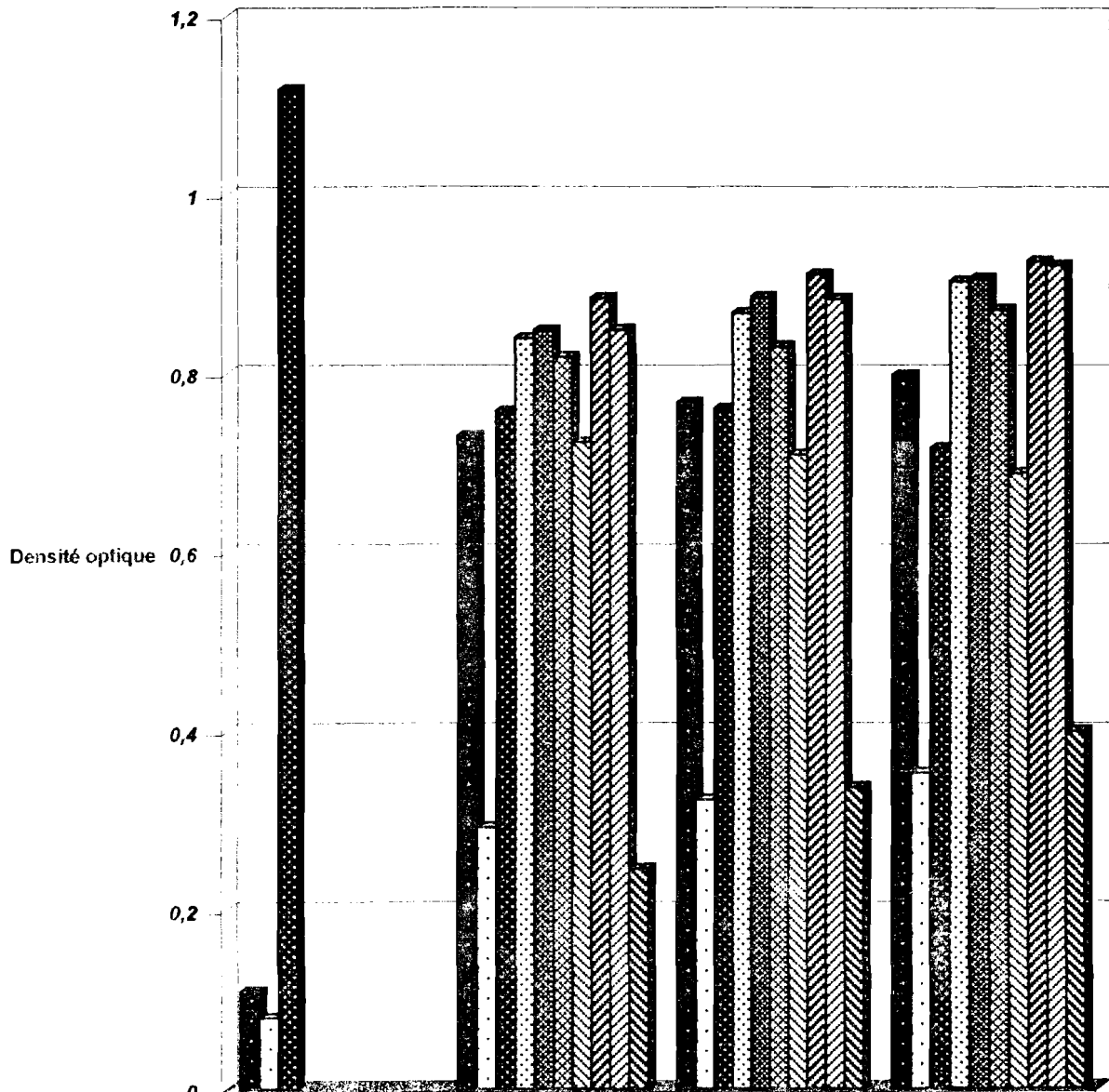
	<i>témoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ <i>Condition 1</i>	0,093857143	0,714285714	0,689642857	0,683071429
□ <i>Condition 2</i>	0,074142857	0,307357143	0,285285714	0,371285714
■ <i>Condition 3</i>	1,166071429	0,582857143	0,659642857	0,666
□ <i>Condition 4</i>		0,873142857	0,903	0,926142857
■ <i>Condition 5</i>		0,870928571	0,890857143	0,913571429
■ <i>Condition 6</i>		0,852928571	0,832928571	0,834571429
■ <i>Condition 7</i>		0,740714286	0,728928571	0,676857143
■ <i>Condition 8</i>		0,887214286	0,884214286	0,896071429
■ <i>Condition 9</i>		1,008821429	1,021678571	1,030214286
■ <i>Condition 10</i>		0,443821429	0,415428571	0,421464286

### SERUM G - IgM



	<i>temoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ Condition 1	0,109285714	0,853142857	0,871357143	0,767285714
□ Condition 2	0,089571429	0,347214286	0,318785714	0,318071429
■ Condition 3	1,117428571	0,762357143	0,7915	0,7485
▣ Condition 4		0,959714286	0,9495	0,878428571
▤ Condition 5		0,929214286	0,925928571	0,8665
▥ Condition 6		0,948714286	0,9415	0,9115
▦ Condition 7		0,823642857	0,819928571	0,750785714
▧ Condition 8		0,949214286	1,008142857	0,940428571
▨ Condition 9		0,96875	0,969535714	0,954357143
▩ Condition 10		0,3075	0,380714286	0,467964286

