

UNIVERSITÉ DE DAKAR

FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ANNÉE 1985

N 131

S-04770

Étude de l'opsonisation du streptocoque A  
par une technique de chimioluminescence  
et par dosage des anions superoxydes  
Application à l'étude de l'activité opsonisante  
de cinq préparations d'immunoglobulines



THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Janvier 1986  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

par

Mademoiselle MAGUETTE DÈME SYLLA  
née le 18 Août 1961, à DAKAR (Sénégal)

PRÉSIDENT DU JURY : PROFESSEUR HUMBERT GIONO - BARBER

MEMBRES DU JURY : PROFESSEUR JEAN ROFFI

PROFESSEUR SAMBA DIALLO

PROFESSEUR MAURICE CARRAZ

DIRECTEUR DE THÈSE : MADAME COLETTE VEYSSEYRE

UNIVERSITÉ DE DAKAR

FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ANNÉE 1985

N° 131

Étude de l'opsonisation du streptocoque A  
par une technique de chimioluminescence  
et par dosage des anions superoxydes  
Application à l'étude de l'activité opsonisante  
de cinq préparations d'immunoglobulines



THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Janvier 1986  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

par

Mademoiselle MAGUETTE DÈME SYLLA  
née le 18 Août 1961, à DAKAR (Sénégal)

PRÉSIDENT DU JURY : PROFESSEUR HUMBERT GIONO - BARBER

MEMBRES DU JURY : PROFESSEUR JEAN ROFFI

PROFESSEUR SAMBA DIALLO

PROFESSEUR MAURICE CARRAZ

DIRECTEUR DE THÈSE : MADAME COLETTE VEYSSEYRE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

-:~:~:~:~:~:-

PERSONNEL DE LA FACULTE

-:~:~:~:~:~:-

DOYEN .....	M. Ibrahima	DIOP MAR
PREMIER ASSESSEUR .....	M. Oumar	SYLLA
DEUXIEME ASSESSEUR .....	M. Samba	DIALLO
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS .....	M. Ousmane	SOUMARE

-o-o-o-o-o-o-o-

-o-o-o-o-

-o-

Liste du Personnel établie au 25/04/1985

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE

POUR L'ANNEE UNIVERSITAIRE

1984 - 1985

**PROFESSEURS TITULAIRES**

M.	Paul	CORREA	Gynécologie-Obstétrique
M.	Hervé	DE LAUTURE	Médecine Préventive
M.	Joseph	DIALLO	Ophthalmologie
M.	Samba	DIALLO	Parasitologie
M.	François	DIENG	Médecine Légale
M.	Adrien	DIOP	Chirurgie Générale
M.	Biram	DIOP	Médecine Interne
M.	Ibrahima	DIOP MAR	Maladies Infectieuses
M.	Lamine	DIOP	O. R. L.
M.	Samba	GUEYE	Anesthésiologie
M.	Papa	KOATE	Cardiologie
M.	Papa Demba	NDIAYE	Anatomie Pathologique
M.	René	NDOYE	Biophysique
M.	Idrissa	POUYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Abdou	SANOKHO	Pédiatrie
M.	Gabriel	SENGHOR	Pédiatrie
+ M.	Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale
M.	Ahmedou Moustapha	SOW	Centre Anti-diabétique
M.	Henri	TOSSOU	Urologie
M.	Ibrahima	WONE	Médecine Préventive

**PROFESSEURS SANS CHAIRE**

M.	Oumar	BAO	Thérapeutique
* M.	Samba	DIOP	Médecine Préventive
M.	Mohamadou	FALL	Pédiatrie
M.	Abdourahmane	KANE	Pneumophtisiologie
M.	Ibrahima	SECK	Biochimie Médicale
M.	Abdourahmane	SOW	Maladies Infectieuses

+ Personnel associé

\* Personnel en détachement

PROFESSEUR EN SERVICE EXTRAORDINAIRE

M. Pierre LAMOUCHE Radiologie

MAITRE DE CONFERENCES AGREGES

M.	José-Marie	AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M.	Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
Mme	Awa Marie	COLL	Maladies Infectieuses
M.	Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
Mme	Mireille	DAVID	Bactériologie-Virologie
M.	Lamine	DIAKHATE	Hématologie
M.	Babacar	DIOP	Psychiatrie
* M.	El Hadj Malick	DIOP	O. R. L.
M.	Sémou	DIOUF	Cardiologie
M.	Mamadou	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M.	Aristide	MENSAH	Urologie
M.	Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M.	Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
M.	Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie
M.	Mousa Lamine	SOW	Anatomie
M.	Papa	TOURE	Cancérologie
M.	Yakouba Ishaga	TOURE	Médecine Interne
M.	Alassane	WADE	Ophthalmologie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	Jacques	ARNOLD	Histologie-Embryologie
M.	Gilles	CHERBONNEL	Chirurgie Générale
M.	Alexis	COUMBARAS	Maladies Infectieuses
M.	Pierre	FALTOT	Physiologie
M.	Jean Bernard	MAUFERON	Neurologie
M.	Jacques	MILLAN	Léprologie
Mme	Jacqueline	PIQUET	Biophysique
M.	Jacques	STEPHANY	Psychiatrie

MAITRE-ASSISTANTE

Mme Gisèle BLAVY Hématologie

\* Maître de Conférences Agrégé associé

.../...

**ASSISTANTS DE FACULTE -ASSISTANTS DES  
SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX**

M.	Fallou	CISSE	Physiologie
M.	Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M	Abdarahmane	DIA	Anatomie
M.	Moctar	DIOP	Histologie-Embryologie
M.	Pierre	DUFETEL	Physiologie
M.	Alain	FERRER	Histologie-Embryologie
M.	Oumar	GAYE	Parasitologie
M.	Alain	LE COMTE	Biophysique
M.	Jehan-Mary	MAUPPIN	Anatomie
M.	Victorino	MENDES	Anatomie Pathologique
M.	Adama	NDIAYE	Parasitologie
Mme.	Mbayang	NDIAYE/NIANG	Physiologie
M.	Gora	SECK	Physiologie
Mme.	Sylvie	SECK/GASSAMA	Biophysique
M.	Doudou	THIAM	Hématologie
M.	Bernard	YVONNET	Bactériologie-Virologie

**CHEFS. DE CLINIQUE -ASSISTANTS DES  
SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX**

M.	Ardo boubou	BA	Chirurgie Générale
M.	Mamadou	BA	Pédiatrie
M.	Moussa	BADIANE	Electro-Radiologie
M.	Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
+M.	Komi	BALO	Ophthalmologie
M.	Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M.	El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologi.
M.	Saïd Nour	DIOP	Centre Anti-diabétique
Mme.	Thérèse Moreira	DIOP	Médecine Interne
M.	Ibrahima	FALL	Chirurgie Générale
M.	Momar	GUEYE	Psychiatrie
M.	Michel	GUIRAUD	Dermatologie
M.	Salvy Léandre	MARTIN	Pédiatrie
M.	Jean-Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
M.	Madoune Robert	NDIAYE	Ophthalmologie

+ Assistant-Chef de Clinique Associé

.../...

M.	Mohamed Fadel	NDIAYE	Centre Anti-diabétique
M.	Mohamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M.	Mohamdou	NDIAYE	Chirurgie Générale
M.	Aly	NGOM	Gynécologie-Obstétrique
Mme.	Bineta	SALL	Anesthésiologie
M.	Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M.	Mamadou	SARR	Pédiatrie
M.	Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M.	Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
Mme.	Aby	SY/SIGNATE	Pédiatrie
+ M.	Mady Oury	SYLLA	Cardiologie
M.	Omar	SYLLA	Psychiatrie
M.	Gilbert	TENDING	O. R. L.
M.	Mamadou	TOURE	Cancérologie
M.	Mamadou	TRAORE	Gynécologie-Obstétrique

**ATTACHES -ASSISTANTS DES SCIENCES FONDAMENTALES**

M.	Isidone Aloys	BOYE	Anatomie Pathologique
M.	Daouda	DIA	Biochimie Médicale
M.	Momar	FALL	Anatomie
M.	Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme.	Chantal	PENOT	Médecine Préventive
M.	Niama Diop	SALL	Biochimie Médicale
M.	Méïssa	TOURE	Biochimie Médicale

**ATTACHES -CHEFS DE CLINIQUE**

M.	Mohamed	AYAD	Pneumophtisiologie
M.	Alphonse	ATIKPAHOUN	O. R. L.
M.	Massar	DIAGNE	Neurologie
M.	Gorgui	DIOP	Cardiologie
Mme.	Mame Coumba	FALL/GAYE	Institut Méd.Trop.Appl
M.	Moustapha	NDIR	Pneumophtisiologie
Mme.	Marie-Thérèse	SOW-GOERGER	Médecine Interne

+Assistant-Chef de Clinique Associé

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mme	Ndioro	NDIAYE	Odontologie Préventive et Sociale
Mme	Renée	NDIAYE	Parodontologie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	Gilbert	LARROQUE	Odonto-Stomatologie
M.	André	SCHVARTZ	Dentisterie Opératoire

MAITRE - ASSISTANT

M.	Ibrahima	BA	Pédodontie
----	----------	----	------------

ASSISTANTS DE FACULTE

Mme	Christiane	AGBOTON	Prothèse Dentaire
Mme	Maïmouna	BADIANE	Dentisterie Opératoire
M.	Patrick	BEYLIE	Biologie et Matières Fondamentales
M.	Boubacar	DIALLO	Odontologie Chirurgicale
M.	Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
Mlle	Fatou	GAYE	Dentisterie Opératoire
M.	Abdoul Wakhabe	KANE	Dentisterie Opératoire
M.		MAC-HOI-CHANG	Prothèse dentaire
M.	Jean-Loup	MOREAU	Parodontologie
M.	Paul Panka	OUENDENO	Orthopédie dento-faciale
M.	Malick	SEMBENE	Parodontologie
M.	Jean Paul	TERRISSE	Prothèse Dentaire
M.	Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire
M.	Abdoul Aziz	YAM	Pathologie et Thérapeutique Dentaires
Mme	France Anne	ZOGBI	Pédodontie

ATTACHE DE FACULTE

M.	Mamadou Moustapha	GUEYE	Odontologie Préventive et Sociale
----	-------------------	-------	--------------------------------------



PROFESSEURS TITULAIRES

M.	Charles	DIAINE	Physique
M.	Humbert	GIONO-BARBER	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M.	Jean-Louis	POUSSET	Pharmacognosie
M.	Oumar	SYLLA	Pharmacie Chimique et Chimie Organique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	Issa	LO	Pharmacie Galénique
----	------	----	---------------------

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M.	Doudou	BA	Chimie Analytique
M.	Mounirou	CISS	Toxicologie
M.	Françis	LE GAILLARD	Biochimie Pharmaceutique
+ M.	Guy	MAYNART	Botanique
M.	Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
M.	Pierre	TOURE	Pharmacie Galénique

CHARGE D'ENSEIGNEMENT

M.	Alain	LAURENS	Chimie des Substances Naturelles
----	-------	---------	-------------------------------------

MAITRES - ASSISTANTS

Mme	Geneviève	BARON	Biochimie Pharmaceutique
M.	Paul	CEYZERIAT	Physique
Mme	Paulette	GIONO-BARBER	Pharmacodynamie
Mme	Urbane	TANGUY-SAVREUX	Chimie Organique et Pharmacie Chimique

+ Maître de Conférences Associé

.../...

ASSISTANTS

Mlle	Issa Bella	BAH	Parasitologie
M.	Mathias	BASHAHU	Physique Pharmaceutique
M.	Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie
M.	Ezéchiél	BISALINKUMI	Biochimie Pharmaceutique
M.	Jean-François	COOPER	Chimie Analytique
Mme	Christine	DELORME	Pharmacie Galénique
M.	Oumar	FAYE	Pharmacognosie
Mme	Michèle	FERRER	Chimie Analytique
M.	Alain	GERAULT	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Monique	HASSELMANN	Toxicologie
+ M.	Oumar	NDIR	Parasitologie
M.	Jacob	NGABA	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M.	Tharcisse	NKULINKIYE-MFURA	Chimie Analytique
M.	Mohamed Archou	TIDJANI	Pharmacologie et Pharmacodynamie
Mme	Arlette	VICTORIUS	Zoologie
M.	Mamadou Sadialiou	DIALLO	Chimie Générale et Minérale

ATTACHES

M.	Alioune	DIEYE	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Seynabou	DIOP	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M.	Modou	LO	Pharmacognosie
M.	Mamadou	NDIADE	Pharmacie chimique et Chimie Organique
M.	Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

+ Assistant-Chef de Clinique Associé

Je dédie ce travail...

A MES PARENTS,

*A ma mère, dont la présence de tous les instants, le soutien moral et l'affection ont été des atouts inestimables pour mener à bien mes études. Ce travail est aussi le sien.*

*A mon père, pour son affectueuse compréhension. Il m'a fait aimer la pharmacie et profiter de sa grande compétence dans ce domaine.*

*Pour tous les sacrifices que vous avez consentis, du fond du coeur, merci !*

A MA SOEUR AINEE,

*Pour ses conseils et encouragements, son affection et son amitié.*

A MES PETITS FRERES ET SOEURS,

*Pour vos années d'études à venir, je vous souhaite bon courage. Puissiez vous faire mieux.*

A BAIDY et MICHELE,

*Soyez assurés de mon affection.*

A MES GRANDS PARENTS,

A TOUTE MA FAMILLE, —

A TOUS MES AMIS, —

A TOUS MES CAMARADES DE PROMOTION,

AUX TECHNICIENNES DU SERVICE D'IMMUNOLOGIE DE L'INSTITUT PASTEUR  
DE LYON et particulièrement à mesdames Danièle AUCLAIR, Lina FORAS,  
Josiane VISSEYRIAS,

pour leur gentillesse et leur précieuse  
collaboration.

A Nelly CONNAN qui a bien voulu dactylographier notre thèse.

A TOUS CEUX QUI M'ONT AIDEE DANS LA REALISATION DE CE TRAVAIL.

A TOUS LES PROFESSEURS qui nous ont fait bénéficier de leurs  
enseignements durant notre scolarité à la faculté de médecine  
et de pharmacie de DAKAR.

A nos juges et maîtres

---

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HUMBERT GIONO-BARBER,

*qui nous fait le grand honneur de présider le jury de notre thèse*

*Qu'il soit assuré de notre profond respect et de nos sincères remerciements.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROFFI,

*Chef du service d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Dakar,*

*qui nous fait l'honneur de siéger au jury de notre thèse,*

*qu'il trouve ici l'expression de nos sentiments respectueux.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SAMBA DIALLO,

*En acceptant de siéger au jury de notre thèse il nous fait honneur*

*qu'il voit ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE CARRAZ,

*Directeur général de l'Institut Pasteur de Lyon et du Sud Est,*

*qui a bien voulu nous accueillir à l'Institut Pasteur de Lyon.*

*Tout au long de notre séjour à Lyon, il n'a cessé de nous encourager dans nos efforts.*

*Sa participation au jury de notre thèse nous fait honneur.*

*Qu'il trouve ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre respectueuse reconnaissance.*

A MADAME COLETTE VEYSSEYRE,

*Chef du service d'Immunologie de l'Institut  
Pasteur de Lyon et du Sud Est,  
qui nous a accueillie avec beaucoup de gentillesse  
et a dirigé ce travail.*

*Elle nous a guidée dans nos recherches, nous a  
spontanément aidée de ses remarques et critiques.  
Nous la remercions sincèrement de ses conseils  
et de sa disponibilité constante à notre égard.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde  
reconnaissance.*



" PAR DELIBERATION, LA FACULTE A ARRETE QUE LES  
OPINIONS EMISES DANS LES DISSERTATIONS QUI LUI SERONT PRESENTEES  
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS ET QU'ELLE  
N'ENTEND LEUR DONNER AUCUNE APPROBATION NI IMPROBATION "

**T**RAVAÏL EFFECTUE A

L' **I**NSTITUT **P**ASTEUR DE **L**YON

---

---

## A B R É V I A T I O N S

---

---

C'	complément
CFU	unité forme en colonies
CL	chimioluminescence
CM	centimètre
D	Diammaglobulines
DO	densité optique
G 16	Gamma I6
GNA	glomérulonéphrite aiguë
Ig	immunoglobuline
$\mu$ l	microlitre
ml	millilitre
mm <sup>3</sup>	millimètre cube
mn	minute
nm	nanomètre
nmole	nanomole
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PNN	polynucléaires neutrophiles
QSP	quantité suffisante pour
RAA	rhumatisme articulaire aigu
SD	sérum décomplémenté
SF	sérum frais
SOD	superoxyde dismutase
Trs/mn	tours par minute
TS I6	gammaglobulines du Centre de Transfusion Sanguine à I6,5%
TS 5	gammaglobulines du Centre de Transfusion Sanguine à 5%
UI	unités internationales
V	veinoglobuline

---

---

P L A N

---

---

INTRODUCTION

CHAPITRE I - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. LES STREPTOCOQUES DU GROUPE A OU Streptococcus pyogenes

- 1.1. Caractères morphologiques et culturaux
- 1.2. Structure antigénique
  - 1.2.1. Les antigènes cellulaires
  - 1.2.2. Les antigènes extracellulaires
- 1.3. Pouvoir pathogène
  - 1.3.1. Streptococcies cutanées ou muqueuses
  - 1.3.2. Streptococcémies aiguës ou septicémies
  - 1.3.3. Complications secondaires des streptococcies
- 1.4. Epidémiologie
- 1.5. Prophylaxie

2. LA PHAGOCYTOSE

- 2.1. Les cellules de la phagocytose
- 2.2. Les différentes étapes de la phagocytose
  - 2.2.1. Chimiotaxie
  - 2.2.2. Opsonisation
    - 2.2.2.1. Le système complément
    - 2.2.2.2. Les immunoglobulines
  - 2.2.3. Adhérence
  - 2.2.4. Ingestion
  - 2.2.5. Bactéricidie
    - 2.2.5.1. Augmentation du métabolisme oxydatif
    - 2.2.5.2. Dégranulation
    - 2.2.5.3. Mort et digestion des bactéries
- 2.3. Pathologie de la phagocytose
- 2.4. Méthodes d'exploration de la phagocytose
  - 2.4.1. Techniques permettant de tester la mobilité des cellules
  - 2.4.2. Mise en évidence des sites de reconnaissance
  - 2.4.3. Etude de l'ingestion
  - 2.4.4. Etude de la bactéricidie
    - 2.4.4.1. Test de destruction intracellulaire
    - 2.4.4.2. Mesure de la consommation en oxygène
    - 2.4.4.3. Dosage de la myeloperoxydase
    - 2.4.4.4. Bactéricidie
    - 2.4.4.5. Chimiluminescence
    - 2.4.4.6. Détermination de l'anion superoxyde

## CHAPITRE II - TRAVAIL PERSONNEL

### 1. INTRODUCTION

### 2. ETUDE DE L'OPSONISATION DU STREPTOCOQUE A PAR CHIMIO-LUMINESCENCE

#### 2.1. Matériel et méthode

##### 2.1.1. Matériel

##### 2.1.2. Réactifs

##### 2.1.3. Méthode

###### 2.1.3.1. Prélèvement

###### 2.1.3.2. Préparation de la suspension bactérienne

###### 2.1.3.3. Opsonisation

###### 2.1.3.4. Préparation du luminol

###### 2.1.3.5. Préparation de la suspension cellulaire

###### 2.1.3.6. Mesures

#### 2.2. Analyse des différents paramètres de la technique et optimisation

##### 2.2.1. Résultats

###### 2.2.1.1. Influence du nombre de polynucléaires neutrophiles

###### 2.2.1.2. Essai de conservation des polynucléaires dans une solution de Hanks par rapport à une solution de Krebs Ringer

###### 2.2.1.3. Influence de la température

###### 2.2.1.4. Influence de la concentration en luminol

###### 2.2.1.5. Influence du nombre de germes

###### 2.2.1.6. Influence du temps d'opsonisation

###### 2.2.1.7. Influence du complément

##### 2.2.2. Protocole retenu

##### 2.2.3. Etude de la reproductibilité de la méthode

#### 2.3. Application à l'étude de l'activité opsonisante de préparations de gammaglobulines

##### 2.3.1. Matériel et méthode

###### 2.3.1.1. Préparations d'immunoglobulines testées

###### 2.3.1.2. Souche étudiée

###### 2.3.1.3. Méthode

##### 2.3.2. Résultats

#### 2.4. Application à l'étude de la voie d'activation du complément mise en jeu dans l'opsonisation du streptocoque A.

##### 2.4.1. Matériel et méthode

###### 2.4.1.1. Chélateurs utilisés

###### 2.4.1.2. Méthode

##### 2.4.2. Résultats

### 3. ETUDE DE L'OPSONISATION DU STREPTOCOQUE A PAR LE DOSAGE DES ANIONS SUPEROXYDES

#### 3.1. Matériel et méthode

3.1.1. Appareil

3.1.2. Réactifs

3.1.3. Méthode

3.1.3.1. Préparation de la suspension bactérienne

3.1.3.2. Opsonisation

3.1.3.3. Préparation de la suspension cellulaire

3.1.3.4. Préparation de la solution de ferricytochrome C

3.1.3.5. Préparation de la solution de superoxyde dismutase

3.1.3.6. Protocole

3.1.3.7. Calculs

#### 3.2. Analyse de certains paramètres de la technique

3.2.1. Résultats

3.2.1.1. Influence du nombre de germes

3.2.1.2. Influence du nombre de polynucléaires neutrophiles

3.2.2. Protocole retenu

3.2.3. Etude de la reproductibilité

#### 3.3. Application à l'étude de l'activité opsonisante de préparations de gammaglobulines.

3.3.1. Préparations d'immunoglobulines testées

3.3.2. Méthode

3.3.3. Résultats

DISCUSSION

CONCLUSIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# INTRODUCTION

Le Streptocoque A ou Streptococcus pyogenes cause régulièrement des infections épidémiques chez l'homme.