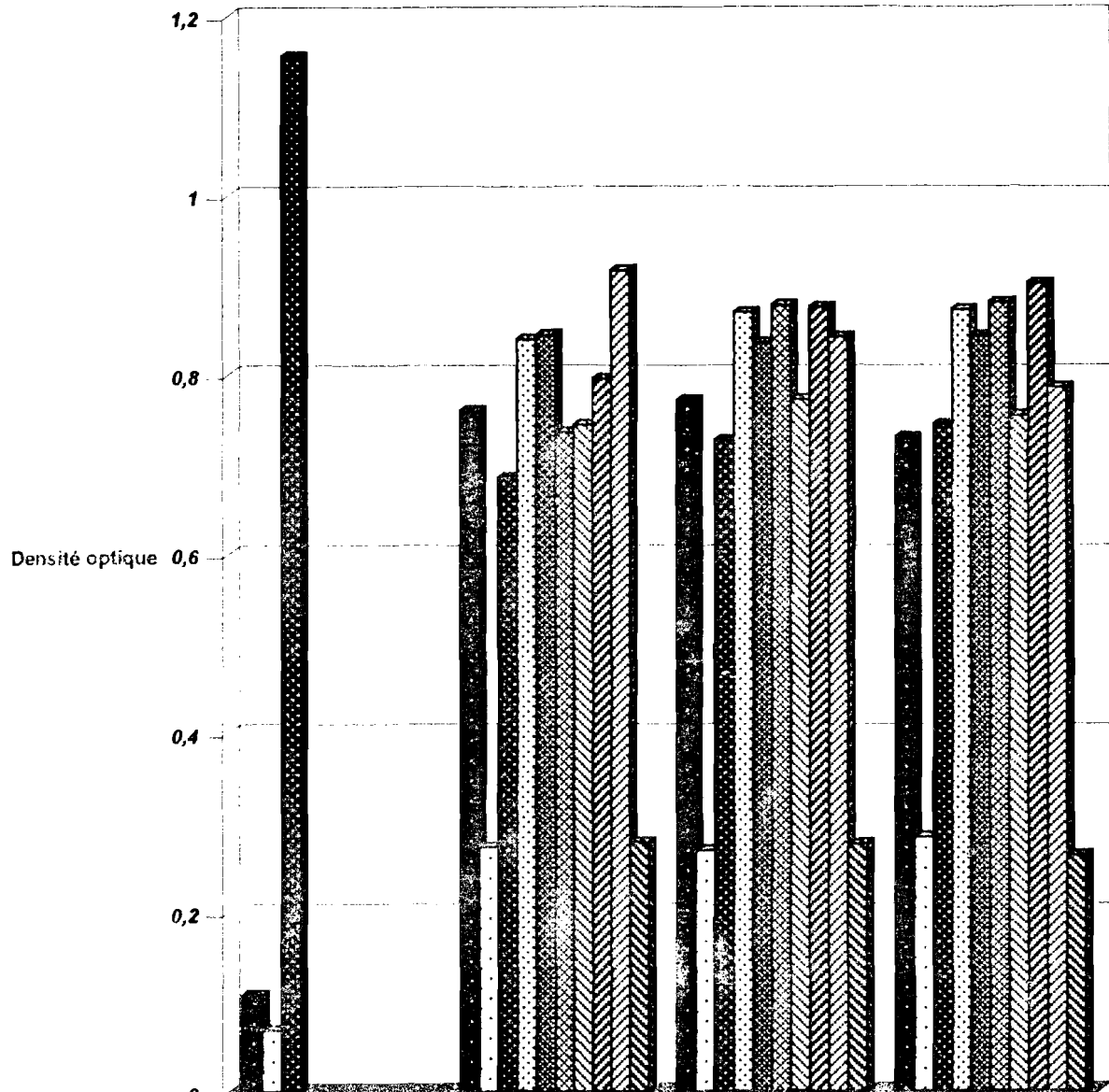
### SERUM H - IgM



	temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,109285714	0,730428571	0,768214286	0,798357143
□ Condition 2	0,079857143	0,292142857	0,323357143	0,353642857
■ Condition 3	1,117428571	0,758071429	0,760642857	0,717071429
□ Condition 4		0,839571429	0,867571429	0,903142857
■ Condition 5		0,848214286	0,885214286	0,906785714
■ Condition 6		0,818642857	0,830642857	0,872285714
■ Condition 7		0,723642857	0,709071429	0,689214286
■ Condition 8		0,884214286	0,911357143	0,925928571
■ Condition 9		0,849142857	0,883857143	0,921464286
■ Condition 10		0,245607143	0,337428571	0,400392857