Il se localise préférentiellement au niveau des amygdales et du pharynx. Le portage asymptomatique cutané, vaginal ou anal est beaucoup plus rare. Il se rencontre chez moins de 10% de sujets indemnes d'infection.

La plupart des sujets infectés devient par la suite des porteurs.

La pathologie de Streptococcus pyogenes est variée. Cette diversité clinique dépend, pour beaucoup, de facteurs d'hôte comme la voie d'infection, l'état d'immunité.

L'organisme humain résiste à ces infections par la mise en jeu de mécanismes de défense non spécifiques comme la phagocytose et la destruction de ces bactéries.

Ces germes sont opsonisés par les immunoglobulines et le complément avant d'être ingérés et tués par les phagocytes. L'adhérence aux phagocytes se fait par l'intermédiaire des récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines et du C<sub>3</sub>b du complément. Les bactéries acquièrent le C<sub>3</sub>b en activant soit la voie classique, soit la voie alterne.

Pour la prévention de ces infections à Streptocoque A, la vaccination n'est pas réalisable pour l'instant. D'où l'intérêt du traitement antibiotique du rhinopharynx des porteurs sains et de l'administration de préparations d'immunoglobulines polyvalentes.

L'étude que nous présentons, porte, après un bref rappel bibliographique, sur la mise au point des techniques de chimioluminescence et de dosage des anions superoxydes appliquées au Streptocoque A pour l'étude de l'activité opsonisante de différentes préparations d'immunoglobulines utilisées comme médication supplétive chez des sujets présentant des hypo ou agammaglobulinémies.



CHAPITRE I

**R**APPELS **b**IBLIOGRAPHIQUES

---

---

## 1. LES STREPTOCOQUES DU GROUPE A ou *Streptococcus pyogenes*

C'est en 1884 que ROSENBACH donne le nom de *Streptococcus pyogenes* à des cocci groupés en chainettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme.

En 1932, TODD incrimine leur responsabilité dans le rhumatisme articulaire aigu et dès 1937, un mécanisme autoimmunitaire est évoqué dans la pathogénie de cette maladie.

Le Streptocoque A se localise surtout au niveau des amygdales et du pharynx. Il est toujours pathogène indépendamment de son habitat et possède une capacité d'adhésion spécifique aux cellules épithéliales de l'hôte.

Il a été incriminé comme agent de toxoinfections alimentaires. C'est le seul agent étiologique streptococcique de la scarlatine et surtout des complications non suppuratives (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë, érythème noueux, chorée de Sydenhame).

L'activité biologique du Streptocoque A est associée à une partie de ses produits cellulaires et extracellulaires.

La protéine M est le facteur majeur de la virulence. Elle détermine l'invasion par adhérence de ses fibrilles aux surfaces des cellules épithéliales des muqueuses ou de la peau. Elle protège le Streptocoque A de la phagocytose.

### 1.1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CULTURAUX

Le Streptocoque A appartient à la famille des *Streptococcaceae* genre *Streptococcus*.

Ce sont des cocci à gram positif, ovoïdes ou sphériques. Ils sont disposés en chainettes courtes ou longues qui varient de deux à plusieurs centaines d'éléments.

Le schéma 1 représente la structure de paroi du Streptocoque A.

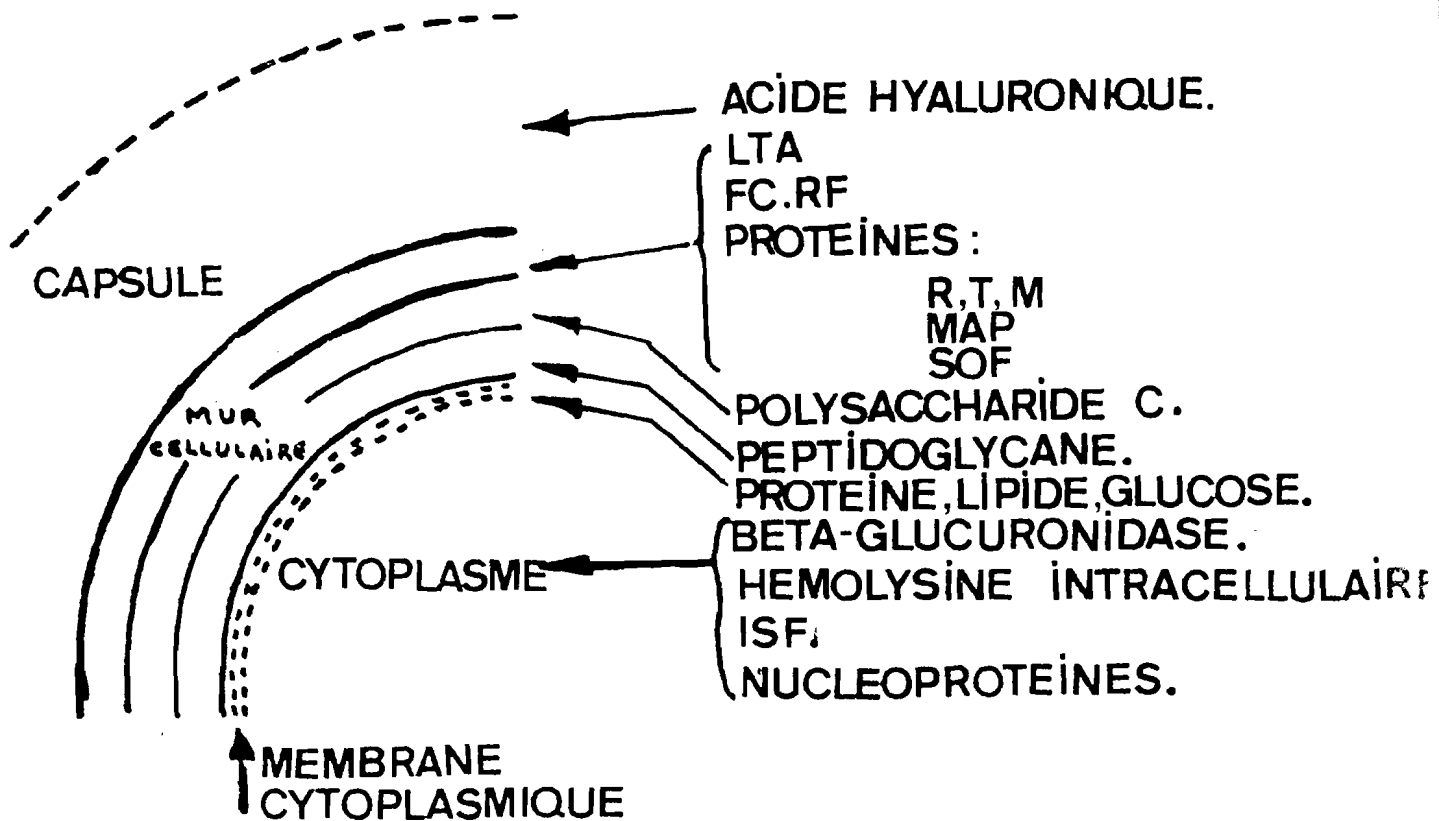


Schéma 1

STRUCTURE DE PAROI DU STREPTOCOQUE A

- LTA acide lipotéichoïque
- FcRF facteur réagissant avec le fragment Fc des immunoglobulines
- MAP protéine associée à M
- SOF facteur d'opacité du sérum
- ISF facteur immunosuppresseur

Leurs exigences nutritives sont complexes. La température de croissance se situe entre 35 - 37°C. Le pH est maintenu aux environs de 7,4.

Les milieux glucosés doivent être tamponnés car la baisse du pH du milieu (fermentation du glucose en acide lactique) est hostile au Streptocoque A.

Le Streptocoque A présente une zone claire d'hémolyse totale sur une gélose au sang.

Les principaux caractères morphologiques et d'identification du Streptocoque A sont résumés dans le tableau I.

## 1.2. STRUCTURE ANTIGENIQUE

### 1.2.1. Les antigènes cellulaires

Les cellules du Streptocoque A sont composées de substances biologiquement actives localisées surtout dans la paroi cellulaire (tableau II)

La majorité de ces substances sont antigéniques.

La protéine M est l'antigène le plus important de la paroi cellulaire du Streptocoque A.

C'est en fait un complexe d'antigènes présents uniquement en association avec la protéine M (figure 1).

La protéine M est spécifique de type. Elle est le facteur majeur de la virulence et confère une immunité durable et protectrice.

Les Streptocoques A riches en protéine M possèdent des structures dénommées fibrilles qui sont les organelles de l'attachement bactérien à la surface des cellules épithéliales des muqueuses des voies respiratoires supérieures.

Des preuves chimiques suggèrent que ces fibrilles possèdent au moins deux composantes :

. La protéine M impliquée dans la résistance à la phagocytose,

. L'acide lipotéichoïque impliqué dans le phénomène d'attachement à la cellule épithéliale (T. HORAUD, 1982).

TABLEAU I

## CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CULTURAUX DU STREPTOCOQUE A

MORPHOLOGIE	COCCI OVOIDES OU SPHERIQUES
Gram	Positif
Mode de groupement	Chainettes
Spoires	-
Capsule	+ seulement chez certaines souches en phase exponentielle de croissance
Mobilité	-
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Température de croissance	35 - 37°C
pH	7,4
Besoins nutritifs	Sang - sérum - ascite
Croissance	
sur milieux solides :	Hémolyse $\beta$ colonies opaques, bombées, surface lisse, rugueuse ou muqueuse
en milieu liquide :	culture en dépôt
Catalase	-
Oxydase	-
Réduction des nitrates	-
Métabolisme des glucides	Fermentatif

TABLEAU II

CONSTITUANTS STREPTOCOCCIQUES LIES A LA BACTERIE

CAPSULE (inconstante, cultures jeunes)	ACIDE HYALURONIQUE (polymère d'acide glucuronique N - acétylglucosamine)
PAROI	
Couche externe <i>Fimbriae</i>	Protéine M, protéine associée à M Protéines R et T Protéine à affinité pour Fc des immunoglobulines  Acide lipotéichoïque (lipide acide - glycerol téichoïque)  Hémolysine associée à la bactérie
Couche intermédiaire	Polysaccharide C (polymère de rhamnose - N - acetyl glucosamine)
Couche interne	Peptidoglycane (mucopéptide) (chaines de N - acetylglucosamine acide N - acetyl muramique reliées par des tetrapeptides)
MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	Mosaïque de constituants glucido lipido protéiques (environ 60 protéines distinctes)
CYTOPLASME	Constituants du cytosol

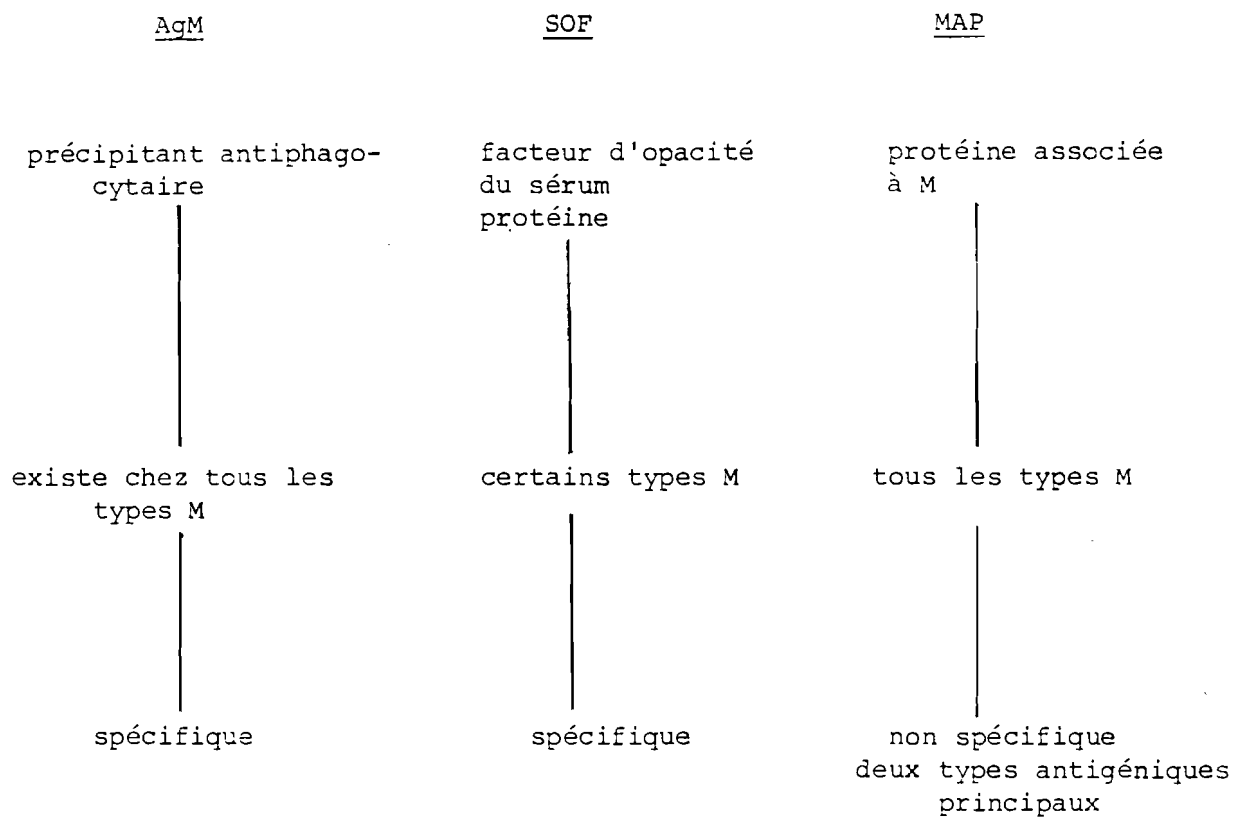


Figure 1

Complexe protéine M  
d'après MOULIN, 1983

Les anticorps dirigés contre la protéine M neutralisent l'effet antiphagocytose et entraînent une immunité spécifique de type (ROTTA, 1983).

### 1.2.2. Les antigènes extracellulaires

Les streptocoques A élaborent des antigènes extracellulaires qui stimulent la formation d'anticorps. Ces anticorps ne jouent pas de rôle dans l'immunité. Leur mise en évidence est importante seulement pour le diagnostic des infections streptococciques et de leurs séquelles.

Les antigènes extracellulaires sont nombreux : ce sont les hémolysines, les toxines érythrogènes, les nucléases, les streptokinases, la nicotinamide adénine nucléotidase, la hyaluronidase et la protéinase (figure 2).



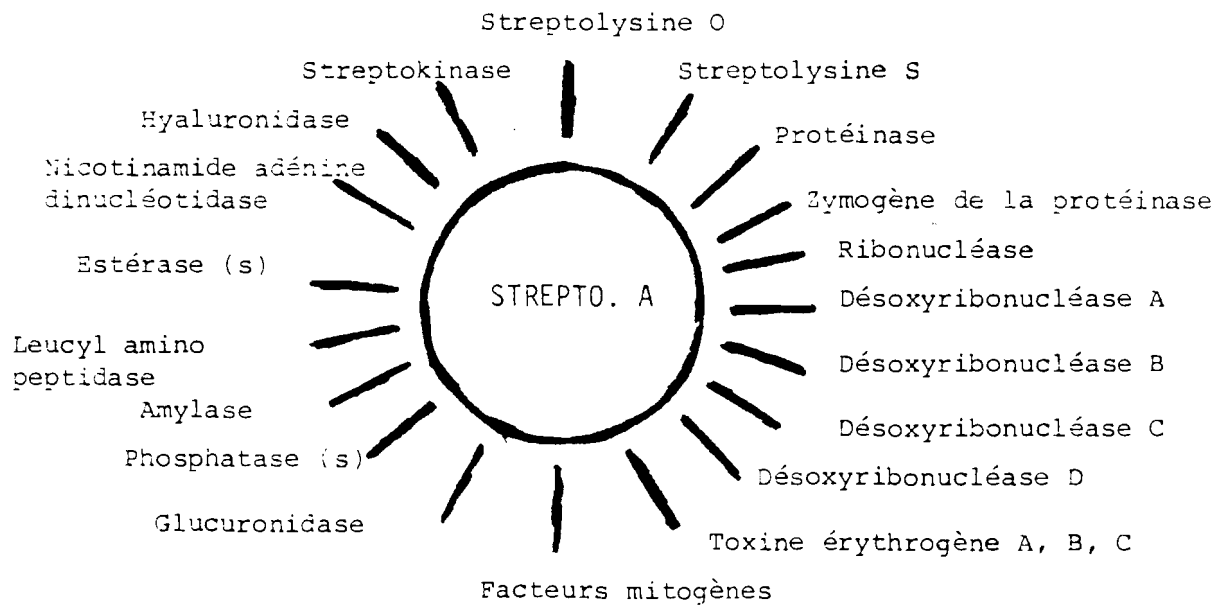


Figure 2

Composants extracellulaires libérés par les Streptocoques  
du groupe A.

### 1.3. POUVOIR PATHOGENE

La présence de Streptocoques du groupe A dans l'organisme humain a une haute signification en pathologie.

Les maladies causées par le Streptocoque A sont très nombreuses. Elles peuvent être graves par elles - mêmes ou par l'apparition secondaire des complications.

#### 1.3.1. Streptococcies cutanées ou muqueuses

- . Surinfection des plaies, des brûlures avec impétiginisation, abcès, phlegmon, lymphangite, adénites suppurées.
- . Impétigo : apparition de bulles prurigineuses, hautement contagieuses.
- . Erysipèle : dermoépidermite aiguë
- . Angines érythématopultacées : ce sont les infections streptococciques les plus fréquentes et la source du plus grand nombre de complications.
- . Scarlatine : toxiinfection.

#### 1.3.2. Streptococcémies aiguës ou septicémies

Les septicémies à Streptocoques du groupe A sont devenues plus rares depuis la diffusion des traitements antibiotiques. Elles apparaissent comme complication :

- . d'une streptococcie médicale, le plus souvent muqueuse.
- . d'une infection chirurgicale : piqûre anatomique, plaie, brûlure porte d'entrée gynécologique.

#### 1.3.3. Complications secondaires des streptococcies

Ce sont des lésions inflammatoires, articulaires, cardiaques, rénales. Les complications majeures des infections streptococciques sont réunies dans le tableau III.

TABLEAU III

## CARACTERISTIQUES ET COMPLICATIONS MAJEURES DES INFECTIONS STREPTOCOCCIQUES

d'après DERRICK et DILLON.

	RAA précédé d'une pharyngite	précédée d'une pharyngite	GNA précédée d'une pyodermite
DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE	tous climats	tous climats	tempéré, chaud et zone tropicale
SAISON	hiver	hiver	été - automne
TAUX	0,3 - 3%	variable	variable
AGE MOYEN	8 ans	8 ans	5 ans
SEROTYPE M	variable	1-3-4-12-45-49	2-49-55-57
SEROTYPE T		14/49	8/25/IMP I9 14/49, 8
ISOLEMENT	gorge	gorge	peau
ANTICORPS ELEVES	ASLO et antiDNASE B	ASO antiDNaseB antiNAdase	antiDNase B
C <sub>3</sub>		abaissé	abaissé
RISQUE D'UNE SECONDE REINFECTION	20-30%	rare	rare

RAA           rhumatisme articulaire aigu  
GNA           glomérulonéphrite aiguë  
ASLO          antistreptolysine O

Quatre complications sont à craindre :

. le bubon post angineux : il se développe rapidement. C'est une volumineuse tuméfaction ganglionnaire, habituellement unilatérale et unique.

. l'érythème noueux post streptococcique : il est rare et il s'agit d'une hypodermite nodulaire.

. la maladie inflammatoire post streptococcique dont les traductions cliniques sont :

- le rhumatisme articulaire aigu (RAA) : il survient en général dix jours après une angine. Les facteurs impliqués dans la pathogénèse du rhumatisme articulaire aigu sont donnés dans la figure 3.

Le rhumatisme articulaire aigu se manifeste en clinique par une polyarthrite aiguë fébrile et mobile. Il peut survenir une localisation cardiaque. Ce sont les complications cardiaques qui font du rhumatisme articulaire aigu une maladie redoutable.

Tous les sérotypes M peuvent être responsables du rhumatisme articulaire aigu :

- la chorée aiguë : caractérisée par une hypotonie musculaire dont l'intensité peut aller jusqu'à la paralysie.

. la glomérulonéphrite aiguë (GNA) qui survient neuf à dix jours après une angine ou une pyodermie.

Un nombre limité de types M sont associés à la glomérulonéphrite aiguë (cf tableau IV). C'est manifestement une maladie immunologique avec dépôt sur le glomérule de complexes immuns.

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIE

Les infections streptococciques posent un problème de santé publique à l'échelle mondiale.

L'homme est le réservoir naturel des streptocoques du groupe A. Ce sont les infections bactériennes humaines les plus fréquentes en zones tempérées et elles sont communes aux régions tropicales et subtropicales (J. ROTTA, 1980).

L'impétigo est hautement contagieux surtout en collectivités d'enfants, crèches, écoles, colonies de vacances.

La scarlatine a une signification particulière. Elle est produite par une toxine érythrogène. Elle peut être épidémique.

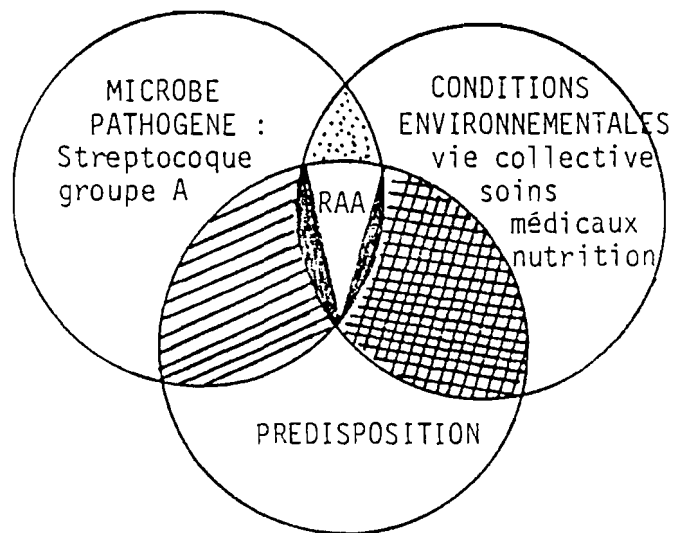


Figure 3

Facteurs impliqués dans la pathogénèse de la fièvre rhumatoïde  
d'après Elia M. AYOUB, *Circulation*, 1984, 69, 1, 197

TABLEAU IV

RELATIONS ENTRE LE TYPE DE STREPTOCOQUE A ET LES RISQUES EVOLUTIFS  
EVENTUELS.

ENTITE CLINIQUE	TYPES DE STREPTOCOQUES CONCERNES
Scarlatine	Tous les types à condition qu'ils soient parasités par un bactériophage qui induit la formation de toxine érythrogène
Rhumatisme articulaire aigu	Tous les types
Glomérulonéphrite aiguë si l'infection initiale est pharyngée	<u>12</u> , 1, 4, 18
Glomérulonéphrite aiguë si l'infection initiale est cutanée	<u>49</u> , 2, 31 .... 52, 55, 58, 60
Erysipèle	Au moins 14 types différents dont le 49
Erythème noueux	?

Elle est généralement sporadique, disséminée par des sujets atteints d'une angine streptococcique simple ou même porteurs sains. Elle est plus fréquente dans la deuxième enfance et à l'âge scolaire.

La glomérulonéphrite aiguë ne succède qu'aux infections dues à quelques types antigéniques du groupe A : le 12 est le plus fréquent et plus rarement les 1, 2, 4, 25, 49 ... Ceci explique que les glomérulonéphrites aiguës apparaissent volontiers par vagues épidémiques et qu'elles récidivent rarement chez le même sujet.

La maladie inflammatoire post streptococcique (RAA, chorée) est dominée par la notion de rechutes et récidives dont la prévention repose sur l'éradication des streptocoques A de la gorge et la prophylaxie des réinfections.

Le tableau V donne quelques caractères épidémiologiques des risques évolutifs des streptococcies du groupe A. La gravité de ces infections repose surtout sur leurs complications cardiaques.

Au Sénégal, les complications cardiaques du rhumatisme articulaire aigu occupent la deuxième place dans le groupe des maladies cardiovasculaires, après l'hypertension artérielle, aussi bien en régions urbaines que rurales (WHO Chronicle, 1980).

Nous avons trouvé les statistiques suivantes dans un Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, publié en 1978.

- . En 1960 : 21,8% des sujets hospitalisés pour maladie cardiaque  
13,22% des malades externes de cardiologie
- . En 1961 : 6,5% des admissions du département de médecine générale de Dakar.
- . En 1963 : 20% des 100 cas de dilatation cardiaque.
- . En 1969 : 25,16% des 1133 cas d'insuffisants cardiaques.
- . En 1977 : 22,79% des 4759 cas de maladies cardiaques.

Il faut noter aussi le nombre élevé d'enfants qui sont atteints.

- . Au Sénégal, 9,3% dans le groupe des 5-10 ans  
41,9% dans le groupe des 11-20 ans
- . Alors que pour l'Europe, 0,3% des enfants de 6-7 ans  
17,4% dans le groupe des 6-17 ans
- . Aux USA, 17% dans le groupe des 6-17 ans.

TABLEAU V

QUELQUES CARACTERES CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES RISQUES EVOLUTIFS DES STREPTOCOQUES (GROUPE A).

	SCARLATINE	ERYSIPELE	GLOMERULONEPHRITE AIGUE	RHUMATISME ARTIC. AIGU	ERYTHEME NOUEUX	CHOREE
AGE PREFERENTIEL	4 à 8 ans	tous âges	4 à 12 ans	enfants, adultes jeunes	enfants, adultes	enfants
POINT DE DEPART DE L'INFECTION						
PEAU	rare	+	+	0	0 (exception)	0
GORGE	+	rare	+	+	+	+
AUTRES MUQUEUSES	+	rare	0	rare	0	0
DELAI ENTRE L'INFECTION INITIALE ET LE RISQUE EVOLUTIF	1 à 2 jours	1 à 4 jours	1 à 3 semaines	2 à 4 semaines	1 à 2 semaines	1 à 6 semaines
PRESENCE DU STREPTOCOQUE DANS LES LESIONS A DISTANCE	0 sauf si septicémie associée	+	0	0	0	0
HEMOCULTURE POSITIVE (STREPTOCOQUE A)	rare	parfois	0	0	0	0
PREDISPOSITION FAMILIALE	oui	non	non	oui	non	oui
POSSIBILITES DE RECHUTES	rares	oui	très rares	oui	faibles ou nulles	rares



Des études plus récentes ont été réalisées par BERTRAND et N'DORI (1984) sur la situation épidémiologique des cardiopathies rhumatismales en Afrique.

L'étude de la prévalence des streptococcies dans la population en milieu scolaire a montré des pourcentages élevés de porteurs d'antistreptolysines : 12 à 26% au Sénégal.

Les études concernant la prévalence hospitalière montrent que les valvulopathies rhumatismales représentent 26,7% des cardiopathies.

Les facteurs socio économiques ont été invoqués pour justifier la différence actuelle de prévalence entre les pays occidentaux et les pays africains.

Il est évident que les possibilités de traitement dépendent de facteurs socio économiques, de même que la prophylaxie des rechutes. Mais ces facteurs n'expliquent pas tout, notamment la grande prédominance de l'affection en Afrique du Nord par rapport à l'Afrique de forêt.

Il conviendrait d'étudier le rôle de l'humidité et celui de la sécheresse qui favorise les rhinopharyngites, le rôle du froid et de la chaleur, de la latitude et de l'altitude.

En dehors de la géographie, on peut observer selon les régions d'Afrique des différences acquises ou génétiques facilitant ou non l'apparition d'une cardiopathie rhumatismale.

### 1.5. PROPHYLAXIE

De nos jours, on ne dispose pas de moyens pour supprimer la circulation des streptocoques du groupe A dans la population ou pour éradiquer le germe.

Vue la large prévalence de ces germes dans la population mondiale, il est irréalisable de prévenir les infections sporadiques.

Les mesures prophylactiques qui s'imposent sont les suivantes :

- . Le traitement antibiotique des malades atteints de rhumatisme articulaire aigu

. L'hygiène de la peau pour réduire les possibilités d'infections cutanées.

La vaccination n'est pas réalisable pour l'instant. Les recherches sont en cours.

La protéine M est le facteur majeur de la virulence et elle protège les streptocoques du groupe A de la phagocytose.

Le concept de la vaccination est basé sur la reconnaissance de la capacité des anticorps anti protéine M à neutraliser l'effet anti-phagocytose et à induire une immunité spécifique de type.

La multiplicité de types M constitue un obstacle majeur à cette vaccination. Et certains types sont plutôt néphritogènes, d'autres rhumatogènes.

Le vaccin devra donc être hautement purifié, polyvalent, composé d'un nombre limité de types M (ROTTA, 1983).

Une autre voie oriente la prophylaxie vers l'immunothérapie .

La prévention du rhumatisme cardiaque en Afrique est rendue difficile par les conditions socio-économiques.

o o  
o

## 2. LA PHAGOCYTOSE

L'organisme humain résiste à la pénétration et à la multiplication microbienne dans les tissus grâce à la mise en oeuvre de moyens de défense non spécifiques et spécifiques.

Ces moyens complémentaires représentent l'immunité naturelle et acquise.

Parmi les nombreux facteurs intervenant dans l'immunité naturelle, un apparaît jouer un rôle essentiel : la phagocytose des bactéries qui fut décrite pour la première fois par METCHNIKOFF en 1884.

### 2.1. LES CELLULES DE LA PHAGOCYTOSE

METCHNIKOFF est généralement considéré comme le père de la théorie phagocytaire de l'immunité.

Il reconnaît l'existence de deux types de phagocytes circulants qu'il désigne sous le nom de "microcytes" et "macrocytes" suivant la taille des cellules.

Actuellement, on fait correspondre à ces cellules respectivement les polynucléaires et les monocytes suivant leur configuration nucléaire. (METCHNIKOFF, 1968).

Les monocytes sont les précurseurs des macrophages fixant les tissus qui constituent le système réticulo-endothélial (VAN FURTH, 1970). Les macrophages sont associés en permanence aux phagocytes puisqu'ils préparent l'antigène, le rendant plus immunogène et le présentent aux lymphocytes. Ils possèdent des fonctions sécrétrices importantes induisant une étroite coopération entre les différents systèmes de défense de l'organisme.

Les polynucléaires représentent environ 60 à 70% des leucocytes circulants et peuvent être subdivisés en trois groupes suivant leur coloration : les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles.

Les éosinophiles et les basophiles contribuent très peu aux mécanismes de défense de l'hôte contre les bactéries (FINCH, 1972).

Les polynucléaires neutrophiles sont le marqueur du processus inflammatoire aigu (REBUCK, 1955). Le noyau des neutrophiles est polylobé et renferme des granulations très fines, nombreuses, colorées en beige par le May Grünwald Giemsa. Les caractéristiques de ces granulations sont résumées dans le tableau VI.

Les neutrophiles sont des cellules mobiles, déformables, attirées par des substances dites chimiotactiques libérées dans les foyers inflammatoires. Leur membrane cytoplasmique porte deux types de récepteurs : des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines; des récepteurs pour les composants  $C_3$  et  $C_5$  du système complément.

## 2.2. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PHAGOCYTOSE

La phagocytose se décompose en différents stades : la chimiotaxie, l'opsonisation, l'adhérence et l'ingestion, la bactéricidie.

### 2.2.1. Chimiotaxie

La chimiotaxie ou chimiotactisme est une migration du polynucléaire vers une substance chimique attractante, soumise à un gradient de concentration.

Ce phénomène fut mis en évidence in vitro par KELLER et ses collaborateurs en 1977. In vivo, il se traduit par l'accumulation des polynucléaires au site de l'inflammation.

La chimiotaxie des polynucléaires fait appel à des facteurs cellulaires et extracellulaires.

Un grand nombre de substances possèdent une activité chimiotactique. On distingue :

- les substances qui attirent directement les neutrophiles ou cytotoxines. Ce sont le fragment  $C_5a$  du complément, les fibrinopeptides, la kallicréine, les prostaglandines, la caséine, certains oligopeptides et des facteurs produits par les bactéries.

TABLEAU VI

## CARACTERISTIQUES DES GRANULATIONS DES NEUTROPHILES

(d'après PICARD C., 1985)

TYPE DE GRANULATION	Primaire Azurophile	Secondaire Spécifique
ORIGINE	Surface concave de l'appareil de Golgi  Stade promyélocyte	Surface convexe de l'appareil de Golgi  Stade myélocyte
CONTENU	Myéloperoxydase Lysosyme $\beta$ glucuronidase  Hydrolases acides Elastase Mucosubstances acides. $C_5a$ inhibiteurs  Protéines catio- niques antibac- tériennes	Lactoferrine Lysosyme Substances clivan- tes $C_3$  Collagénase
pH OPTIMUM	5,5 - 6,5	7 - 7,5
DEGRANULATION	Tardive  >50% dans le phagosome	Précoce  >90% exocytose
FONCTION	Agent antimicrobien Digestion	Processus inflam- matoire

- des substances qui ne sont pas directement chimiotactiques mais peuvent secondairement agir comme agents chimiotactiques en produisant la formation de facteurs chimiotactiques. Ce sont des substances comme le complexe antigène - anticorps, l'endotoxine ou le zymosan. Elles correspondent aux cytotaxigènes.

Les polynucléaires utilisent des récepteurs membranaires pour reconnaître les substances chimiotactiques.

Suivant la reconnaissance membranaire, il y a des échanges d'électrolytes avec entrée de  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Na}^+$  et dépolarisation de la membrane.

Cette augmentation du  $\text{Ca}^{++}$  intracytoplasmique va activer une phospholipase qui, par la voie de la lipooxygénase, induit la formation d'agents chimio attractants.

### 2.2.2. Opsonisation

Les neutrophiles peuvent ingérer une grande variété de matériel : sphères de polystyrène, bactéries (LEHRER, 1973), immuncomplexes (MICHELL, 1969), etc...

Toutes les bactéries ne sont pas sensibles de la même façon à la phagocytose. Les neutrophiles ont des difficultés à ingérer des bactéries encapsulées (FOLEY, 1959, RABINOVITCH, 1968).

Au cours de leur évolution, de nombreuses bactéries ont acquis des propriétés de surface les rendant moins sensibles à la reconnaissance phagocytaire et à l'attachement.

Pour s'opposer à ces propriétés, les organismes évolués développent des facteurs sériques, appelés "opsonines" par WRIGHT et DOUGLAS en 1903, qui s'attachent aux bactéries et les rendent sensibles à la phagocytose. On connaît deux groupes d'opsonines :

. Les opsonines thermolabiles, non spécifiques, qui sont inactivées par la chaleur à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes et dérivent du complément.

. Les opsonines thermostables, spécifiques, provenant de sérums de sujets préalablement mis au contact de bactéries (immunsérum) (MUDD, 1934)

### 2.2.2.1. Le système complément

Les premières observations datent de 1888. NUTALL remarque que le sang défibriné entraîne la mort de certaines bactéries. Le complément se définit comme un complexe sérique, plasmatique, capable de mettre en jeu les défenses de l'organisme.

Le complément provoque des modifications des propriétés de surface des bactéries et ces lésions favorisent la captation des germes par les phagocytes.

On distingue deux voies d'activation du complément (figure 4 et schéma 2) :

#### . la voie classique

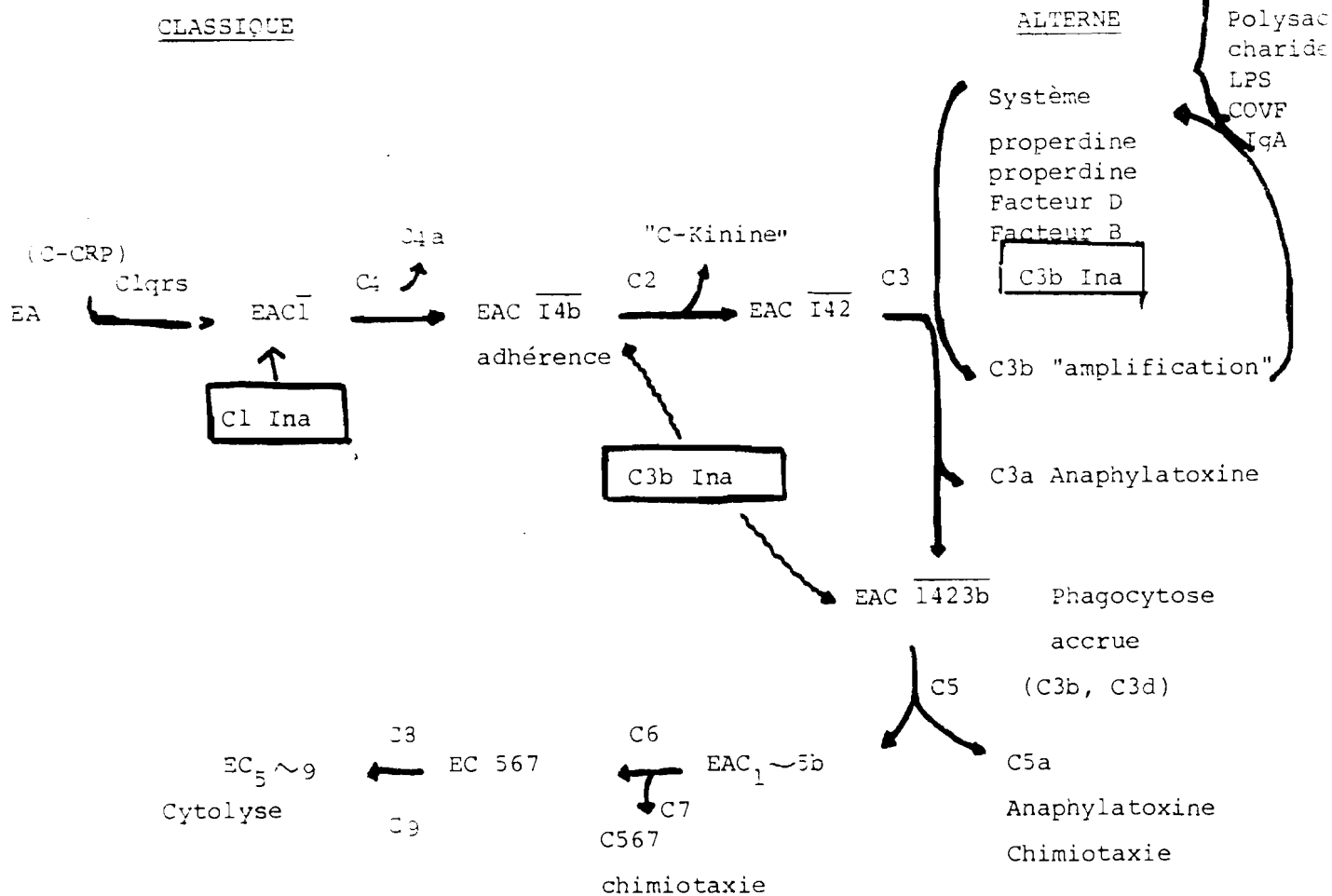
C'est la voie immunologique. Les activateurs de cette voie sont : le complexe antigène - anticorps (IgM ou IgG sauf IgG<sub>4</sub>), les IgM ou IgG agrégées, le DNA, le facteur XII de la coagulation, certaines membranes virales ou bactériennes, la trypsine, la plasmine, la cathepsine, la thrombine.