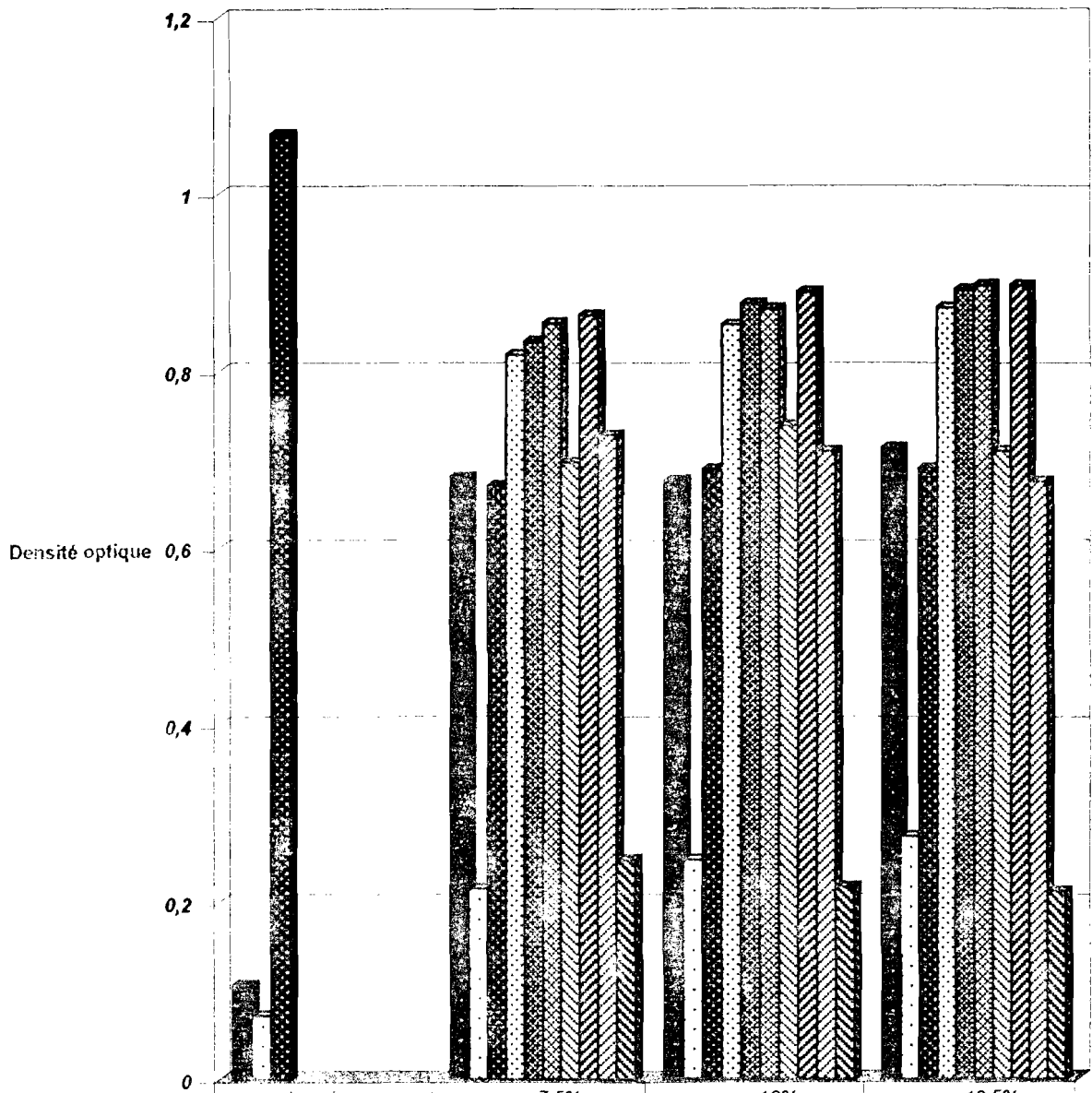


### SERUM I - IgM



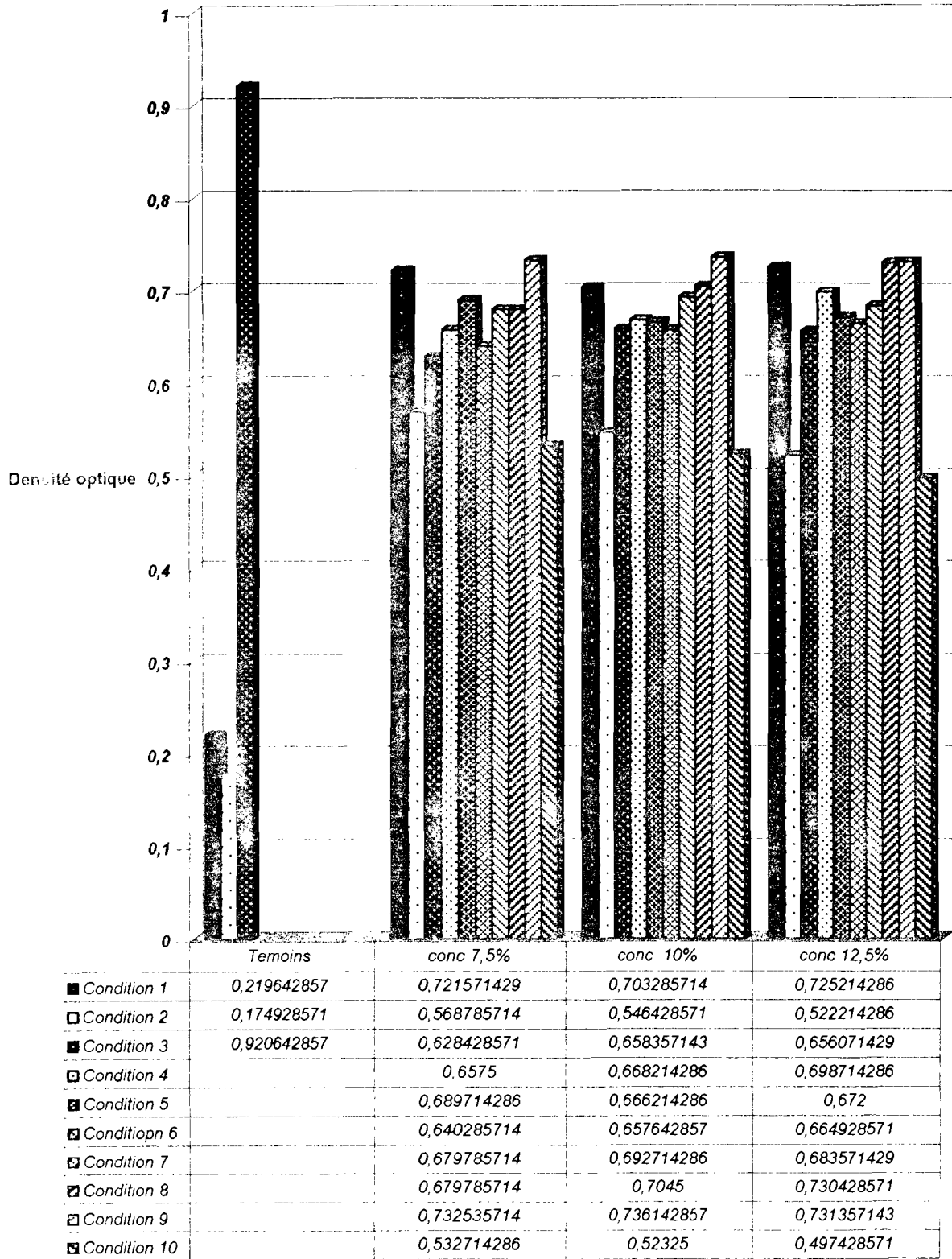
	temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,108142857	0,758857143	0,770785714	0,729285714
□ Condition 2	0,0685	0,272357143	0,268571429	0,283642857
■ Condition 3	1,154285714	0,684714286	0,725928571	0,743857143
□ Condition 4		0,839	0,868857143	0,872
■ Condition 5		0,843357143	0,835142857	0,843142857
□ Condition 6		0,734857143	0,876928571	0,880642857
■ Condition 7		0,743142857	0,771928571	0,753714286
□ Condition 8		0,794214286	0,875071429	0,901071429
■ Condition 9		0,915785714	0,841571429	0,784571429
□ Condition 10		0,277785714	0,276214286	0,263214286

### SERUM T - IgM



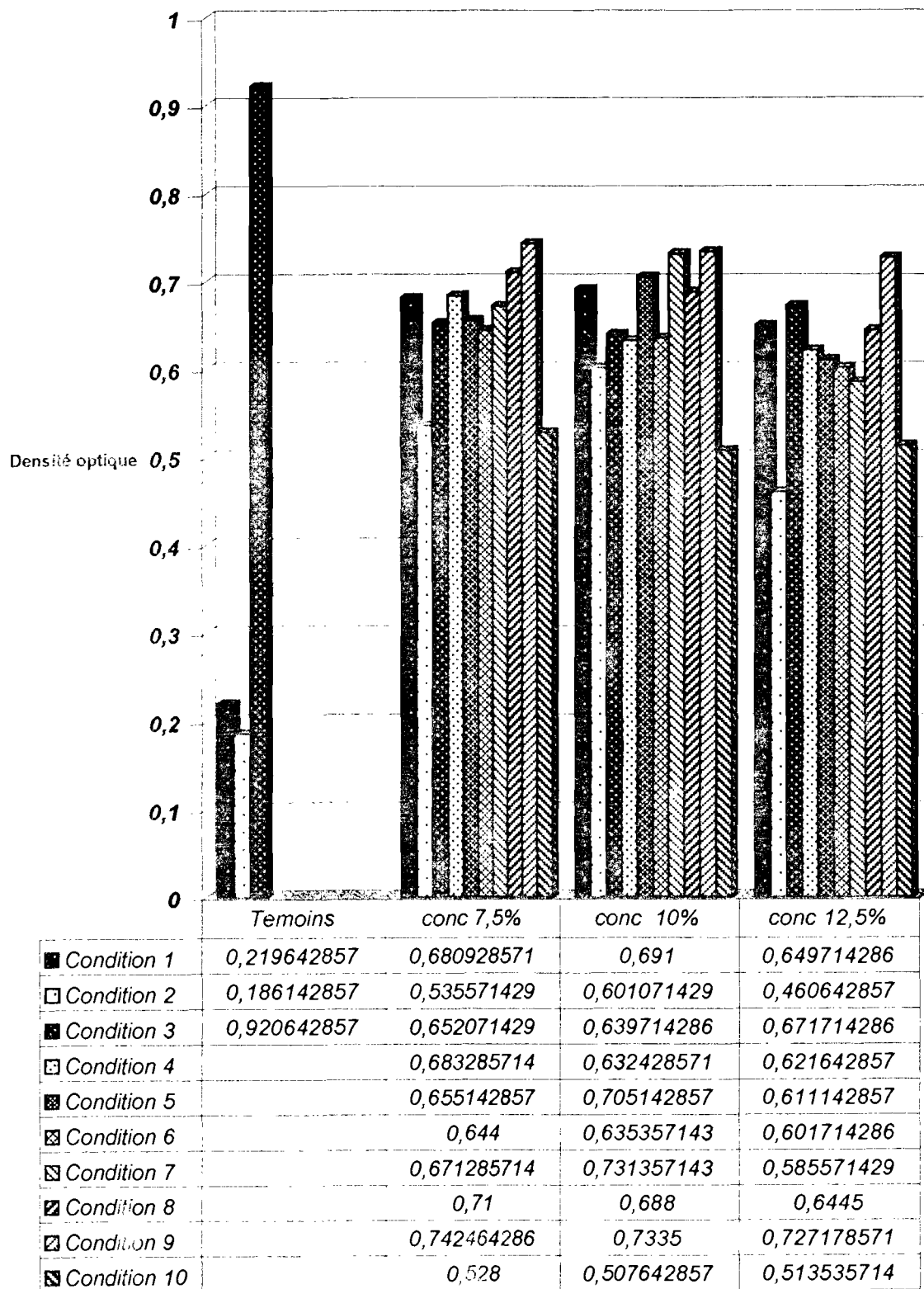
	<i>temoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ Condition 1	0,106428571	0,680357143	0,6765	0,713571429
□ Condition 2	0,072357143	0,215428571	0,248214286	0,274142857
■ Condition 3	1,068021429	0,6705	0,688928571	0,690142857
□ Condition 4		0,818714286	0,852642857	0,871785714
■ Condition 5		0,834	0,876357143	0,8925
□ Condition 6		0,8545	0,870714286	0,897928571
■ Condition 7		0,696857143	0,738714286	0,709857143
□ Condition 8		0,863642857	0,889785714	0,897
■ Condition 9		0,727892857	0,7095	0,675178571
□ Condition 10		0,248214286	0,217285714	0,212464286

SERUM A - IgG

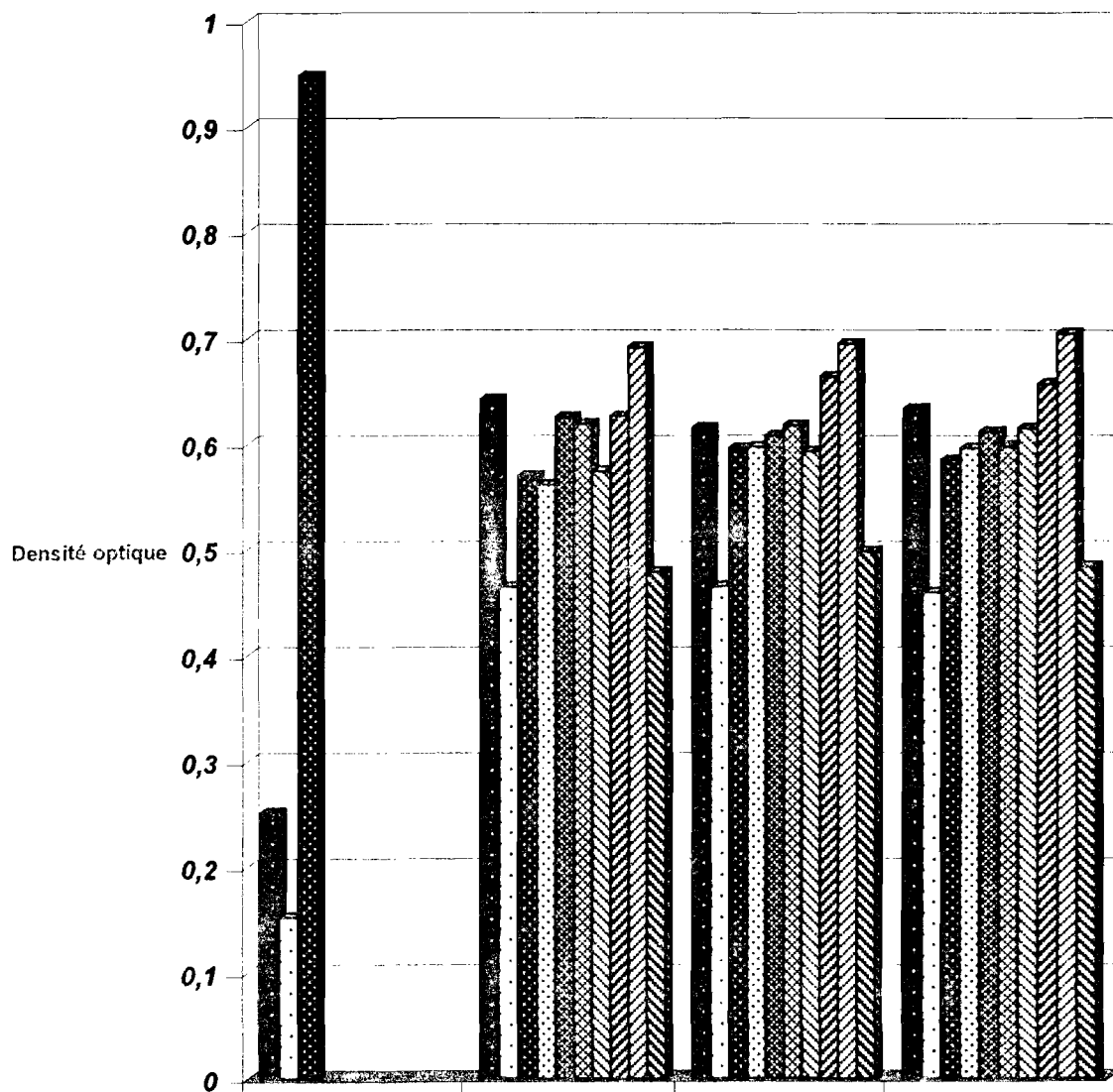


**Figure 2b** : Influence des différentes conditions de culture sur la production d'immunoglobulines de type IgG.

SERUM B - IgG

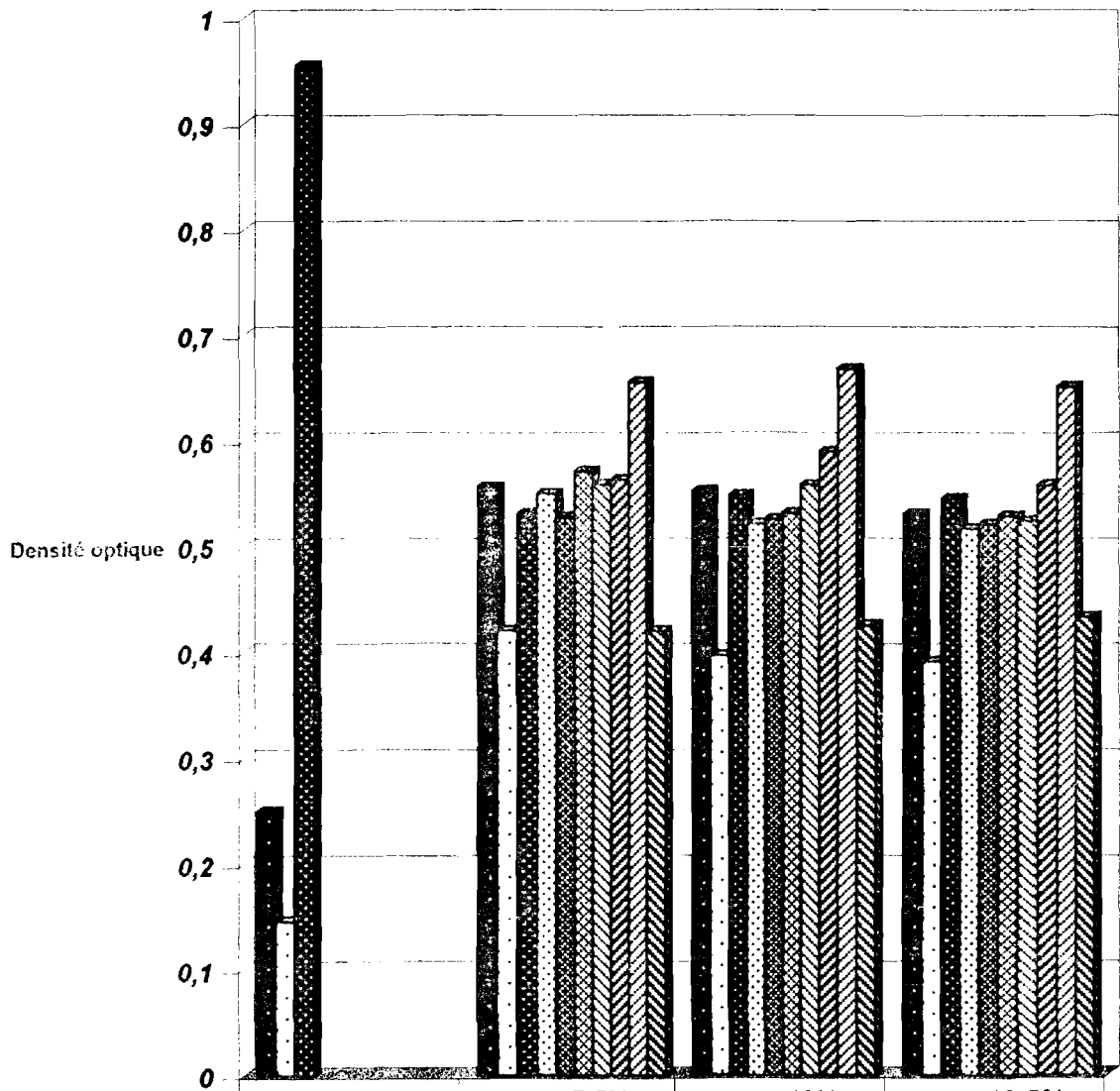


SERUM C - IgG



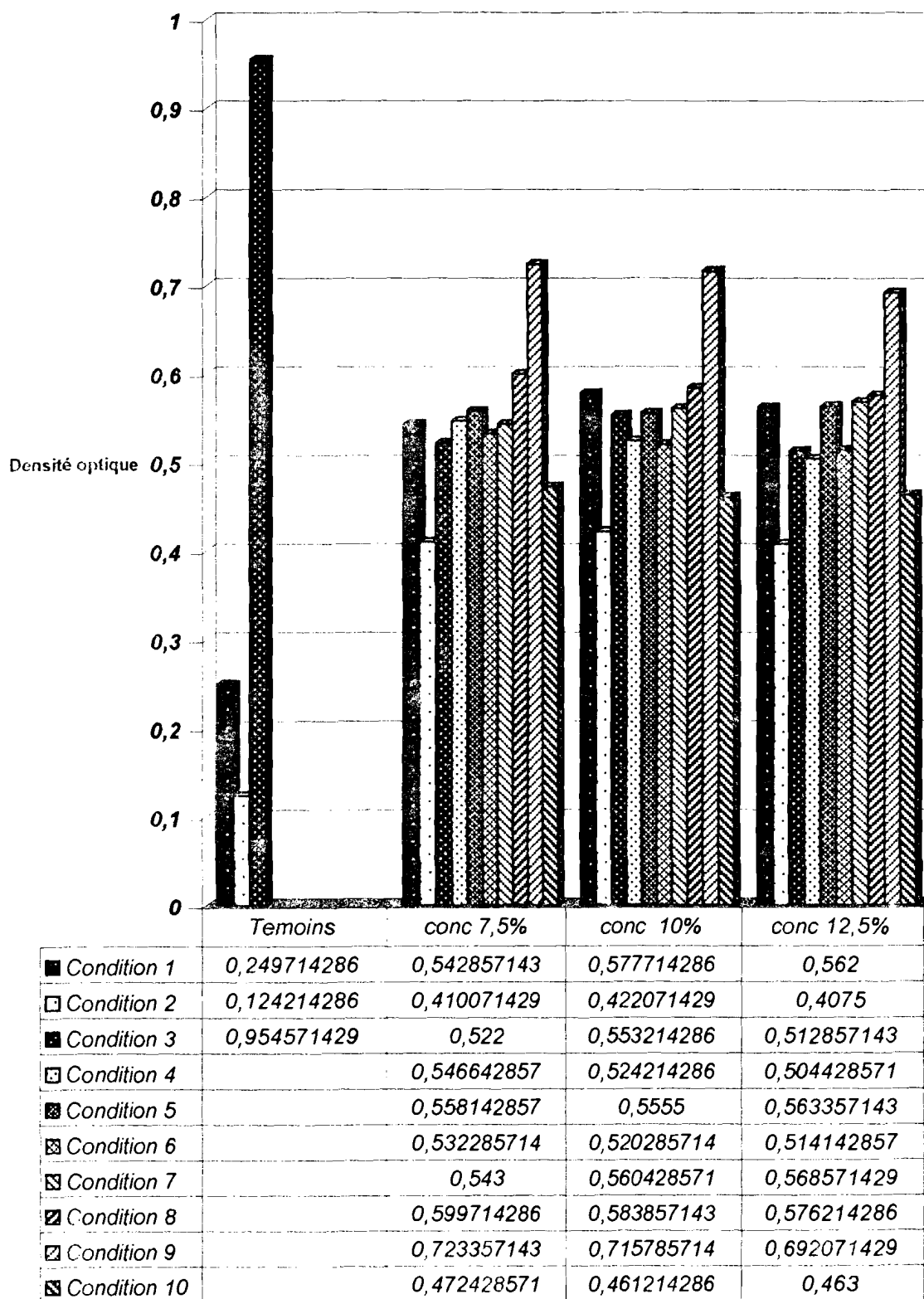
	Temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,251071429	0,641928571	0,615	0,633142857
□ Condition 2	0,152642857	0,4645	0,464857143	0,459285714
■ Condition 3	0,947714286	0,569357143	0,595357143	0,584642857
▣ Condition 4		0,561	0,596714286	0,595928571
■ Condition 5		0,625071429	0,6075	0,611357143
▣ Condition 6		0,618928571	0,617285714	0,598071429
▣ Condition 7		0,573928571	0,592928571	0,615071429
▣ Condition 8		0,625857143	0,663857143	0,656928571
▣ Condition 9		0,691571429	0,694892857	0,70425
▣ Condition 10		0,478714286	0,49825	0,483642857