Le complément activé par la voie classique est capable d'opsoniser les bactéries (GIGLI, 1968, JOHNSTON, 1969). L'opsonisation requiert la présence des fragments C<sub>1</sub> C<sub>4</sub> C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> (GIGLI, 1968).

#### . la voie alterne

C'est une voie immunologique, découverte par PILLEMER en 1953. Les activateurs de la voie alterne sont les IgA, IgE, les endotoxines des bacilles à Gram négatif, l'inuline, le zymosan, les parois de levures.

Certaines bactéries sont opsonisées par du sérum déficient en anticorps ou par les fragments C<sub>1</sub> , C<sub>4</sub> , C<sub>2</sub> du complément. Ainsi, l'opsonisation peut se faire par l'activation du complément par voie alterne ou système properdine (BJORNSON, 1973, JASIN, 1972). La figure 5 résume le rôle du complément dans la défense contre l'infection.



E érythrocyte (ou autre antigène) 'A' anticorps

A anticorps

C-CRP carbohydrate C reactive protein

C1 ou C3b Ina C1 ou C3b inactivateur

LPS lipopolysaccharide bactérien

COVF cobra venom factor

Figure 4

Séquence d'activation du complément par la voie classique et interaction avec le système properdine (d'après JOHNSTON et STROUD, 1977).



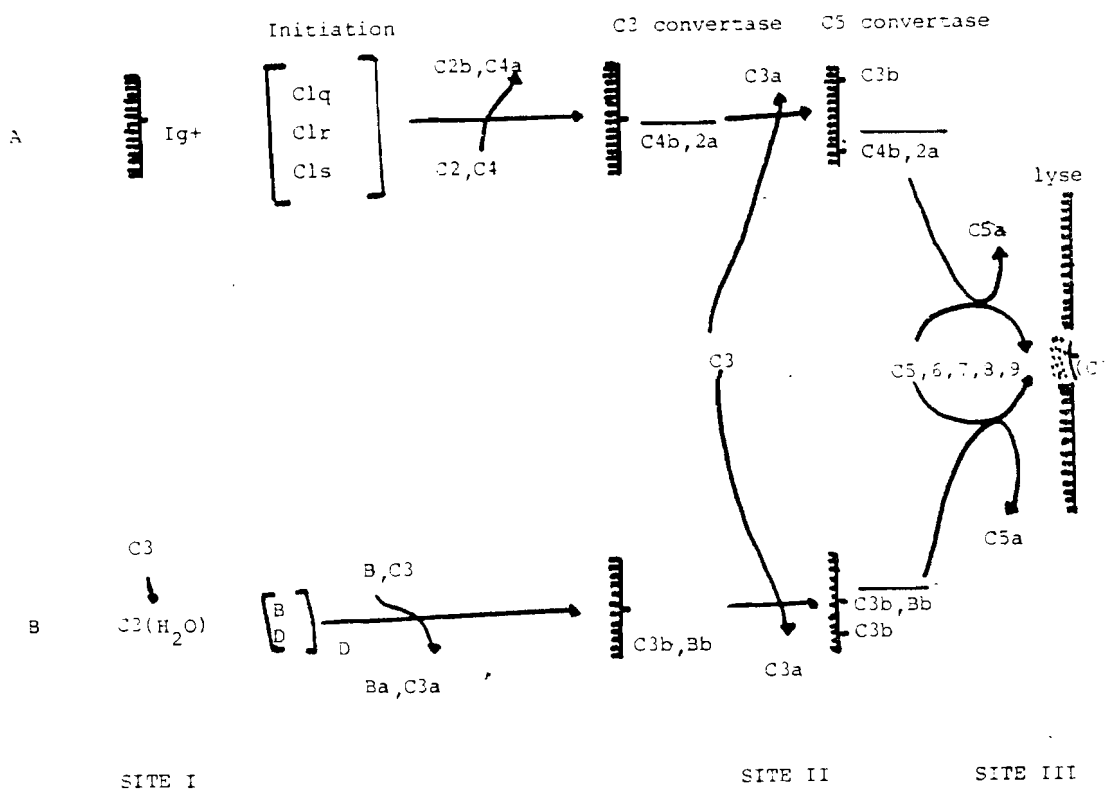


Schéma 2

Schéma général du système du complément

A : VOIE CLASSIQUE D'ACTIVATION

B : VOIE ALTERNE

(Adaptation du schéma proposé par ESSER, 1982).

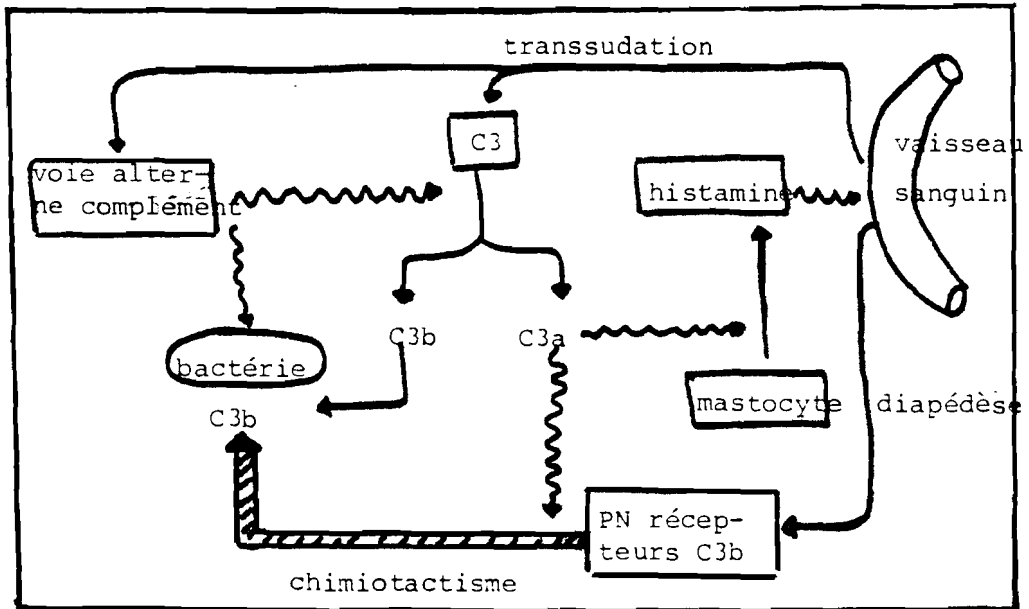


Figure 5

Rôle du complément dans la défense contre l'infection

Conséquences de l'activation de la voie alterne par une bactérie

Le C5a est aussi chimiotactique et les composants terminaux

C8 et C9 peuvent être lytiques.

#### 2.2.2.2. Les immunoglobulines

En plus de leur aptitude à initier l'activation du complément par la voie classique, les immunoglobulines peuvent exercer une activité opsonisante (STOSSEL, 1974).

Le fragment Fc de la molécule anticorps se lie au phagocyte tandis que le fragment Fab se fixe spécifiquement aux bactéries contre lesquelles l'anticorps est dirigé.

Les récepteurs pour les IgG sur la cellule semblent être différents des sites de fixation du fragment C<sub>3</sub> opsonisant (STOSSEL, 1974).

#### 2.2.3. Adhérence

C'est une condition indispensable à l'ingestion de la bactérie (STOSSEL, 1974).

L'attachement de la bactérie au polynucléaire sert probablement de fonction de reconnaissance mais aussi de "mécanisme déclencheur" pour démontrer les phénomènes biochimiques qui accompagnent la phagocytose et la destruction des bactéries (GOLDSTEIN, 1975, 1976).

Le fragment C<sub>3b</sub> du complément joue un rôle dans l'immune adhérence.

#### 2.2.4. Ingestion

Aussitôt après l'attachement des bactéries au neutrophile, le phagocyte étend ses pseudopodes autour de la particule pour l'englober et former la vésicule phagocytaire.

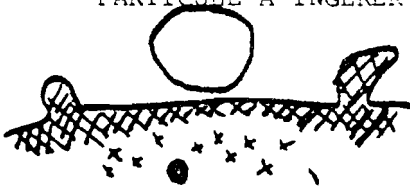
Ce processus a été mis en évidence par la microscopie électronique (TANAKA, 1972).

La figure 6 donne le modèle de phagocytose proposé par YIN et STOSSEL en 1982.

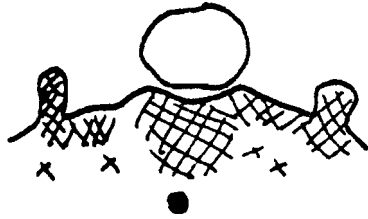
#### 2.2.5. Bactéricidie

La destruction des bactéries dépend aussi bien des altérations du métabolisme oxydatif de la cellule que de la dégranulation des constituants lysosomiaux dans la vacuole phagocytaire.

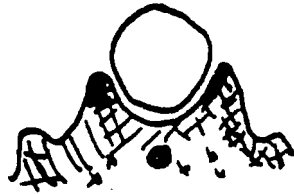
MEMBRANE DU PHAGOCYTE



RECONNAISSANCE MEMBRANAIRE



ADHERENCE



LE PHAGOCYTE ETEND SES PSEUDOPODES AUTOUR DE LA PARTICULE POUR L'ENGLOBER



FORMATION DE LA VESICULE DE PHAGOCYTOSE



INGESTION

Figure 6

Modèle de mécanisme de la phagocytose (d'après Helen L. YIN et Thomas E. STOSSEL, Academic Press Inc., 20, 1982).

Il y a plusieurs facteurs en rapport avec l'activité bactéricide :

- . les altérations du métabolisme oxydatif
- . la dégranulation
- . la mort et la digestion des bactéries

#### 2.2.5.1. Augmentation du métabolisme oxydatif

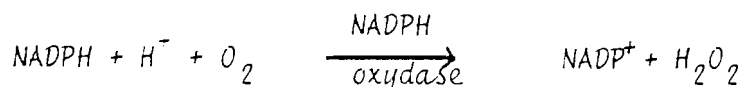
BALDRIDGE et GERARD montrent, en 1933, que l'ingestion des particules provoque une augmentation de la consommation en oxygène des polynucléaires.

Cette augmentation du métabolisme oxydatif, encore appelée "burst" (explosion) respiratoire, a été confirmée par les travaux de SBARRA et KARNOVSKY en 1959.

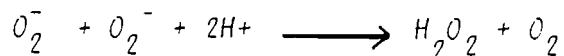
BABIOR et ses collaborateurs (1973, 1974) ont montré que les neutrophiles phagocytants produisent des anions superoxydes ( $O_2^-$ ). De nombreux travaux ont été effectués pour définir le ou les enzymes responsables de l'initiation du "burst" respiratoire.

A l'heure actuelle, il semble qu'on ait admis l'existence d'une pyridine nucléotide oxydase réduite qui utiliserait le NADPH :

La réaction déclenchant l'explosion respiratoire serait la suivante :



$H_2O_2$  est probablement produite par dismutation d' $O_2^-$  suivant la réaction :



#### 2.2.5.2. Dégranulation

Les travaux de LEFFEL et SPITZNAGEL en 1975 sont en faveur d'une dégranulation séquentielle :

- . Les granules spécifiques dégranulent rapidement avant que la vacuole phagocytaire ne se referme.
- . Les granules azurophiles vont dégranuler après.

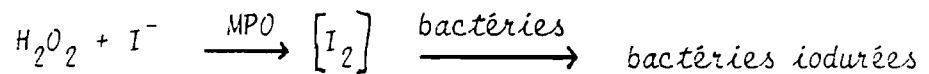
### 2.2.5.3. Mort et digestion des bactéries

Plusieurs mécanismes ont été invoqués pour expliquer l'activité bactéricide du neutrophile.

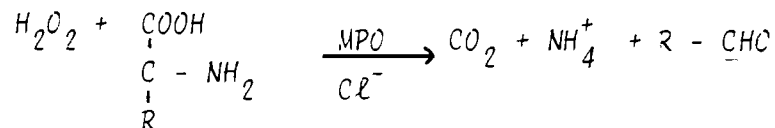
#### . Mécanismes nécessitant la production d' $H_2O_2$

- certains impliquent la myeloperoxydase (MPO) de la cellule. Les halogènes de la cellule ( $F^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ ,  $I^-$ ) vont réagir avec  $H_2O_2$ .

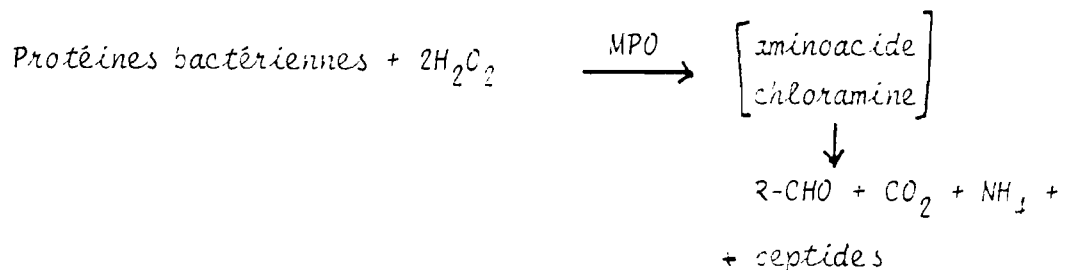
#### . Ioduration



#### . Formation d'aldéhyde



#### . Clivage du peptide



A ce niveau, il y a atteint la paroi bactérienne.

- d'autres sont indépendants de la MPO :

#### . L'ascorbate

Il est présent dans le neutrophile (DE CHATELET, 1974). L'association ascorbate +  $H_2O_2$  est bactéricide (MILLER, 1969).

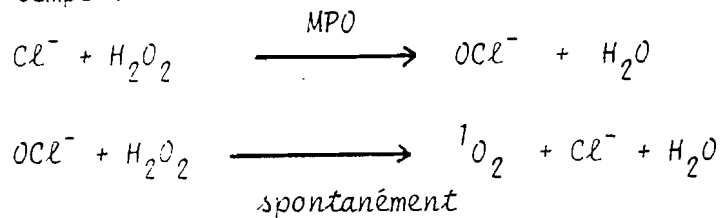
.../...

. Les ions métalliques lourds (exemple :  $\text{Cu}^{++}$ )

DRATH et KARNOWSKY en 1974 ont montré leur activité bactéricide.

. Mécanismes nécessitant des radicaux libres d' $\text{O}_2$

BABIOR a démontré la production de superoxyde pendant la phagocytose. Il semble que l'atome d' $\text{O}_2$  soit produit en deux temps :



$\text{H}_2\text{O}_2$  exercerait une action bactéricide avec ou sans MPO, plus que le superoxyde.

. Mécanismes indépendants de l'oxygène

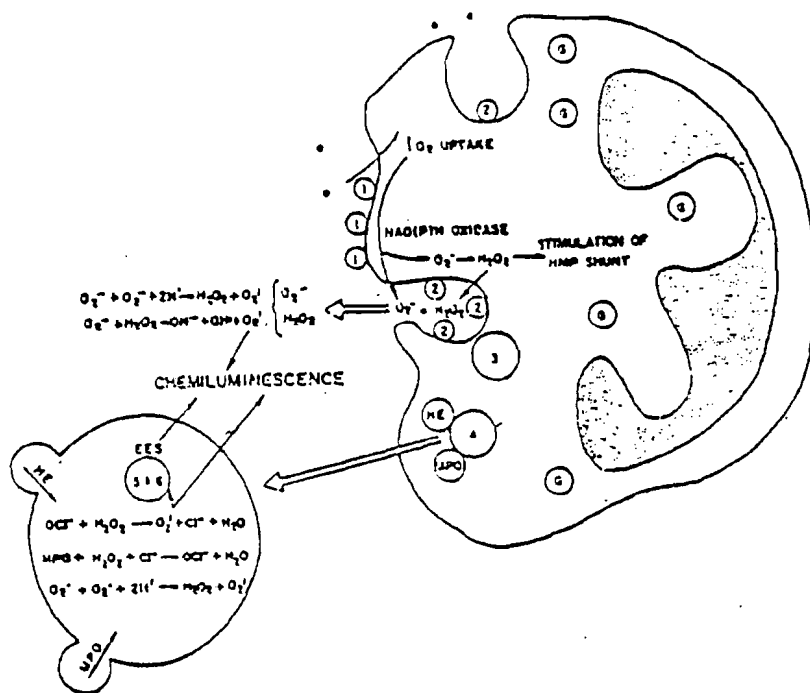
Ils reposent sur la dégranulation.

La diminution du pH dans la vacuole phagocytaire joue un rôle bactériostatique jusqu'à ce que les autres mécanismes de destruction entrent en jeu.

De nombreuses substances antibactériennes ont été découvertes dans le neutrophile. Parmi ces substances,

- . Le lysozyme dont le substrat est le peptidoglycane du mur cellulaire des bactéries.
- . La lactoferrine qui est surtout bactériostatique. Son activité bactéricide dépend de ses propriétés de chélateur. Elle se perd lorsque la molécule est saturée.
- . Les enzymes hydrolytiques dont les fonctions sont mal connues (protéases, estérases, protéines cationiques humaines).

TRUSH a proposé en 1978 une représentation schématique du mécanisme et des processus métaboliques se produisant au cours de la phagocytose par les polynucléaires, de particules opsonisées (figure 7).



- . particules opsonisées
  - 1 reconnaissance et liaison des particules
  - 2 invagination de la membrane et phagocytose
  - 3 formation du phagosome
  - 4 dégranulation et formation du phagolysosome
  - 5 bactérie
  - 6 digestion
  - G granules
- MPO myeloperoxydase  
HE enzymes hydrolytiques  
EES états électroniques excités

Figure 7

Représentation schématique du mécanisme et des processus métaboliques se produisant au cours de la phagocytose par les polynucléaires de particules opsonisées (TRUSH et al., 1978).



### 2.3. PATHOLOGIE DE LA PHAGOCYTOSE

Elle se rencontre chez les malades présentant le plus souvent des infections à répétition, qu'elles soient génétiques ou induites. Ces infections bactériennes à répétition sont très souvent à streptocoques du groupe A.

On décrit des maladies liées à un hypercatabolisme de  $C_3$  (déficit en  $C_3$  activateur) ou un déficit en  $IgG_3$  qui intervient dans la phagocytose.

Les anomalies de la phagocytose, les plus fréquentes, s'observent dans :

#### - la granulomatose chronique

Elle est liée au sexe et touche essentiellement les enfants de sexe masculin de plus de deux ans. Cette maladie se traduit par des infections multiples à localisations diverses : cutanée, muqueuse et viscérale. Il y a un défaut dans la bactéricidie et dans la production de l'explosion respiratoire. La chimiotaxie est normale. La détection se fait par le test au nitrobleu tétrazolium ou par la chimioluminescence.

#### - la maladie de CHEDIAK et HIGASHI

Elle est liée à un désordre dans la formation des granules lysosomiaux. Elle affecte la production d'hydrolase acide. Les bactéries sont ingérées mais pas digérées.

#### - la drépanocytose

Il y a une diminution des opsonines non spécifiques, thermolabiles, se traduisant par un déficit d'ingestion lié à une anomalie de la voie alterne du complément. Il y a en plus un déficit en "tuftsin", facteur régulateur de la phagocytose.

#### - la maladie de HODGKIN

Le myelome à  $IgA$ , les hémopathies, le diabète, l'insuffisance rénale, chez les dialysés et transplantés chez qui l'on constate une diminution du chimiotactisme.

#### - le lupus érythémateux disséminé (LED)

Il provoque un déficit dans l'opsonisation.

Nous ne pouvons pas parler de la pathologie de la phagocytose des streptocoques du groupe A sans noter le rôle de la protéine M. La protéine M protège les streptocoques du groupe A de la phagocytose.

TYLEWSKA et HRYNIEWICZ (1979) ont montré que l'inhibition de la phagocytose peut être liée à une inhibition des activités enzymatiques dans les phagocytes. En effet, les souches M+ provoquent une diminution de la déshydrogénase lactique et de l'activité ATPasique. Elles présentent aussi une activité antichimiotactique.

Il semble également que la protéine M ait un effet cytotoxique sur les cellules phagocytaires (BEACHEY, 1971, 1973).

CHRISTENSEN a montré que les souches M+ fixent à leur surface des IgG mais la réaction n'est pas immunologique puisque l'interaction des bactéries se fait par le fragment Fc de l'immunoglobuline. Ce qui rendrait ces bactéries moins "reconnaissables" par les phagocytes et les empêcherait d'être phagocytées.

La protéine M peut inhiber l'activation du complément (FORSGREN et QUIE, 1974).

La fixation du fragment Fc des IgG à la surface de la bactérie peut probablement bloquer le récepteur pour le complément sur l'immunoglobuline.

Plus récemment, en 1983, FISCHETTI a montré que les fragments  $F(ab')_2$  ont la capacité d'augmenter l'activité opsonisante de faibles concentrations d'IgG opsonisantes.

La protéine M fonctionnerait comme un inhibiteur actif de la phagocytose et les fragments  $F(ab')_2$  des IgG opsonisantes auraient la capacité de neutraliser les déterminants "actifs" de la molécule de protéine M.

## 2.4. METHODES D'EXPLORATION DE LA PHAGOCYTOSE

Ces techniques se font surtout sur les polynucléaires neutrophiles.

### 2.4.1. Techniques permettant de tester la mobilité des cellules

#### . Technique de REBUCH

On réalise une fenêtre cutanée. Les cellules qui arrivent dans l'exsudat sont prélevées. On mesure leur pourcentage et la rapidité d'arrivée.

. Technique de migration sous gélose d'une suspension leucocytaire en présence de gammaglobulines agrégées.

2.4.2. Mise en évidence des sites de reconnaissance des Immunoglobulines G<sub>1</sub> ou IgG<sub>3</sub> par fixation sur des globules rouges ou le fragment C<sub>3</sub>

#### 2.4.3. Etude de l'ingestion

Elle peut se faire qualitativement ou semi quantitativement après examen microscopique du processus phagocytaire mais les causes d'erreur sont grandes.

Elle se fait surtout quantitativement par :

- . la mesure de l'augmentation de la consommation en glucose (FAURE, 1978).
- . la mesure spectrophotométrique d'éléments lipidiques colorés après extraction des cellules (technique de l'huile rouge selon STOSSEL , 1975).

#### 2.4.4. Etude de la bactéricidie

2.4.4.1. Test de destruction intracellulaire ou test au nitro bleu tétrazolium (NBT).

C'est un test colorimétrique basé sur la réduction du NBT qui est liée à l'explosion respiratoire.

La suspension bactérienne, en présence de NBT, est mise en contact avec l'immun sérum. Après addition de la suspension de polynucléaires neutrophiles, le NBT jaune est réduit en un complexe bleu foncé. Cette coloration, proportionnelle à la quantité de bactéries ingérées, est extraite par la pyridine et mesurée à 515 nm (RAICHVARG et AGNERAY, 1979).

Ce test est spécifique du diagnostic des maladies granulomateuses chroniques.

#### 2.4.4.2. Mesure de la consommation en oxygène

Elle utilise l'électrode de CLARCK qui évalue la diminution de la pression en oxygène dans le milieu.

#### 2.4.4.3. Dosage de la myeloperoxydase (MPO)

Il se fait par spectrophotométrie après coloration à l'orthodianisidine.

#### 2.4.4.4. Bactéricidie

Différentes suspensions bactériennes sont mises à incuber avec les polynucléaires neutrophiles après opsonisation. Après la lyse des polynucléaires neutrophiles, on apprécie la quantité de bactéries intracellulaires restées vivantes par repiquage sur milieu de culture (FAURE, 1978).

#### 2.4.4.5. Chimioluminescence

En 1972, le test de chimioluminescence a été proposé par ALLEN. Lors de l'ingestion de bactéries par les polynucléaires neutrophiles, il se produit une explosion respiratoire qui fournit des espèces oxygénées à l'état excité : anion  $O_2^-$ , peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl et singlet oxygène. Le retour à l'état stable, dans le cas du singlet oxygène, fournit une énergie lumineuse.

L'intensité de la chimioluminescence est proportionnelle au taux de radicaux oxygènes libres, peroxyde d'hydrogène, anion superoxyde et radicaux hydroxyl produits au cours de la phagocytose.

Ces métabolites sont essentiels pour assurer la destruction bactérienne et on admet que la chimioluminescence émise est le reflet de la destruction bactérienne par les polynucléaires neutrophiles. Elle permet d'étudier l'activité opsonisante spécifique (anticorps) et non spécifique (complément) (HEMMING, 1976, STEVENS et YOUNG, 1977, WILSON, 1977).

La technique est rendue sensible par l'emploi de luminol comme amplificateur de la réaction.

Le luminol ou hydrazide 5 - amino 2 - 3 dihydro 1-4, phtalazinedione est oxydé par les espèces oxygénées réactives produites pendant la phagocytose. QUIE et ses collaborateurs ont proposé des mécanismes d'oxydation du luminol en chimioluminescence (figure 8).

Le luminol permet de réduire le volume sanguin initial (WILSON, 1978).

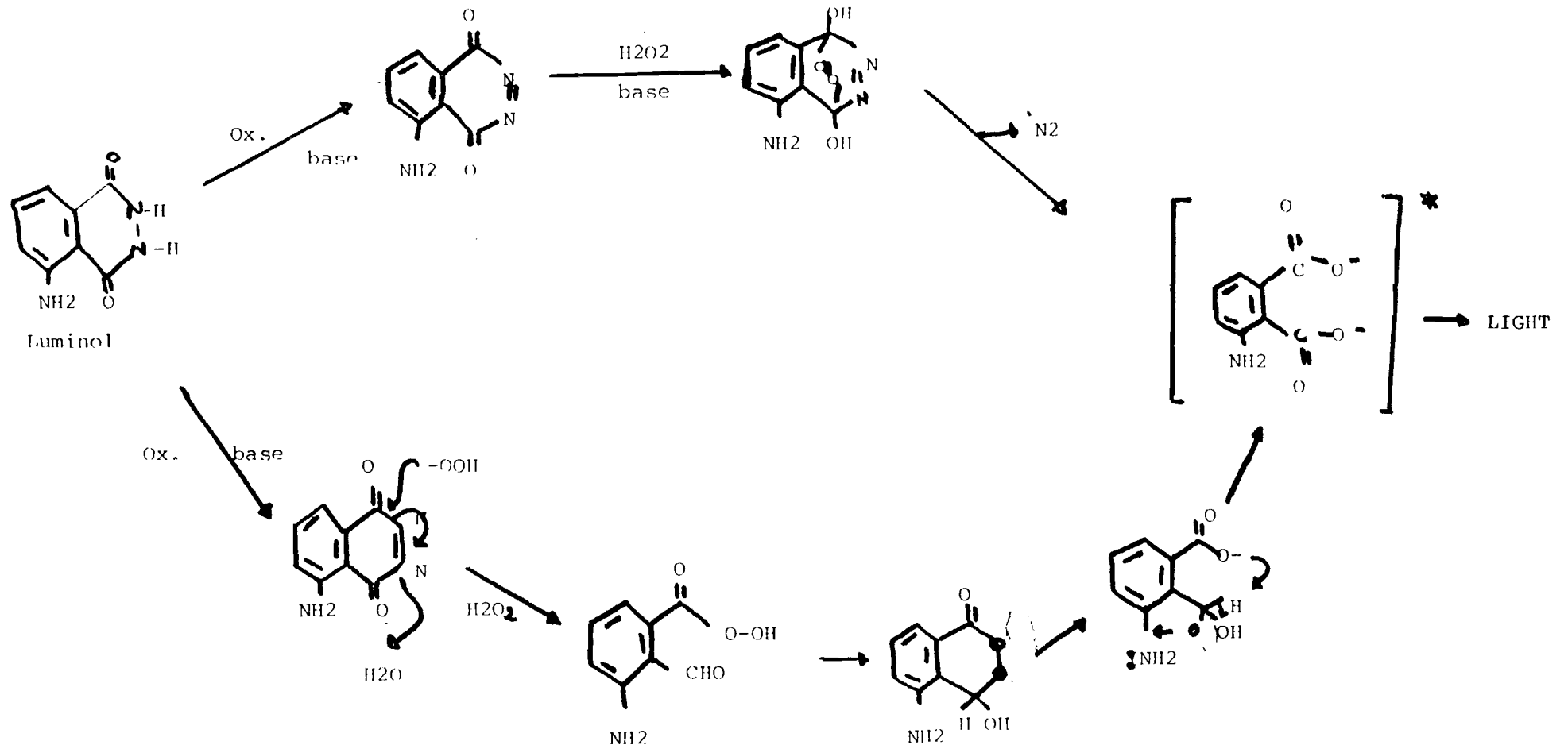


Figure 8

Mécanismes possibles pour l'oxydation du luminol en chimioluminescence  
(d'après P.Q. QUIE et collab.)

#### 2.4.4.6. Détermination de l'anion superoxyde $O_2^-$

L'explosion respiratoire débute quand l'interaction entre les dérivés oxygénés actifs et des substrats présents dans la cellule, induit l'activation d'une oxydase cellulaire.

Cette oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en  $O_2^-$  (BABIOR, 1982).



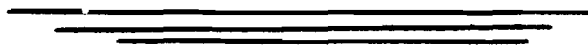
La majorité des  $O_2^-$  produits pendant l'explosion respiratoire est transformée en  $H_2O_2$  (WEENING, 1975, ROOT, 1977).

La NADPH oxydase, enzyme responsable de la réduction de  $O_2$  en  $O_2^-$  est localisée sur la membrane plasmique des neutrophiles (DEWALD, 1979).

La détermination de l'anion  $O_2^-$  est quantifiée par la réduction du ferricytochrome C.

Cette réaction est inhibée en présence de superoxyde dismutase (SOD) qui détruit l'ion superoxyde en catalysant sa conversion en oxygène et en peroxyde d'hydrogène.

## CHAPITRE II

**T**RAVAIL **p**ERSONNEL

## 1. INTRODUCTION

Dans la première partie de notre travail, nous mettrons au point une technique de chimioluminescence adaptée au Streptocoque de groupe A pour l'étude de l'activité opsonisante de différentes préparations d'immunoglobulines et pour l'étude de la voie d'activation du complément mise en jeu dans l'opsonisation.

Dans une seconde partie, nous adapterons une technique de dosage des anions superoxydes à l'étude de l'activité opsonisante des préparations d'immunoglobulines testées en chimioluminescence.

°            °  
°



## 2. ETUDE DE L'OPSONISATION DU STREPTOCOQUE A PAR CHIMIO-LUMINESCENCE

### 2.1. MATERIEL ET METHODE

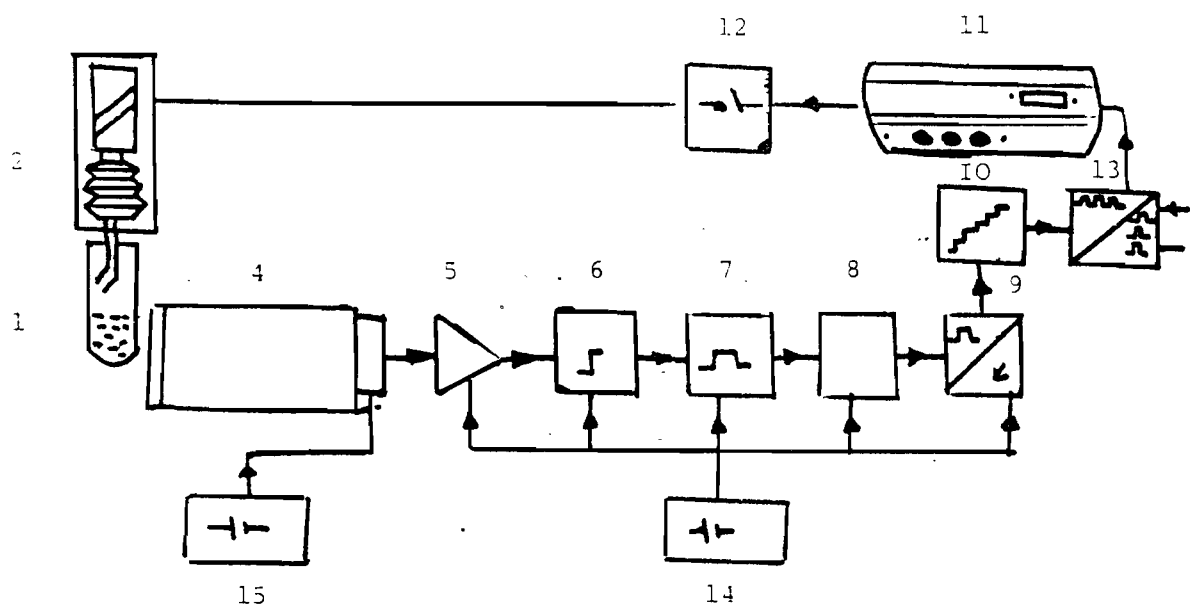
#### 2.1.1. Matériel

- . tubes coniques de 50 ml stériles type "Corning"
- . tubes de 5 ml stériles
- . pipettes à usage unique de 10, 5, 2 et 1 ml
- . centrifugeuse type Beckman modèle TJ-6
- . centrifugeuse type Jouan GR 2000 SX
- . spectrophotomètre Vitatron, lecture à 550 nm
- . cellules de Thoma
- . étuve à 37°C Meinmert
- . bain marie à 37°C avec agitation
- . bain marie à 56°C
- . microscope Dialux 20 EB avec objectif 40 Leitz
- . tubes pour chimioluminescence Sempa Chimie
- . enregistreur Linear 120C
- . appareil de chimioluminescence Lumac/3 M Biocounter M 2010 (figure 9).

#### 2.1.2. Réactifs

- . Dextran 500 (Pharmacia) à 2% dans du sérum physiologique
- . solution de chlorure de sodium à 0,2%
  - à 1,61%
  - à 9‰
- . tampon Krebs Ringer

NaCl	0,154 M	100 ml
KCl	0,154 M	4 ml
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,11 M	3 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,154 M	1 ml



- |                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| 1. cuve de mesure      | 9. sortie analogique          |
| 2. système d'injection | 10. compteur                  |
| 3. détecteur           | 11. cadran                    |
| 4. photomultiplicateur | 12. contrôle de l'injection   |
| 5. amplificateur       | 13. interphase                |
| 6. discriminateur      | 14. alimentation principale   |
| 7. transformateur      | 15. alimentation haut voltage |
| 8. diviseur            |                               |

La cuvette de mesure (1) contient l'échantillon à doser. Le photomultiplicateur (4) reçoit les photons émis et produit des pulsions proportionnelles à l'intensité lumineuse. Ces pulsations sont amplifiées (5). Les émissions parasites provenant des dynodes sont traitées par un discriminateur (6). Les pulsions sont ensuite transformées en signal exploitable (7) dont l'intensité est divisée par un facteur 100 (8). L'exploitation de ce signal peut se faire directement par la sortie analogique ou bien être traitée avant affichage sur l'appareil (10).

Figure 9

Schéma et principe de fonctionnement de l'appareil de chimioluminescence.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,154 M	1 ml
---	---------	------

. tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)

10 ml de tampon phosphate pH 7,4 1M dans un litre de sérum physiologique.

tampon phosphate

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,9 g
KCl	0,2 g
$\text{H}_2\text{O}$ QSP	1000 ml

. solution de Hanks (Institut Pasteur Production)

NaCl	8000 mg/l
KCl	400 mg/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	60 mg/l
glucose	1000 mg/l
$\text{CaCl}_2$	140 mg/l
$\text{NaHCO}_3$	350 mg/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

. Luminol Sigma dissout dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de  $2,10^{-2}$  M et stocké à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'emploi.

. Complément de cobaye BioMérieux constitué d'un pool de sérums de cobayes mâles à jeun.

. Liquide de Turck

Violet de gentiane	2 ml
Acide acétique	1 ml
Eau distillée QSP	200 ml

- . Gélose au sang frais de cheval (Institut Pasteur Production)
- . Milieu de Todd Hewitt (Institut Pasteur Production)

Hydrolysats tryptique de caséine	20,00 g/l
Infusion de viande de boeuf	10,00 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,00 g/l
NaCl	2,00 g/l
NaHPO <sub>4</sub> anhydre	0,40 g/l
Glucose	2,00 g/l
pH 7,8	

- . Héparine Roche - 25 000 UI/ml

### 2.1.3. Méthode

La méthode de base est celle utilisée en routine au laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon pour l'étude de l'activité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles vis à vis des staphylocoques, méthode adaptée du protocole décrit par Trush (1978).

#### 2.1.3.1. Prélèvement

Les populations cellulaires étudiées proviennent de donneurs de sang sains, volontaires.

Les prélèvements se font au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lyon Beynost :

- . 5 ml de sang sur tube sec (pour le sérum)
- . 10 ml de sang sur héparine (soit 100 UI d'héparine/ml de sang)

#### 2.1.3.2. Préparation de la suspension bactérienne

Nous avons utilisé la souche Streptocoque A référence AM 6 / S43 du Centre de Référence et de Recherche sur les Streptocoques (Prague, Tchécoslovaquie).

La souche lyophilisée est remise en suspension dans quelques gouttes d'eau distillée stérile et ensemencée sur gélose au sang frais et en bouillon Todd Hewitt.

Les milieux sont incubés à 37°C pendant 18 heures. Sur gélose au sang frais, nous vérifions la non contamination de la souche.

Le bouillon Todd Hewitt est réparti en tubes stériles et centrifugé à 3500 tours par minute pendant 10 minutes.

Le culot de germes est récupéré, lavé deux fois en sérum physiologique. Il est remis en suspension dans un volume de PBS permettant d'ajuster la densité optique aux environs de 0,500 en ayant dilué au 1/6e (la lecture se fait au Vitatron à une longueur d'onde de 550 nm).

#### 2.1.3.3. Opsonisation

Le sérum du patient est mis en contact avec la suspension bactérienne à volume égal, puis placé 20 minutes dans un bain marie à 37°C sous agitation douce.

La réaction est arrêtée par addition de PBS froid. Le mélange est ensuite centrifugé à 3500 tours par minute pendant 10 minutes.

Le culot est repris par le volume initial de PBS (figure 10).

#### 2.1.3.4. Préparation du luminol

Elle se fait à partir de la solution mère  $2.10^{-2}$  M. Le luminol est dilué dans du PBS afin d'obtenir une concentration de  $1.10^{-5}$  M.

#### 2.1.3.5. Préparation de la suspension cellulaire

10 ml de sang veineux hépariné sont sédimentés en présence de 5 ml de Dextran pendant 15 minutes.

Le surnageant est récupéré, dilué dans du sérum physiologique, centrifugé 10 minutes à 1100 tours par minute.