SERUM D - IgG

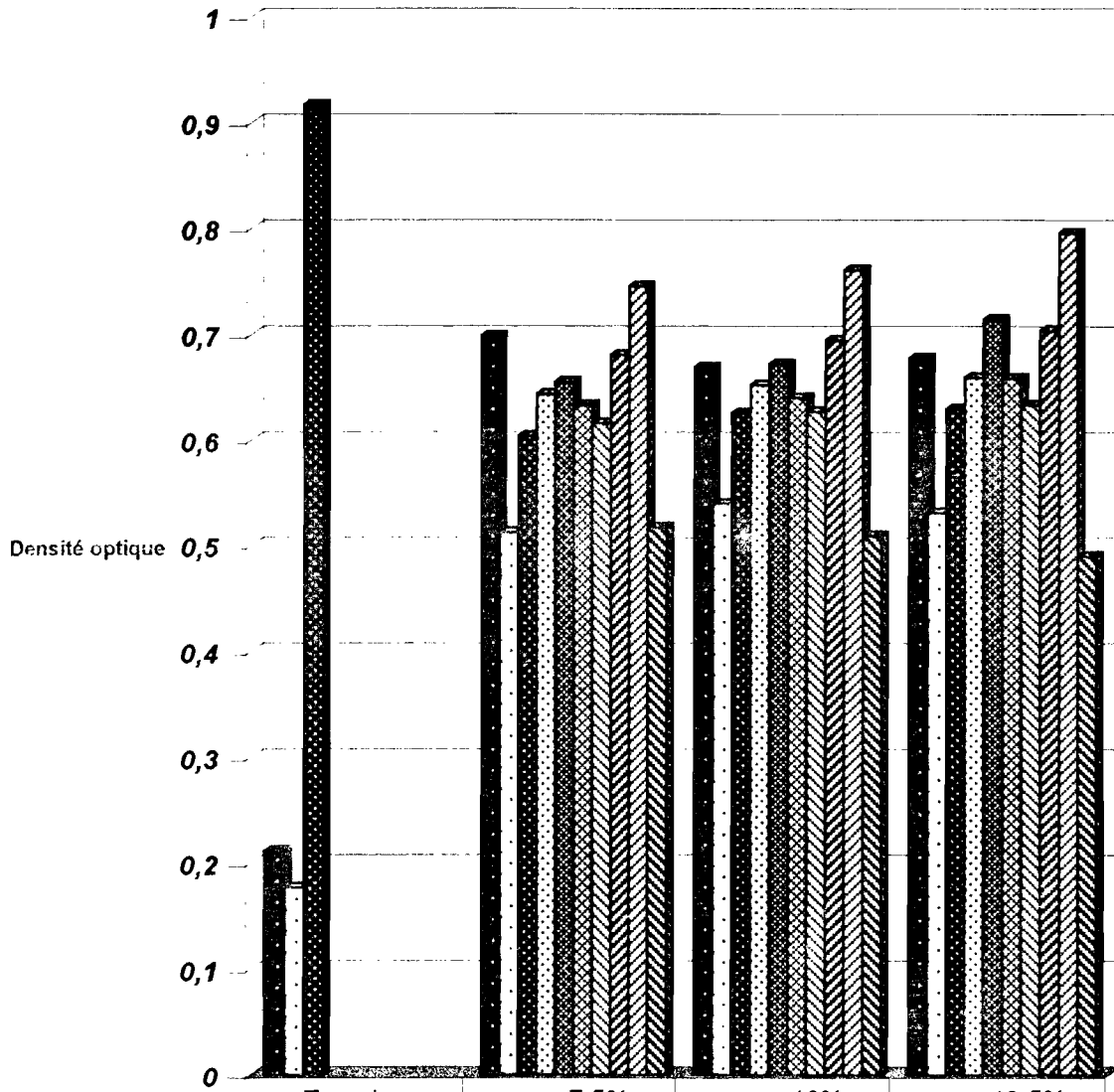


	<i>Temoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ <i>Condition 1</i>	0,249714286	0,557214286	0,552357143	0,530857143
□ <i>Condition 2</i>	0,145428571	0,420214286	0,396642857	0,391142857
■ <i>Condition 3</i>	0,954571429	0,531214286	0,548642857	0,545357143
▣ <i>Condition 4</i>		0,550214286	0,521642857	0,517357143
▤ <i>Condition 5</i>		0,528142857	0,526	0,521857143
▥ <i>Condition 6</i>		0,571071429	0,531857143	0,529571429
▦ <i>Condition 7</i>		0,558857143	0,558785714	0,524571429
▧ <i>Condition 8</i>		0,563571429	0,590071429	0,558357143
▨ <i>Condition 9</i>		0,655357143	0,667571429	0,651214286
▩ <i>Condition 10</i>		0,420071429	0,425571429	0,433428571

### SERUM E - IgG



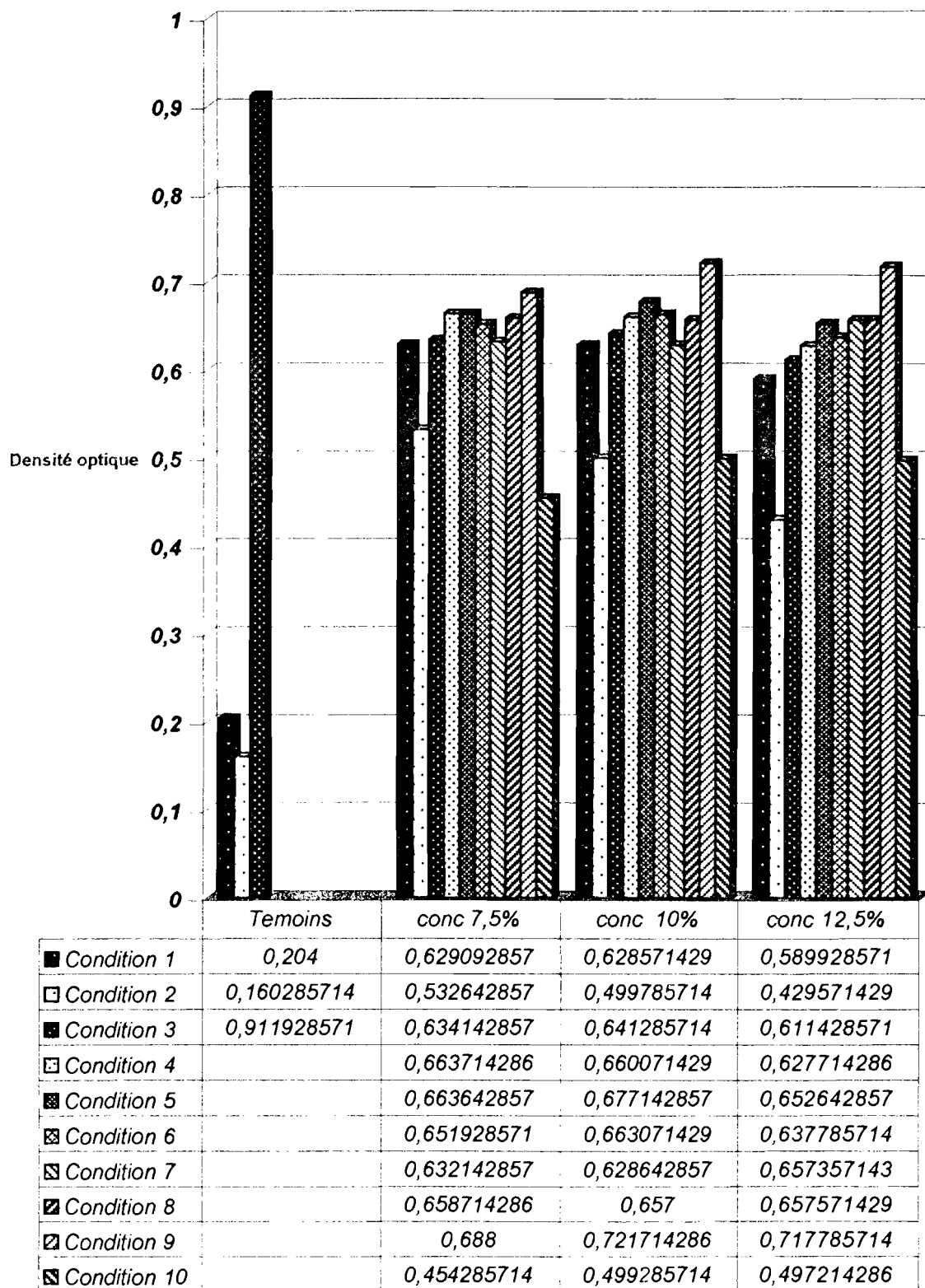
SERUM F - IgG



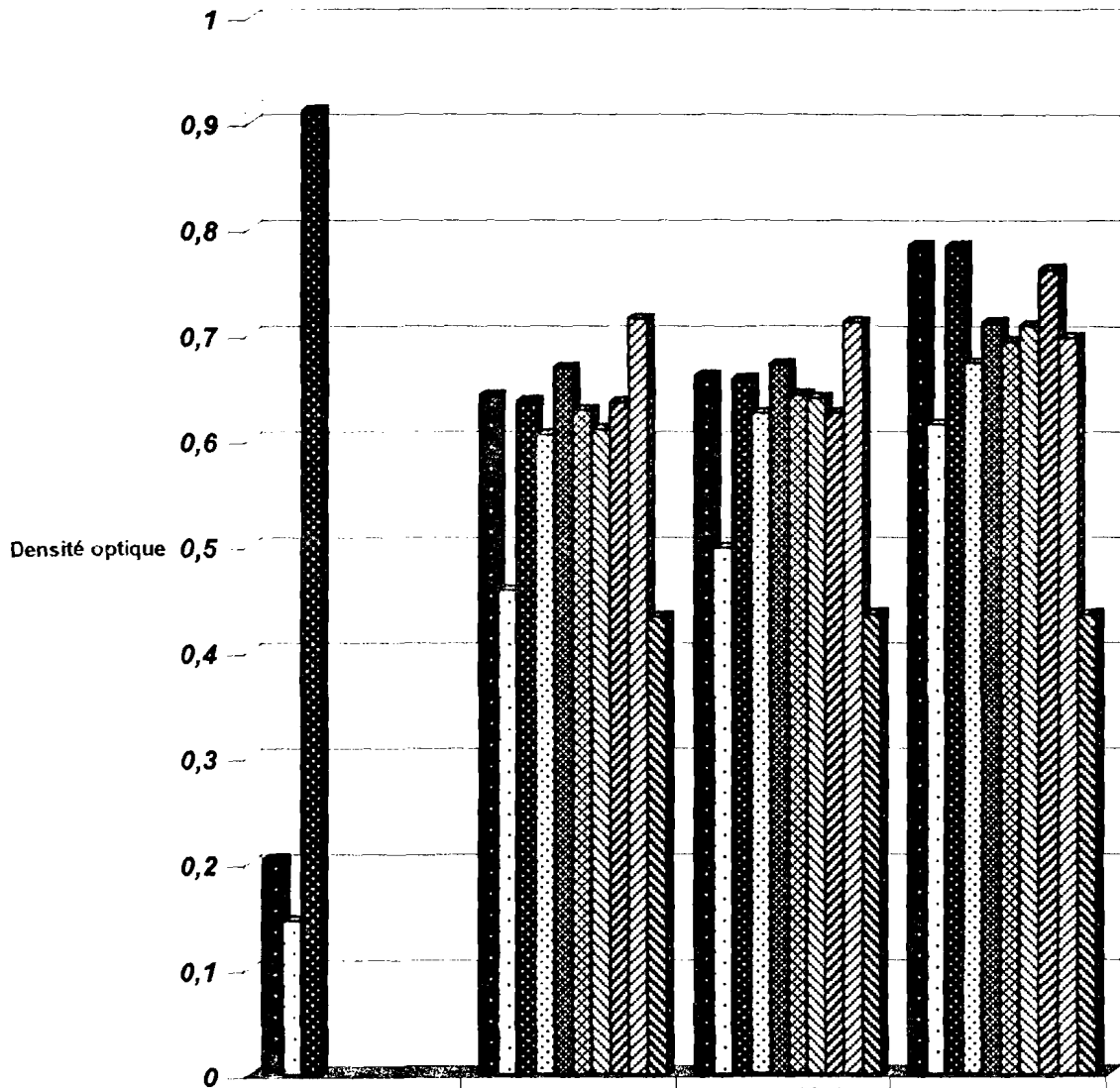
	Temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,2115	0,6985	0,668714286	0,677142857
□ Condition 2	0,177071429	0,512571429	0,539928571	0,531642857
■ Condition 3	0,916571429	0,604071429	0,625357143	0,629714286
▣ Condition 4		0,643357143	0,652214286	0,659214286
■ Condition 5		0,654928571	0,671714286	0,714071429
▣ Condition 6		0,632857143	0,640071429	0,658714286
▣ Condition 7		0,615857143	0,626785714	0,633428571
▣ Condition 8		0,680214286	0,6945	0,703714286
▣ Condition 9		0,745321429	0,760357143	0,795571429
▣ Condition 10		0,517285714	0,509357143	0,490142857