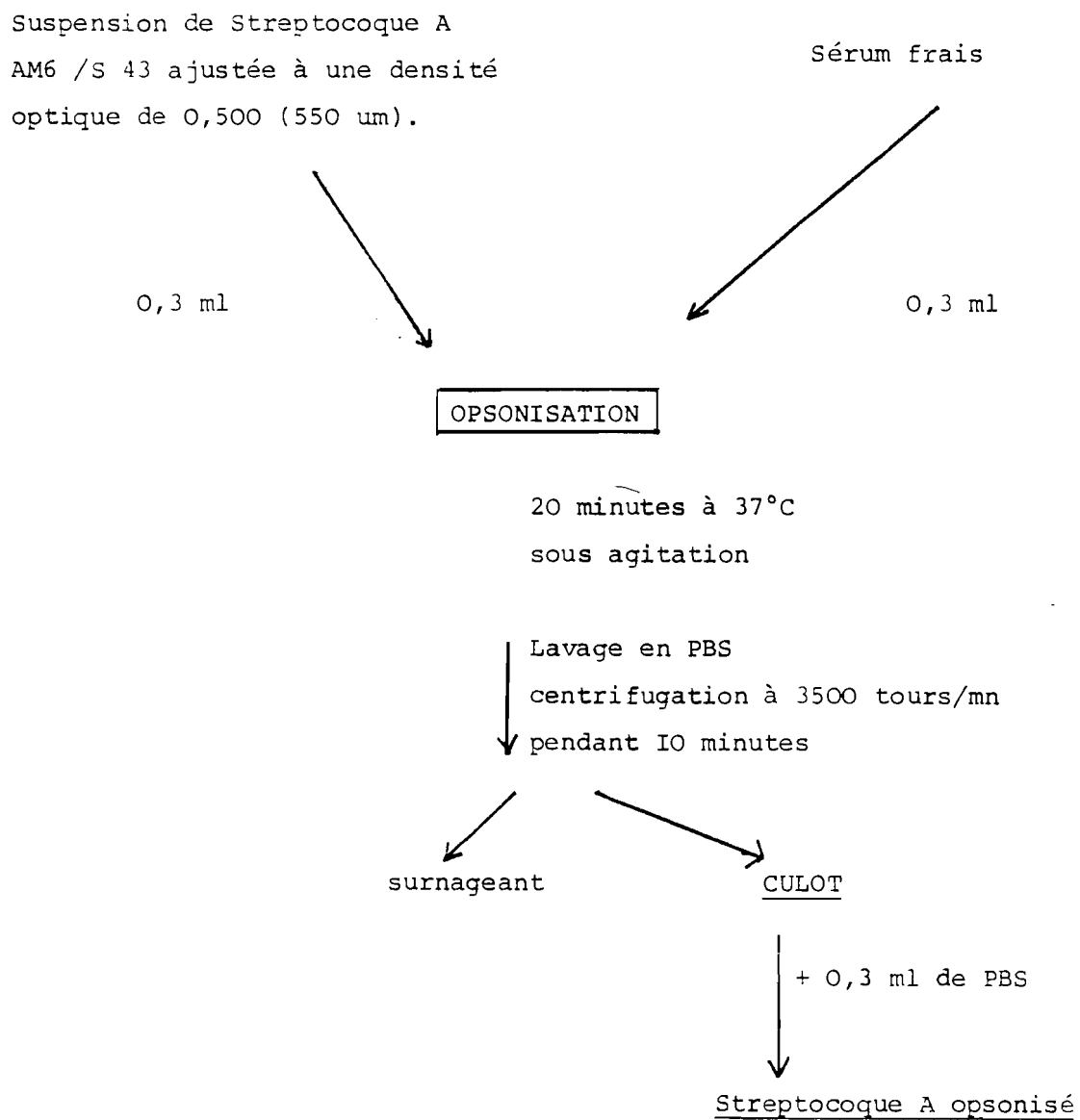


Figure 10

Opsonisation.

Le culot est repris par 10 ml de chlorure de sodium à 0,2% afin de lyser les globules rouges.

L'isoosmolarité est rétablie en ajoutant 10 ml de chlorure de sodium à 1,61%.

Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 1100 tours. Le culot est lavé en sérum physiologique et recentrifugé. Il est repris par une solution de Krebs Ringer. La concentration finale doit être de  $5 \cdot 10^6$  polynucléaires neutrophiles par ml.

La numération est réalisée au 1/10e dans du liquide de Turck (50  $\mu$ l de cellules + 0,45 ml de liquide de Turck). La lecture se fait à la cellule de Thoma.

Toute la cellule est lue et on doit trouver 50 polynucléaires neutrophiles, sinon on ajuste en conséquence.

$$\left( \text{dilution } 1/10 + \text{profondeur de la cellule de Thoma } 1/10 \right) \times 100 \text{ le nombre trouvé}$$

$$5000 \text{ PNN/mm}^3 \text{ ou } 5 \cdot 10^6 \text{ PNN/ml.}$$

La préparation de la suspension cellulaire est résumée dans la figure 11.

#### 2.1.3.6. Mesures

100  $\mu$ l de cellules (PNN) sont placées dans une cuve de chimioluminescence avec 200  $\mu$ l de luminol à  $1 \cdot 10^{-5}$  M.

Le mélange est placé 45 secondes dans la chambre de mesure, puis on rajoute 50  $\mu$ l de suspension opsonisée.

La cinétique de la phagocytose est suivie à l'aide d'un enregistreur dont le déroulement du papier est de 1 cm par mn et la tension de 1 volt.

L'appareil de chimioluminescence nous donne une mesure toutes les deux secondes.

Nous notons la valeur maximale de chimioluminescence exprimée en U.R.L. (unités relatives lumineuses) et son temps d'apparition.

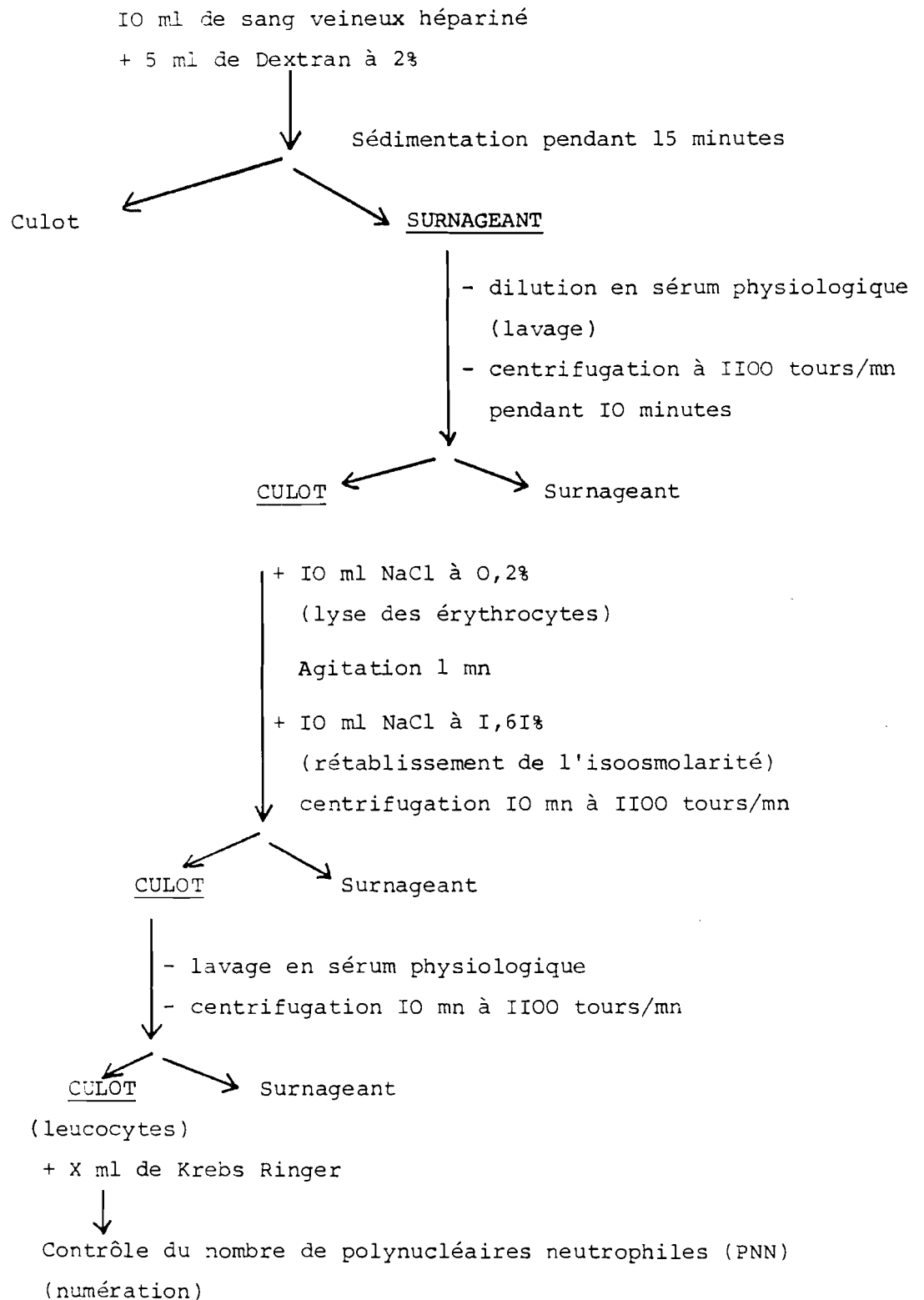


Figure 11

Préparation de la suspension cellulaire



## 2.2. ANALYSE DES DIFFERENTS PARAMETRES DE LA TECHNIQUE ET OPTIMISATION

Les essais que nous avons réalisés suivant le protocole de base défini pour le staphylocoque mais appliqué au streptocoque A ne nous ont pas paru satisfaisants.

Les résultats obtenus ont été ininterprétables en raison de la non reproductibilité de la réponse en chimioluminescence.

Nous avons donc étudié chacun des paramètres de la technique et les avons adapté pour obtenir un protocole fiable.

### 2.2.1. Résultats

#### 2.2.1.1. Influence du nombre de polynucléaires neutrophiles

Le protocole de base utilise la concentration de  $5 \cdot 10^6$  polynucléaires neutrophiles/ml. Nous avons étudié les concentrations suivantes :

$5 \cdot 10^6$  PNN par ml

$10^6$  PNN par ml

$5 \cdot 10^5$  PNN par ml

Des réponses mesurables en chimioluminescence ont été observées avec toutes ces concentrations (figure 12).

Le fait d'augmenter le nombre de cellules nécessite une grande quantité de sang au départ. Or, les travaux de WILSON en 1978 ont montré que le luminol, en augmentant la sensibilité de la technique, permet de réduire le nombre de cellules.

Nous avons donc fixé la concentration de polynucléaires neutrophiles à  $5 \cdot 10^6$ /ml.

#### 2.2.1.2. Essai de conservation des polynucléaires neutrophiles dans une solution de Hanks par rapport à une solution de Krebs - Ringer

Deux essais de préparations cellulaires sont menés parallèlement. L'un des culots cellulaires est repris par une solution de Hanks, l'autre par une solution de Krebs Ringer.

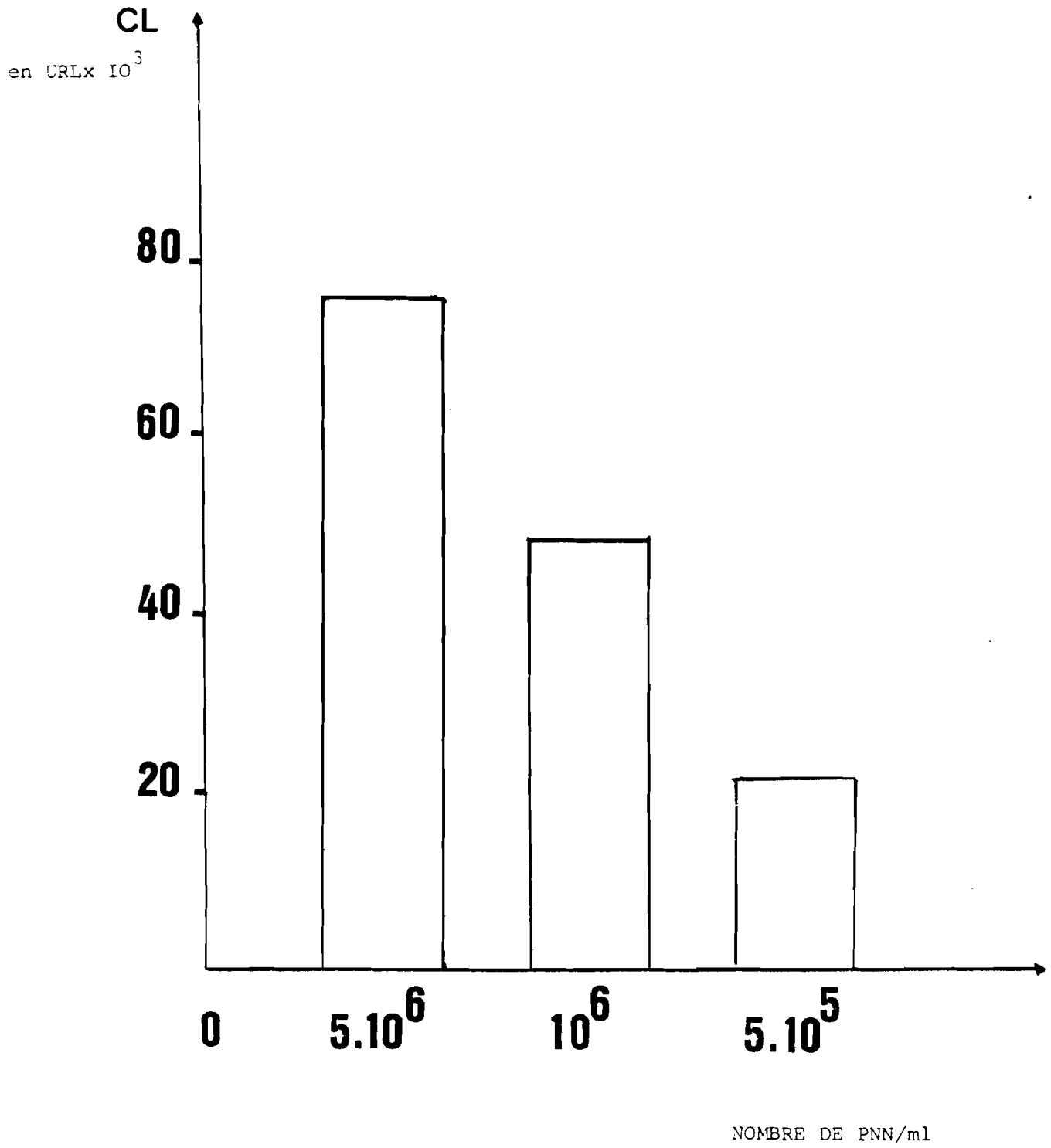


Figure 12

Influence du nombre des polynucléaires

La suspension est ajustée, dans les deux cas, à la concentration de  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml.

Les mesures sont effectuées en présence de luminol et de Streptocoque A opsonisé par du sérum témoin frais.

Nous notons de meilleurs résultats en tampon Krebs. On observe une diminution de la réponse en chimioluminescence quand nous utilisons comme milieu de suspension une solution de Hanks (figure 13).

Nous avons donc choisi de travailler en tampon Krebs.

#### 2.2.1.3. Influence de la température

Les neutrophiles sont en suspension dans une solution de Krebs Ringer. La suspension est séparée en trois fractions placées respectivement à  $-4^\circ\text{C}$ , à  $20^\circ\text{C}$  (température ambiante) et à  $37^\circ\text{C}$ .

Les mesures sont faites au temps 0 et après un délai de 3 heures en présence d'une suspension de streptocoque A opsonisé par du sérum témoin frais (figure 14).

Nous remarquons que la réponse en chimioluminescence est à peu près maintenue après 3 heures à  $+4^\circ\text{C}$ . Par contre, la température diminue nettement l'activité des polynucléaires.

D'après les travaux de Anderson et Amirault en 1979, cette baisse de chimioluminescence serait due à une agrégation des polynucléaires.

#### 2.2.1.4. Influence de la concentration en luminol

Le luminol est un amplificateur de la chimioluminescence. Le protocole de base l'utilise à la concentration de  $10^{-5}$  M.

A partir de cette concentration, nous avons testé des concentrations croissantes de luminol.

$$2 \cdot 10^{-5} \text{ M. } 2 \cdot 10^{-4} \text{ M. } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M. } 2 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

La figure 15 montre les résultats obtenus. Nous notons une faible chimioluminescence pour la concentration de base  $10^{-5}$  M. Des résultats convenables sont donnés par les concentrations  $2 \cdot 10^{-5}$  M et  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

Le luminol utilisé à  $2 \cdot 10^{-4}$  M donne des maxima de chimioluminescence très élevés qui dépassent les capacités de l'enregistreur. Nous avons donc préféré utiliser le luminol à la concentration

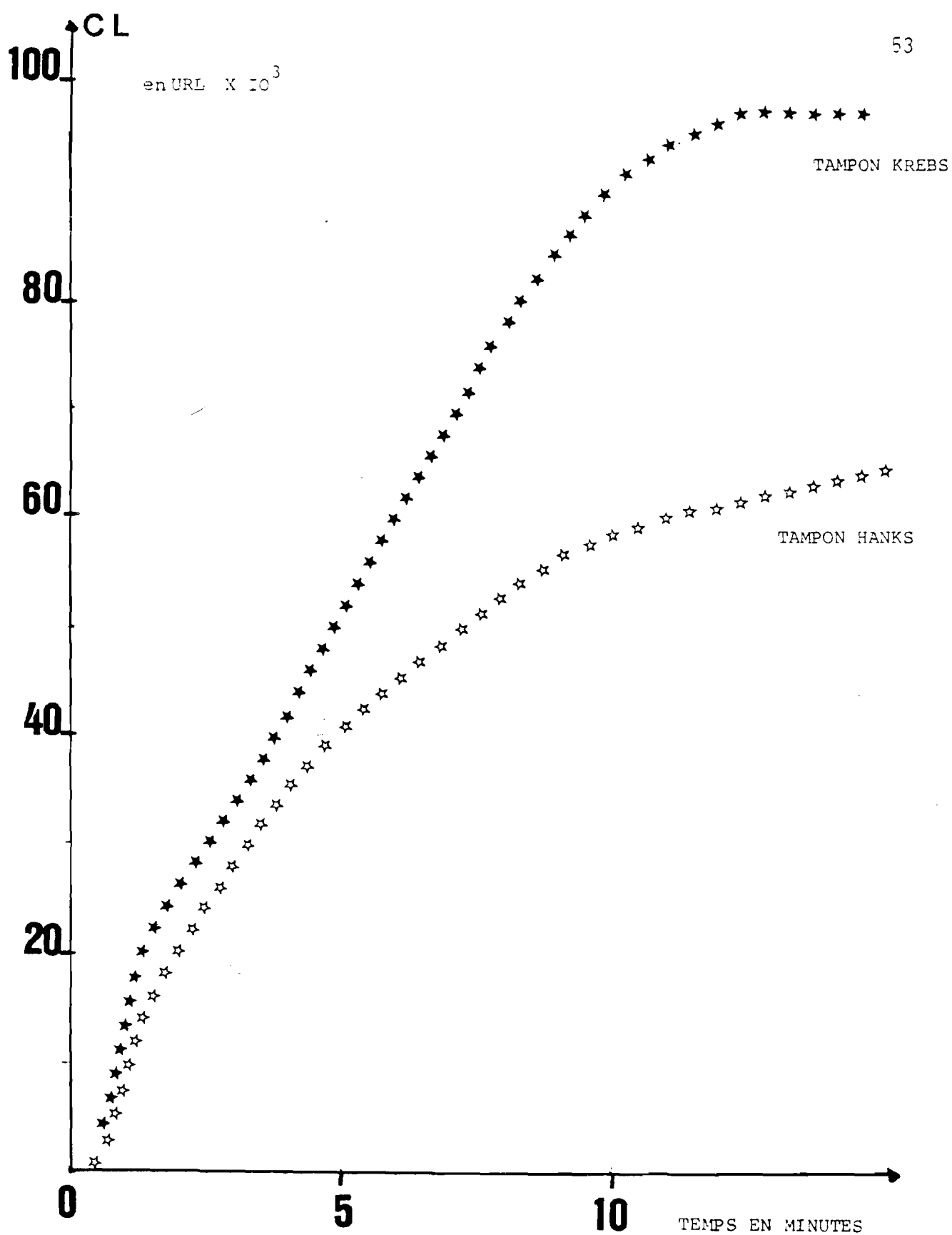


Figure 13

Essai de conservation des polynucléaires dans une solution de Hanks par rapport à une solution de Krebs Ringier.