### SERUM G - IgG

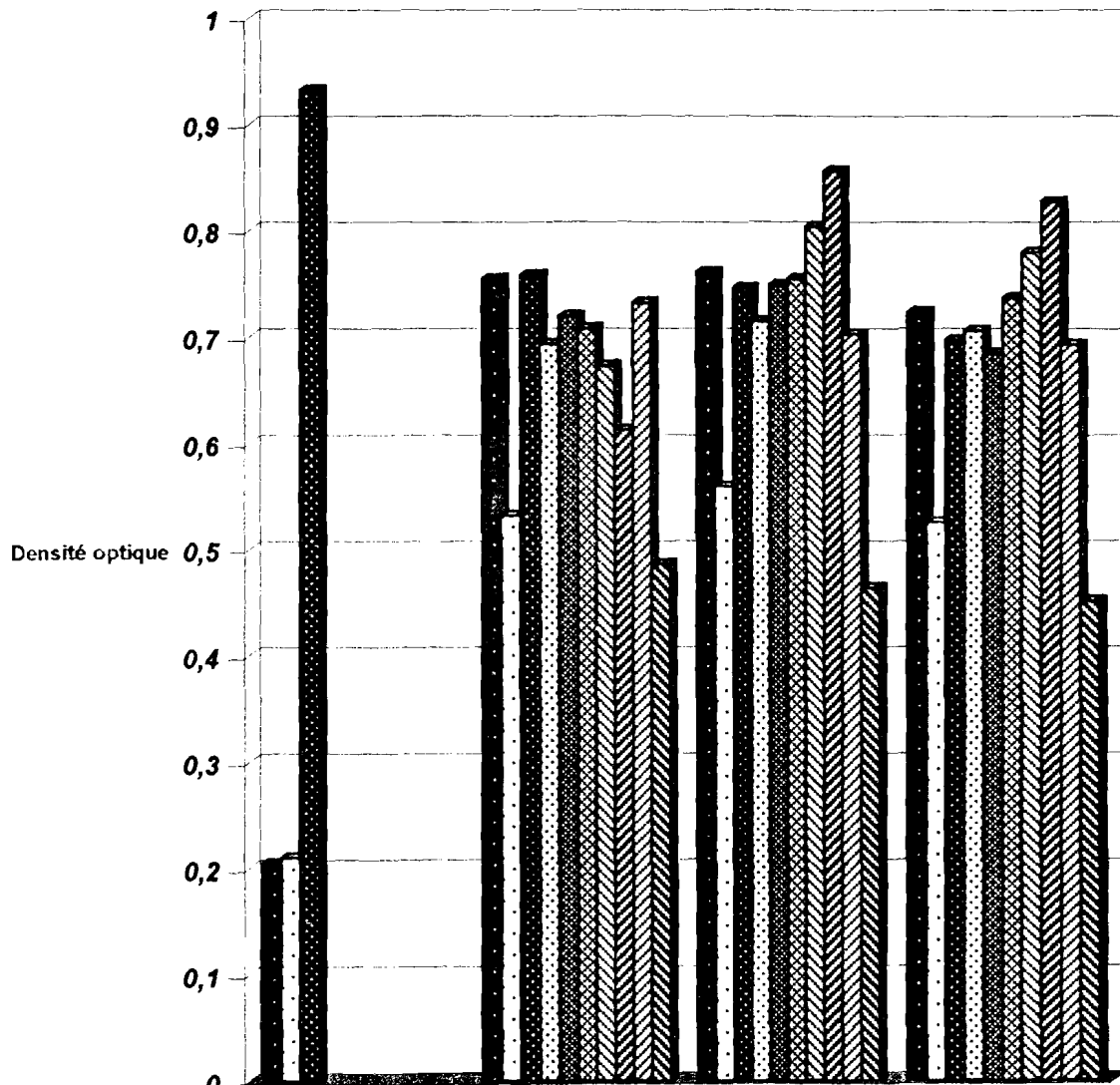


# SERUM H - IgG



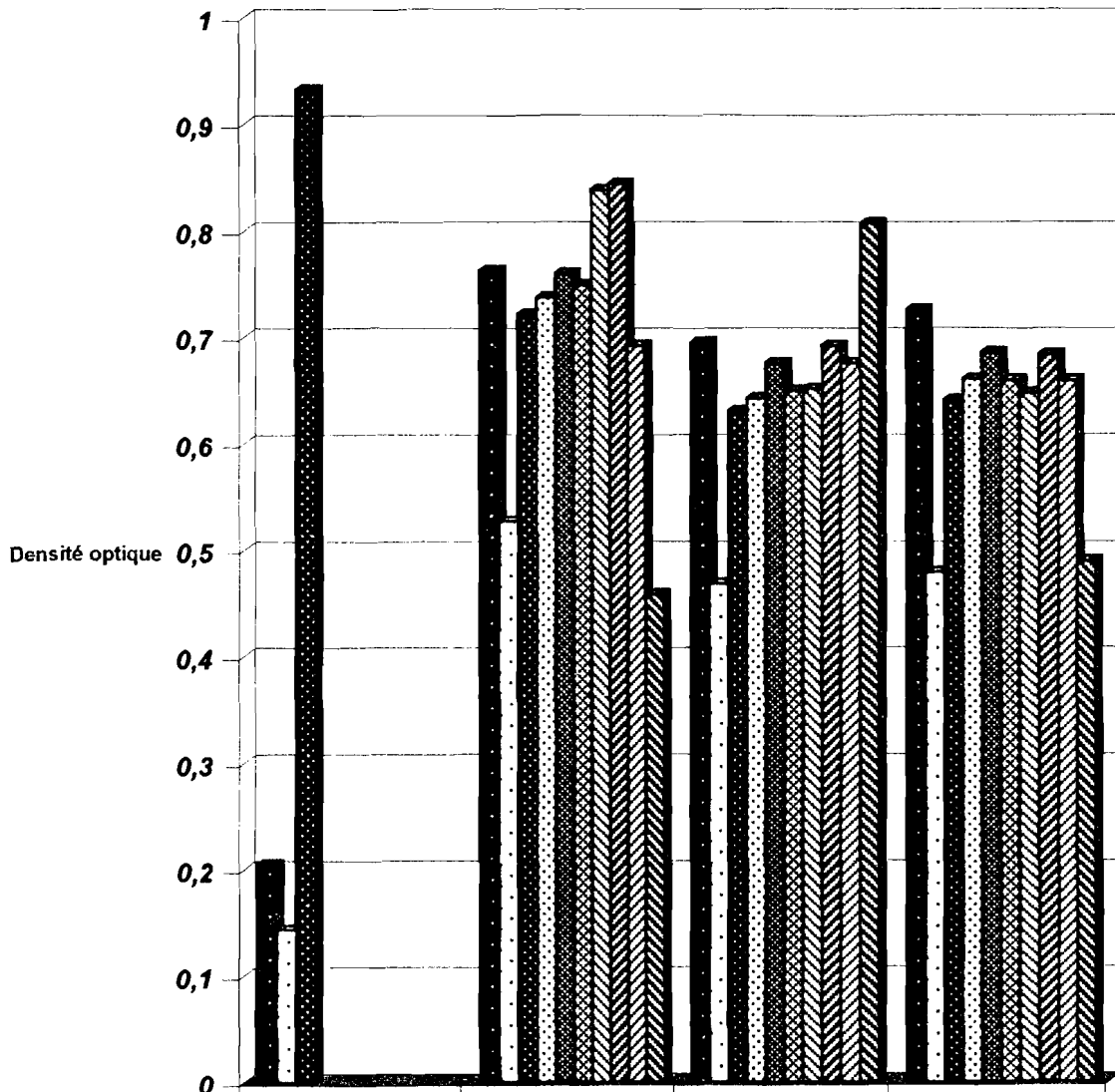
	Temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,204	0,642071429	0,660571429	0,784357143
□ Condition 2	0,145785714	0,457857143	0,498142857	0,615071429
■ Condition 3	0,911928571	0,636785714	0,657785714	0,783714286
▣ Condition 4		0,605142857	0,625428571	0,673428571
■ Condition 5		0,668571429	0,671857143	0,711714286
▣ Condition 6		0,628571429	0,643	0,693714286
▣ Condition 7		0,610142857	0,639857143	0,709214286
▣ Condition 8		0,635785714	0,625928571	0,761642857
▣ Condition 9		0,715142857	0,711357143	0,697428571
▣ Condition 10		0,433428571	0,436142857	0,435357143

SERUM I - IgG



	Temoins	conc 7,5%	conc 10%	conc 12,5%
■ Condition 1	0,204714286	0,754857143	0,760857143	0,723
□ Condition 2	0,21	0,531785714	0,559071429	0,525642857
■ Condition 3	0,932214286	0,758071429	0,745714286	0,696928571
▣ Condition 4		0,693428571	0,714714286	0,706
■ Condition 5		0,719714286	0,748642857	0,684642857
▤ Condition 6		0,708071429	0,754714286	0,736857143
▥ Condition 7		0,672785714	0,803428571	0,779785714
▧ Condition 8		0,612357143	0,855857143	0,827714286
▨ Condition 9		0,731857143	0,7025	0,693071429
▩ Condition 10		0,485785714	0,463285714	0,451071429

SERUM T - IgG



	<i>Temoins</i>	<i>conc 7,5%</i>	<i>conc 10%</i>	<i>conc 12,5%</i>
■ <i>Condition 1</i>	0,204714286	0,761571429	0,694142857	0,725285714
□ <i>Condition 2</i>	0,143142857	0,526928571	0,468142857	0,478857143
■ <i>Condition 3</i>	0,932214286	0,720928571	0,629785714	0,640357143
▣ <i>Condition 4</i>		0,736642857	0,642285714	0,660142857
■ <i>Condition 5</i>		0,759214286	0,674928571	0,685214286
▤ <i>Condition 6</i>		0,748785714	0,649428571	0,65943
▥ <i>Condition 7</i>		0,837714286	0,651214286	0,6475
▦ <i>Condition 8</i>		0,843714286	0,6915	0,683142857
▧ <i>Condition 9</i>		0,691357143	0,675071429	0,658928571
▨ <i>Condition 10</i>		0,458071429	0,806642857	0,489428571

## RESUME

**TITRE** : CARACTERISATION DES CONDITIONS DE CULTURE POUR L'INDUCTION D'UNE PRODUCTION D'ANTICORPS REACTIFS VIS-A-VIS D'ANTIGENES DES FORMES SANGUINES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* PAR DES LYMPHOCYTES B PROVENANT D'AMYGDALES PRELEVEES CHEZ DES SUJETS JEUNES DE LA REGION DE DAKAR.

**Nom du Candidat** : SARR Mamadou

**Nature du mémoire** : *DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES  
DE BIOLOGIE ANIMALE*