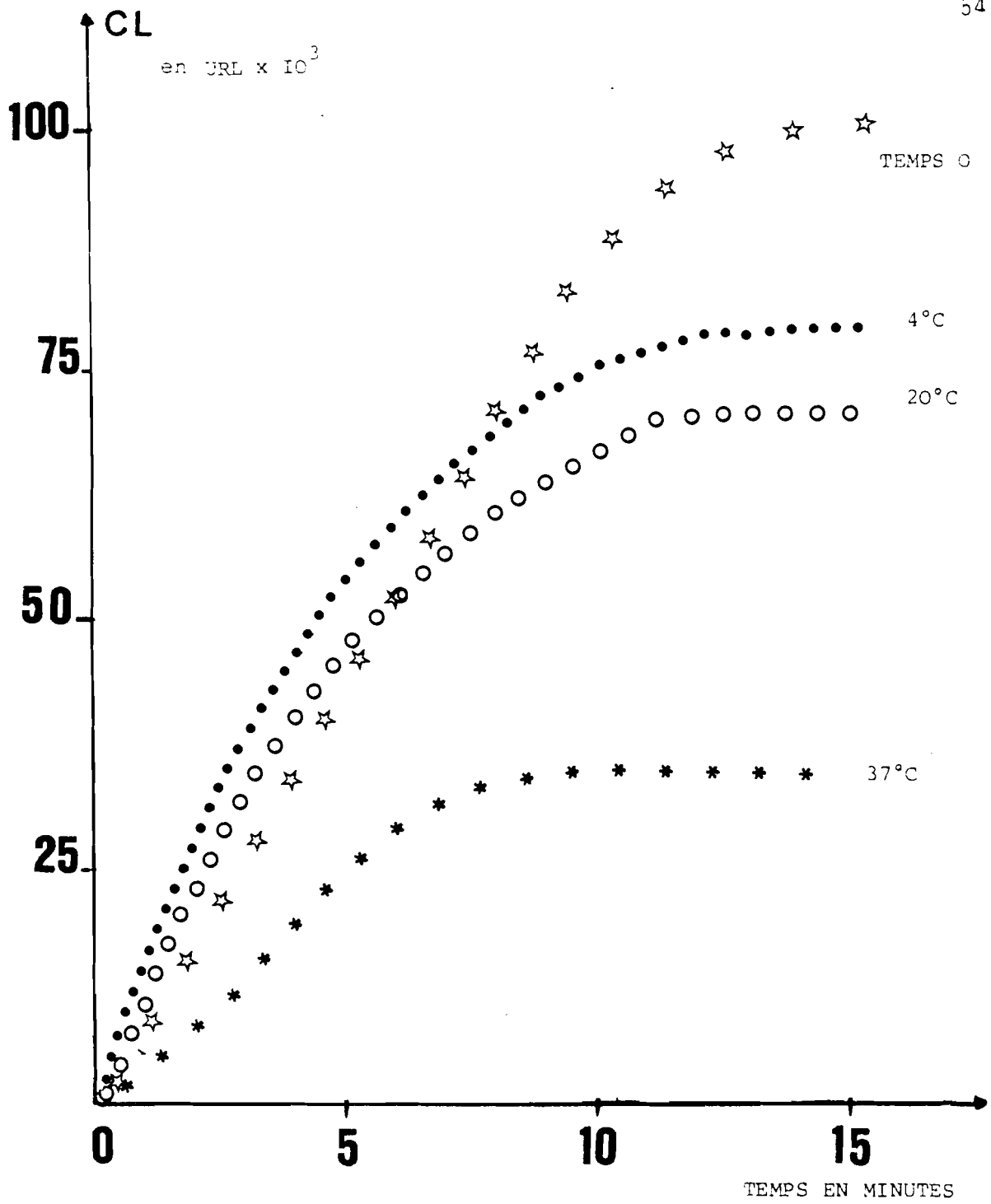


Figure 14

Influence de la température

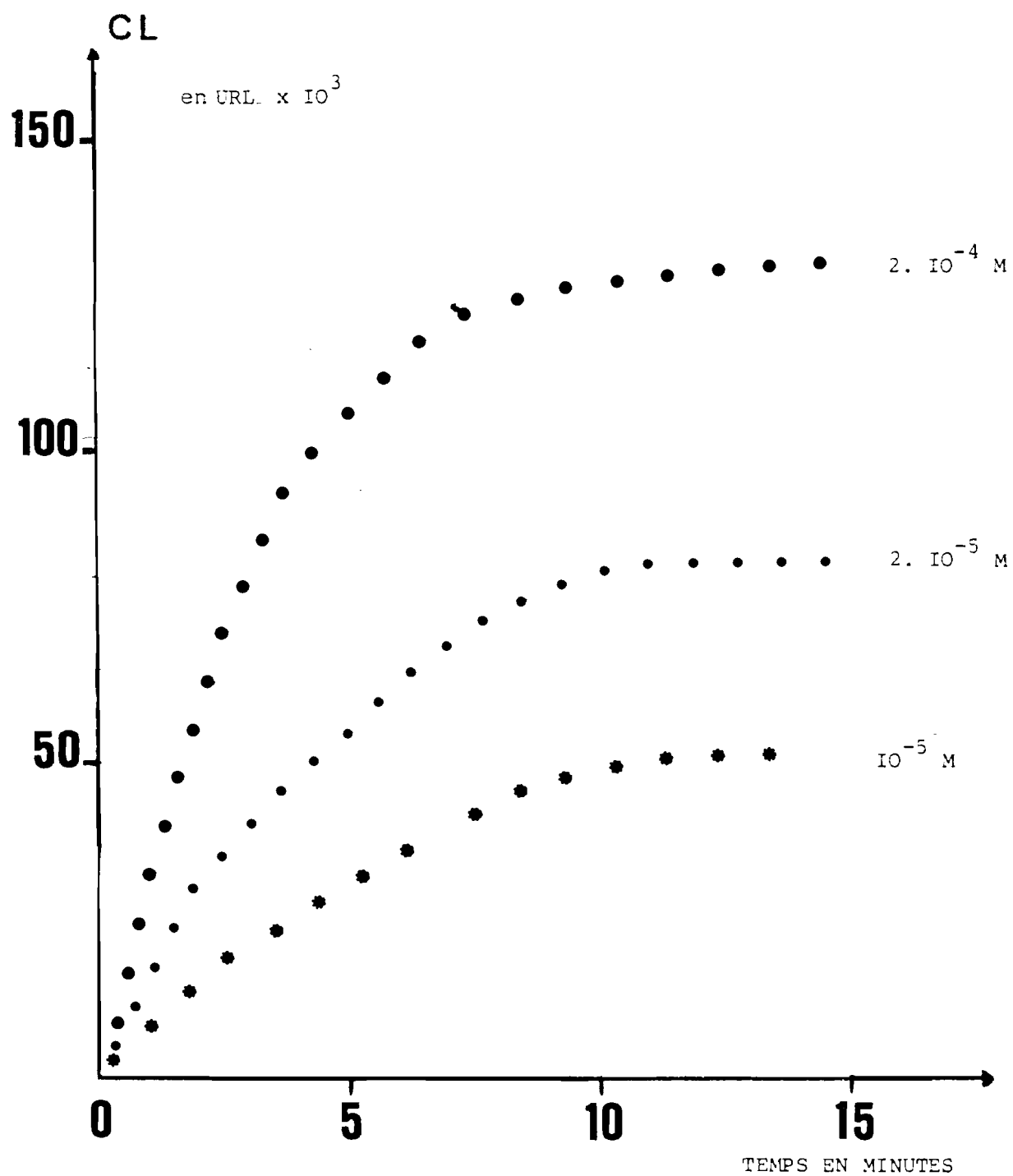


Figure 15

Influence de la concentration en luminol.

de  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

Pour des concentrations plus fortes ( $2 \cdot 10^{-3}$  M,  $2 \cdot 10^{-2}$  M), l'appareil ne donne pas de résultats enregistrables. Nous pensons que c'est peut être dû au diméthylsulfoxyde (DMSO), solvant du luminol.

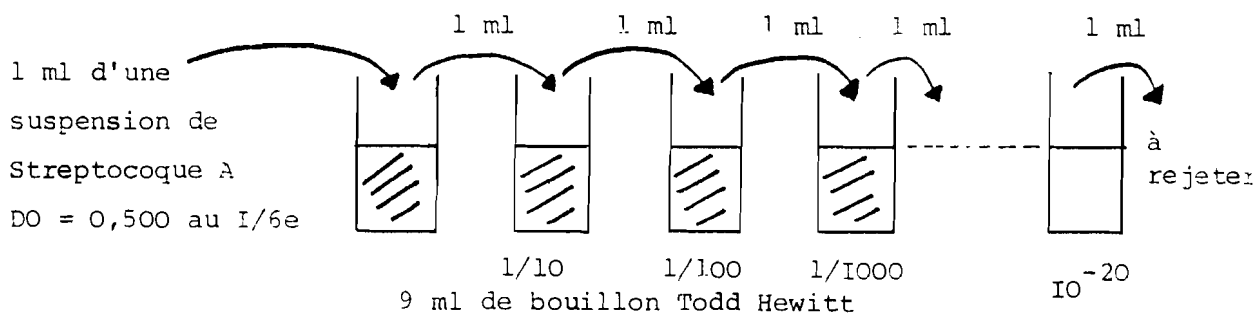
#### 2.2.1.5. Influence du nombre de germes

Nous avons testé quatre suspensions bactériennes de Streptocoque A de densité optique différente (dilution au 1/6e) :

0,250 - 0,500 - 0,750 - 0,980

La figure I6 donne les résultats obtenus. La suspension bactérienne correspondant à une densité optique de 0,500 au 1/6e nous donne un meilleur résultat. C'est celle que nous avons retenue.

Une numération de germes réalisée sur une série de 20 tubes et d'après le modèle suivant nous a permis de déterminer qu'une densité optique de 0,500 au 1/6e correspond à  $10^8$  germes par ml ou  $10^8$  CFU par ml.



Les tubes sont placés 24 heures à 37°C.

Nous retenons la plus grande dilution présentant une pousse bactérienne. Le nombre de germes correspond à l'inverse de la dilution.

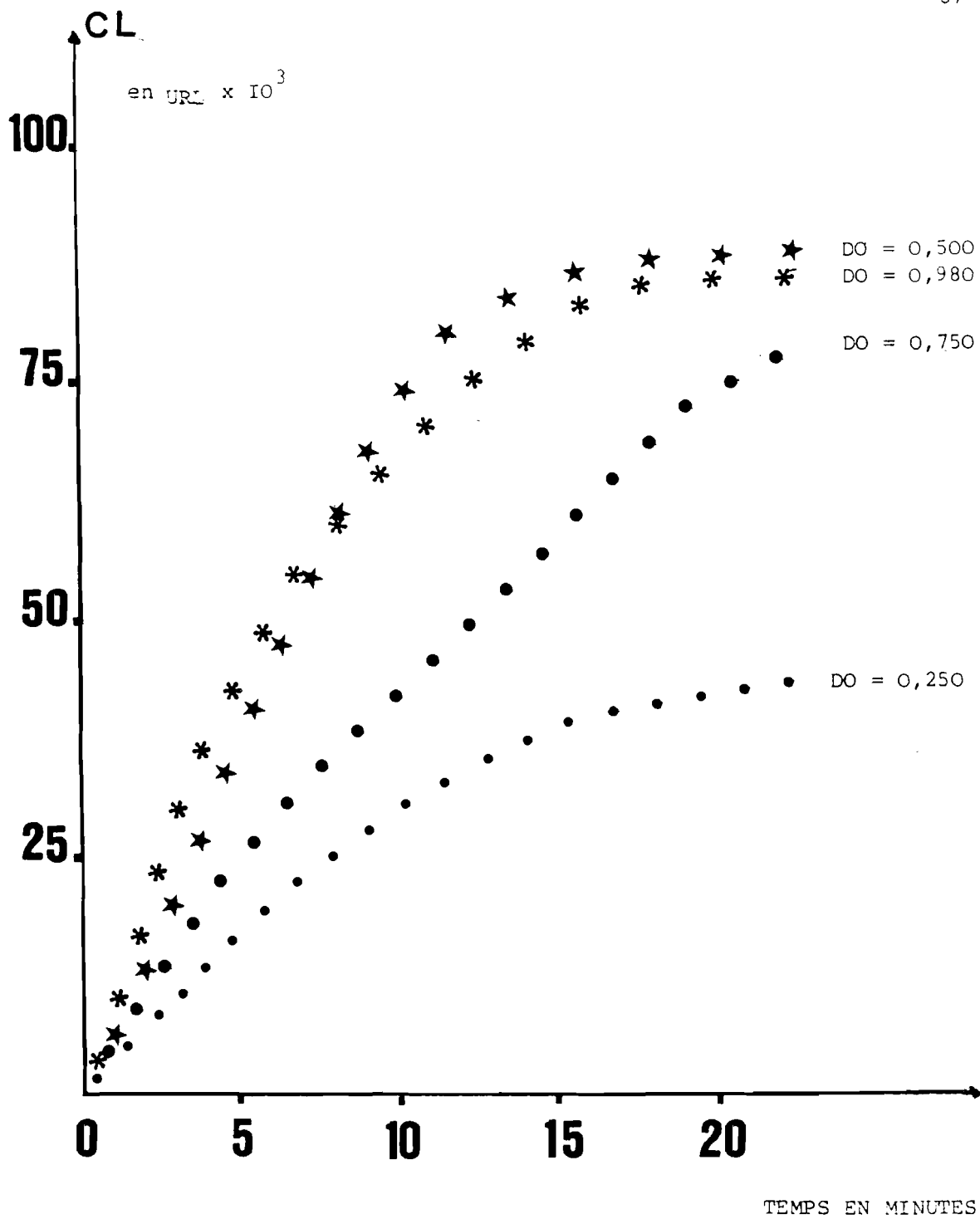


Figure 16

Influence du nombre de germes



#### 2.2.1.6. Influence du temps d'opsonisation

L'opsonisation est faite par du sérum témoin frais. Les mesures de chimioluminescence sont réalisées pour des temps d'opsonisation de 0, 5, 10, 20, 30, 40 minutes (figure 17). Le temps d'opsonisation que nous retiendrons est de 20 minutes.

#### 2.2.1.7. Influence du complément

Le rôle du complément dans le pouvoir opsonisant du sérum est connu depuis assez longtemps (MUSCHEL, 1977). Le complément serait nécessaire pour que s'opère les migrations rapides des polynucléaires neutrophiles vers les bactéries et les immuns complexes précipités.

Dans les essais que nous avons réalisés, nous utilisons du complément de cobaye qui titre 300 UH (unités hémolytiques) par la méthode de Kabat et Meyer.

L'opsonisation a été faite :

- . par du sérum frais (immunoglobulines et intégrité des protéines du système complément).
- . par du sérum décomplémenté par chauffage 30 minutes en bain marie à 56°C.
- . par du sérum décomplémenté auquel on rajoute du complément de cobaye (150 UH, 300 UH).
- . par du complément seul.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 18. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le sérum frais. Le sérum décomplémenté donne des résultats nettement plus faibles que ceux du sérum frais. Le sérum décomplémenté auquel on rajoute à volume égal du complément à 150 UH donne des résultats voisins de ceux du sérum frais.

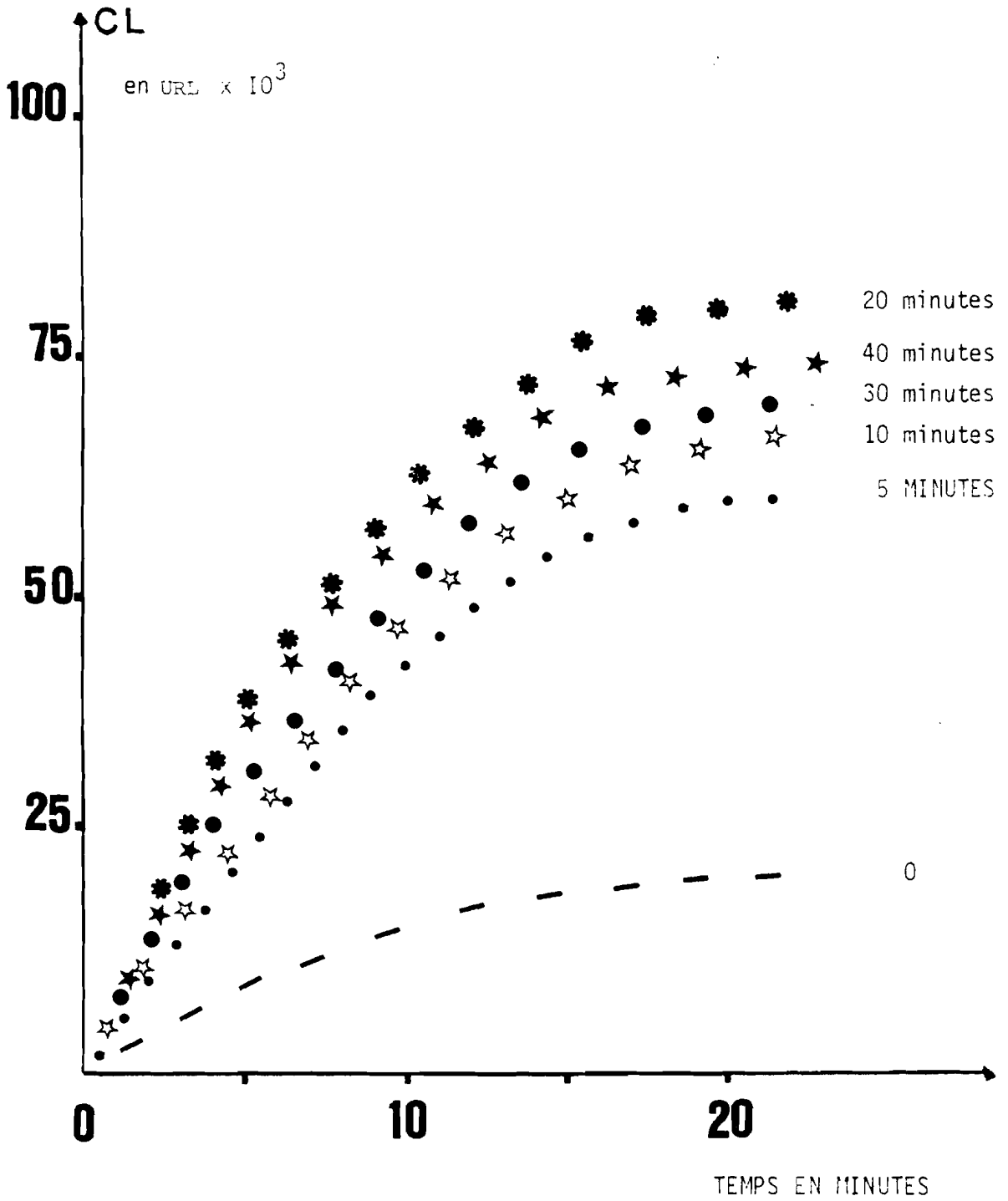


Figure 17  
Influence du temps d'ozonisation

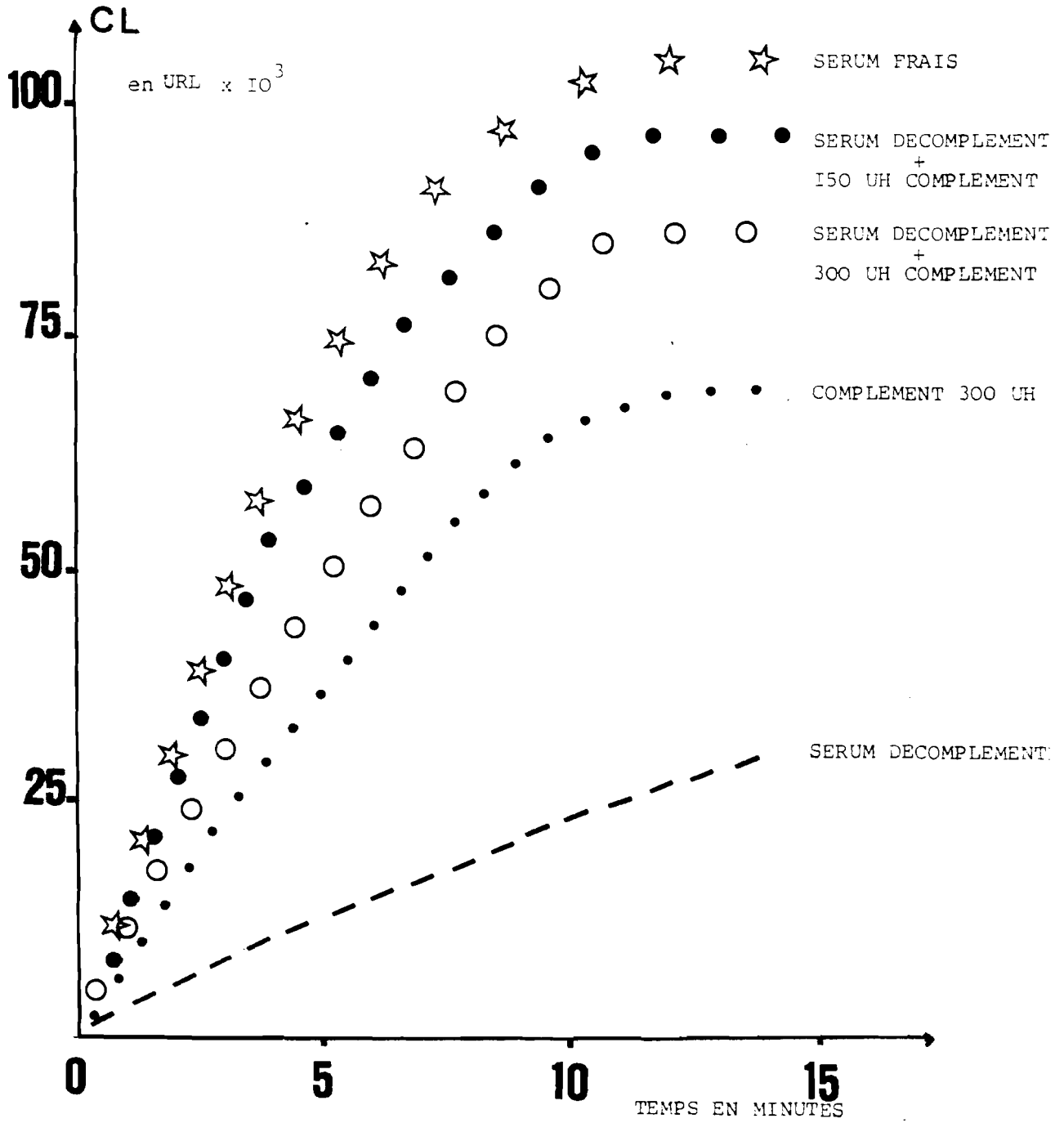


Figure I8

Influence du complément

### 2.2.2. Protocole retenu

L'analyse des différents paramètres de la technique et les résultats obtenus nous ont permis d'établir un protocole mieux adapté à l'étude de la phagocytose des streptocoques A par les polynucléaires neutrophiles (figure 19).