**JURY** : **Président** : M. Bhen Sikina TOGUEBAYE Professeur  
**Membres** : M. Doudou BA Professeur  
M. Lamine DIAKHATE Professeur  
Mme. Aminata SALL/DIALLO Maître de Conférences Agrégé  
M. Cheikh Tidiane BA Maître de Conférences Agrégé

Au regard des difficultés rencontrées pour la recherche d'un candidat vaccin contre *Plasmodium falciparum* agent du paludisme, il était nécessaire de caractériser les conditions de production *in vitro* d'anticorps réactifs vis à vis des formes sanguines asexuées de ce parasite.

C'est ainsi que des cellules mononuclées d'origine amygdalienne de sujets à priori immuns ont été cultivées pendant 10 jours, à 37 °C en atmosphère humide sans CO<sub>2</sub>, sous un volume 100 ul à 2.10<sup>6</sup> cellules / ml en milieu ISCOVE enrichi en sérum de veau foetal utilisé à des concentrations variables ( 7,5, 10 et 12,5% ) et suppléments de culture habituels. Les suspensions de lymphocytes B ont été testées pour leur capacité à produire spontanément ou après stimulation par différentes combinaisons de cytokines et / ou d'extraits multiantigéniques de *P. falciparum* des IgG et IgM polyréactives ( polyspécifiques/polyclonaux ) et spécifiques *in vitro*. Les productions d'immunoglobulines ont été mesurées dans les surnageants de culture par technique ELISA.

Des principaux résultats obtenus, il est ressorti que les différents lots de sérum de veau foetal avaient un profil équivalent quant à leur capacité de favoriser *in vitro* de façon optimale la culture et la différenciation des lymphocytes B humains après leur activation pour les trois concentrations de travail.

Nos résultats ont permis d'apprécier la qualité des suspensions tonsillaires de lymphocytes B et permettent une indication quant à leur utilisation pour l'étude du répertoire B de sujets immunisés par des antigènes de *P. falciparum* et de préférence au sang périphérique plus limité en nombre de cellules.

**Mots clefs** : Amygdales ; lymphocytes B ; Immunoglobulines ; *Plasmodium falciparum*