La suspension bactérienne est ajustée à une densité optique de 0,500 au 1/6e, ce qui correspond à  $10^8$  germes par ml.

L'opsonisation peut être réalisée avec du sérum frais ou du sérum décomplémenté auquel on rajoute du complément de cobaye titrant 150 UH.

Le temps d'opsonisation est de 20 minutes au bain marie à 37°C, sous agitation douce.

Le luminol sera utilisé à la concentration de  $2.10^{-5}$  M. La suspension cellulaire contient  $5.10^6$  PNN/ml.

### 2.2.3. Etude de la reproductibilité de la méthode

L'étude de la reproductibilité de la technique de chimioluminescence a été réalisée sur le sérum décomplémenté pendant 30 minutes au bain marie à 56°C.

L'étude s'est faite sur 10 essais.

La valeur de chimioluminescence prise en considération pour le sérum frais et pour le sérum décomplémenté est celle obtenue en même temps que la cinétique.

Celle du sérum décomplémenté est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité du sérum frais (tableau VII).

Le coefficient de variation obtenu est inférieur à 10. Nous pouvons en conclure que la technique possède une bonne reproductibilité.

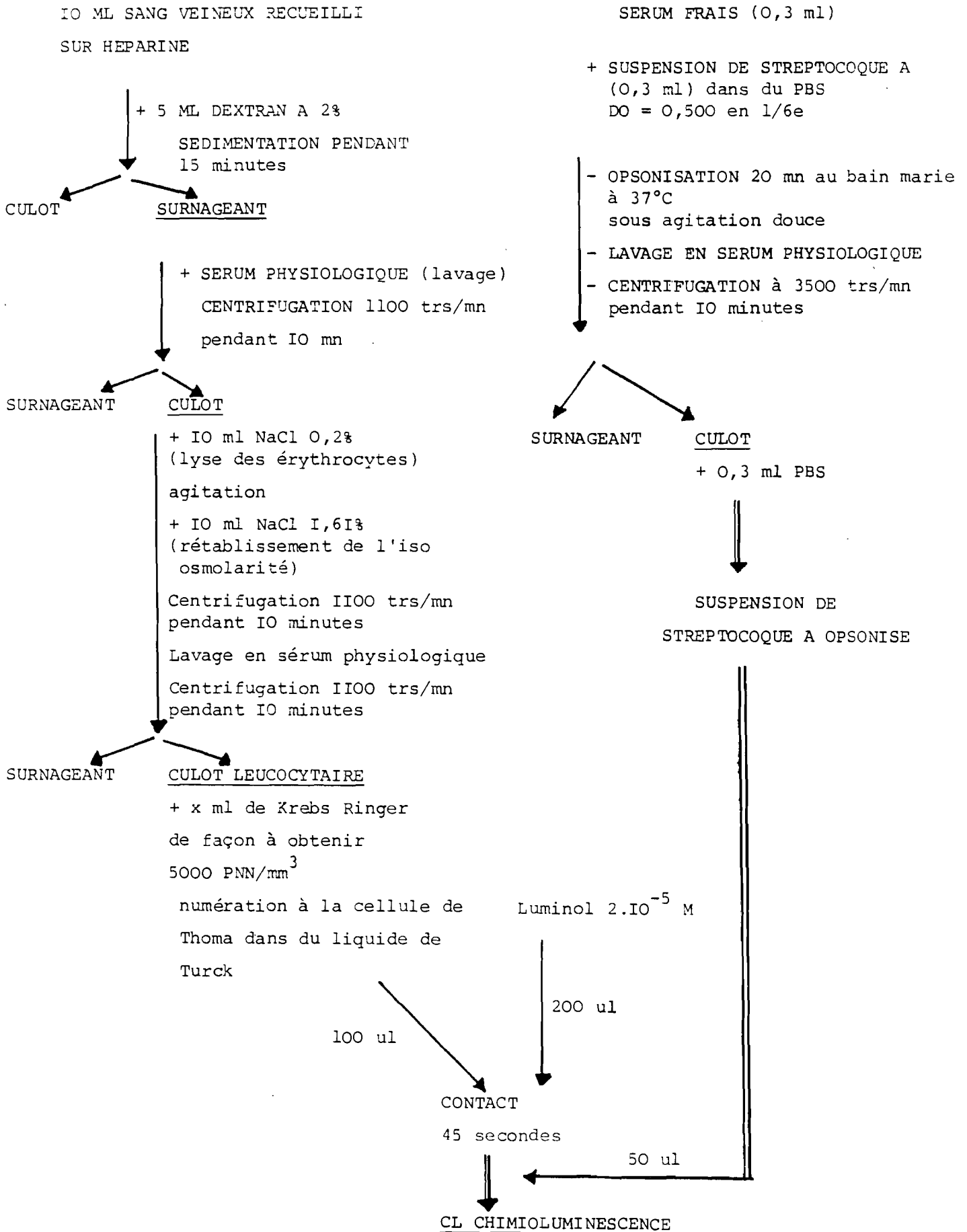


Figure 19

Protocole optimisé

TABLEAU VII

## ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE DE CHIMIO-LUMINESCENCE

SERUM FRAIS										
CHIMIO-LUMINESCENCE en URL	111.415	103.200	70.300	106.000	92.200	63.900	70.900	101.400	87.800	86.400
SERUM DECOMPLEMENTE										
CHIMIO-LUMINESCENCE en URL	46.000	44.450	31.000	49.300	41.000	29.500	30.700	49.600	32.400	33.000
SERUM DECOMPLEMENTE										
% PAR RAPPORT AU SERUM FRAIS	41	43	44	46	44	46	43	48	37	38

	Nombre d'essais	Moyenne %	Ecart type	Coefficient de variation
SERUM DECOMPLEMENTE	10	43	3,31	7,69

$$CV = \frac{ECART\ TYPE}{MOYENNE} \times 100$$

### 2.3. APPLICATION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE OPSONISANTE DE PREPARATIONS DE GAMMAGLOBULINES

Nous avons testé par chimioluminescence l'activité opsonisante vis à vis de *Streptococcus pyogenes* de cinq préparations d'immunoglobulines.

Les concentrés d'immunoglobulines peuvent être obtenus à partir d'un mélange de plasmas provenant d'au moins 1000 donneurs (selon les recommandations de l'OMS) ou à partir du sérum recueilli au niveau du placenta.

Les gammaglobulines standard sont obtenues par fractionnement à l'alcool (méthode de Cohn) du plasma ou du sérum placentaire. Les préparations obtenues, reconstituées à 16% sont directement utilisables par voie intramusculaire.

Elles ne contiennent que des immunoglobulines G intactes de demi vie normale, représentant tous les anticorps normalement présents chez les donneurs.

Cependant, les préparations contiennent des agrégats de polymères qui peuvent activer spontanément le système complémentaire, ce qui contre indique leur emploi par voie intraveineuse.

Plusieurs méthodes permettent de rendre les préparations d'immunoglobulines utilisables par voie veineuse :

- . Le traitement à la pepsine mais les produits obtenus contiennent 80% de fragments Fab'2 sans fonction effectrice.

- . Le traitement à la plasmine mais les produits sont fractionnés à 60 - 70% et donc moins efficaces.

- . Le traitement à la B propiolactone.

- . La sulfonation ou réduction et alkylation.

- . Le traitement au PEG (polyéthylène glycol) qui permet d'obtenir des immunoglobulines G intactes, non dénuées toutefois d'activité anti-complémentaire.

- . Le traitement à pH4 en présence de traces de pepsine permettant d'obtenir des immunoglobulines intactes sans activité anti complémentaire.

### 2.3.1. Matériel et méthode

#### 2.3.1.1. Préparations d'immunoglobulines testées

##### . Immunoglobulines injectables par voie intramusculaire :

###### - d'origine placentaire

- . Gamma I6<sup>r</sup> en ampoules de 10 ml, lot 0342  
elle est produite par l'Institut Mérieux, Lyon, France
- . Diammaglobulines I6,5%<sup>r</sup> en ampoules de 2 ml lot 202  
elles sont commercialisées par les laboratoires  
Diamant, Puteaux, France.

###### - d'origine plasmatique

- . Gamma TS I6,5% en flacons de 10 ml lot 85 09  
elles sont produites par le Centre Régional de  
Transfusion Sanguine de Lyon, Beynost, France.

Ces immunoglobulines injectables par voie intramusculaire sont polyvalentes, obtenues par fractionnement à l'alcool (méthode de Cohn). Elles renferment 98% d'immunoglobulines G intactes.

Dans notre étude, elles ont été testées à 5% par dilution dans de l'eau pour préparations injectables en vue d'une comparaison avec les préparations d'immunoglobulines à usage intra veineux.

##### . Immunoglobulines injectables par voie intraveineuse :

###### - d'origine placentaire

- . Veinoglobuline<sup>r</sup> à 5%, lyophilisée en flacons de 0,5 g, lot V 0791.  
elle est constituée d'immunoglobulines polyvalentes obtenues par fractionnement à l'alcool (méthode de Cohn) puis par traitement par la plasmine. Elle renferme 50% d'immunoglobuline G intacte et 50% de fragments Fab et Fc libres.  
elle est commercialisée par l'Institut Mérieux, Lyon, France.



- d'origine plasmatique

- . Gamma TS 5% en flacons de 10 ml lot 85 IO6  
ce sont des immunoglobulines obtenues par fractionnement à l'alcool (méthode de Cohn) ayant subi un traitement à pH4. Ce sont des immunoglobulines G intactes, sans activité anti complémentaire.

2.3.1.2. Souche étudiée

*Streptococcus pyogenes* AM6/S43 du Centre de Référence et de Recherche sur les Streptocoques, Prague, Tchécoslovaquie.  
La suspension bactérienne est amenée à la concentration de  $10^8$  CFU/ml par mesure de la densité optique à 550 nm (dilution au 1/6e).

2.3.1.3. Méthode

Le protocole est le même que celui décrit dans le paragraphe 2.2.2.

Les polynucléaires neutrophiles proviennent de donneurs volontaires adultes sains.

La suspension cellulaire est amenée à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml.

Le sérum témoin est utilisé frais ou décomplémenté par un chauffage de 30 minutes à  $56^\circ\text{C}$ .

Les préparations d'immunoglobulines sont testées à 5%.

Pour les mesures, 100  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire sont mélangés à 200  $\mu\text{l}$  de luminol à  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

On ajoute 50  $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne préalablement opsonisée.

On réalise l'enregistrement en continu de la chimio-luminescence émise qui est exprimée en URL.

### 2.3.2. Résultats

Dix populations de polynucléaires ont été utilisées pour l'étude de l'activité opsonisante des préparations d'immunoglobulines vis à vis du Streptocoque A.

Chaque essai comporte l'opsonisation du Streptocoque A par les cinq préparations d'immunoglobulines : soit seules, soit en présence du complément apporté par le sérum témoin frais.

Nous avons réalisé en même temps une opsonisation du germe par du sérum témoin frais et du sérum décomplémenté qui servent de référence.

Dans chaque essai, nous prenons en considération la valeur de la chimioluminescence (CL) exprimée en URL, obtenue en même temps de cinétique (tableau VIII).

La valeur de CL donnée par les polynucléaires neutrophiles (PNN) stimulés par le germe opsonisé par le sérum frais est considérée comme correspondant à 100% d'activité. Le tableau IX donne les résultats exprimés en pourcentage.

Le tableau X donne les résultats en pourcentage par rapport au sérum décomplémenté.

TABLEAU VIII

CHIMILUMINESCENCE EXPRIMEE EN URL DES ESSAIS EFFECTUES SUR LES PREPARATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

ESSAIS	SF	SD	G16	G16+SF	V	V+SF	TS 16	TS16+SF	TS5	TS5+SF	D	D+SF
1	111.415	46.000	88.250	123.800	48.700	136.880	92.700	123.430	88.600	137.840	110.000	143.720
2	103.200	44.450	73.700	96.145	49.730	93.200	70.600	85.760	100.700	110.280	114.500	120.200
3	70.300	31.000	61.600	72.150	26.562	74.500	65.013	80.868	63.700	77.000	62.140	81.100
4	106.000	49.300	89.163	109.700	44.141	111.300	94.950	114.772	94.349	121.400	122.000	132.300
5	92.200	41.000	69.100	100.200	34.170	96.502	82.000	101.000	80.700	84.000	102.600	118.300
6	86.400	33.000	67.300	81.000	36.070	80.600	72.400	92.700	70.000	105.800	97.500	114.000
7	63.900	29.500	52.834	69.173	29.325	69.691	59.748	76.178	55.429	77.587	81.400	84.300
8	70.900	30.700	60.814	78.193	30.714	74.400	67.485	88.863	65.097	82.550	85.025	97.500
9	101.400	49.600	83.500	105.356	42.900	102.469	89.537	109.300	86.795	124.100	119.200	138.200
10	87.800	32.400	82.000	98.209	42.000	96.708	84.305	100.700	84.142	104.308	100.600	114.200
MOYENNE	89.351	38.695	72.826	93.393	38.422	93.625	77.873	97.357	78.951	102.486	99.496	114.382

TABLEAU IX

CHIMIO-LUMINESCENCE EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AU SERUM FRAIS DES ESSAIS EFFECTUES SUR LES  
PREPARATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

ESSAIS	SF	SD	GI6	GI6+SF	V	V+SF	TS 16	TS16+SF	TS5	TS5+SF	D	D+SF
1	100	41	79	111	44	122	83	111	80	124	99	129
2	100	43	71	93	48	90	68	83	97	107	111	116
3	100	44	88	103	38	106	92	115	91	109	88	115
4	100	46	84	103	42	105	90	108	89	114	115	125
5	100	44	75	109	37	104	89	109	87	91	111	128
6	100	38	78	94	42	93	84	107	81	122	113	132
7	100	46	83	108	46	109	93	119	87	121	127	132
8	100	43	86	110	43	105	95	125	92	116	120	137
9	100	48	82	104	42	101	88	108	85	122	117	136
10	100	37	94	112	48	110	96	115	95	118	114	130
MOYENNE	100	43	82	105	43	104	88	110	88	114	111	128

TABLEAU X

CHIMILUMINESCENCE EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AU SERUM DECOMPLEMENTE DES ESSAIS EFFECTUES SUR LES  
PREPARATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

ESSAIS	SD	SF	G16	G16+SF	V	V+SF	TS16	TS16+SF	TS5	TS5+SF	D	D+SF
1	100	242	191	269	105	297	201	268	192	299	239	312
2	100	232	166	216	112	209	159	193	226	248	257	270
3	100	227	199	233	85	240	210	261	205	248	200	261
4	100	215	181	222	89	226	192	233	191	246	247	268
5	100	224	168	244	83	235	200	246	197	205	250	288
6	100	261	204	245	109	244	219	281	212	320	295	345
7	100	216	179	234	99	236	202	258	188	263	276	286
8	100	231	198	255	100	242	220	289	212	269	277	317
9	100	204	168	212	86	206	180	220	175	250	240	278
10	100	271	253	303	129	298	260	311	259	322	310	352
MOYENNE	100	232	191	243	100	243	204	256	206	267	259	298

## 2.4. APPLICATION A L'ETUDE DE LA VOIE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT MISE EN JEU DANS L'OPSONISATION DU STREPTOCOQUE A.

La défense antibactérienne est étroitement liée à l'activation du système complémentaire.

Selon les souches, les bactéries sont capables d'activer soit la voie classique, soit la voie alterne du complément.

La voie classique nécessite du  $\text{Ca}^{++}$  et est inhibée par l'EGTA (éthylène glycol bis (B amino éthylether) N-N' tétraacétate acid) qui chélate le  $\text{Ca}^{++}$

La voie alterne nécessite du  $\text{Mg}^{++}$

Ces deux voies sont inhibées par l'EDTA (éthylène diamine tétraacetic acid) qui chélate  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$

Aussi, avons nous voulu connaître la voie d'activation du complément utilisée par le Streptocoque A souche de référence AM6/S43.

### 2.4.1. Matériel et méthode

#### 2.4.1.1. Chélateurs utilisés

- . Solution d'EDTA à 100 mM (SIGMA)
- . Solution d'EGTA (SIGMA) à 100 M :

L'EDTA et l'EGTA sont mis en solution dans du sérum physiologique.

Pour faciliter la dissolution de l'EGTA, on réalise un chauffage à 60°, en ajoutant quelques gouttes de soude 1N. La solution d'EGTA est ensuite ramenée à pH 7,4 avec HCl 1N.

Les solutions sont conservées à +4°C.

- . Solution de  $\text{MgSO}_4$  à 100 mM.

#### 2.4.1.2. Méthode

Le protocole suivi est le même que celui décrit dans le paragraphe 2.2.2., mais l'opsonisation se fait par :

- du sérum témoin frais
- du sérum témoin frais + EDTA qui, en chélatant le  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  bloque les deux voies d'activation du complément.

- du sérum témoin frais + EGTA qui bloque la voie classique en chélatant le  $\text{Ca}^{++}$
- du sérum témoin frais + EGTA, suivi d'un lavage avec une solution de  $\text{MgSO}_4$  à 100 mM pour stimuler la voie alterne.
- du sérum décomplémenté par un chauffage de 30 mn à 56°C.

(1 ml de sérum frais est chélaté par 0,1 ml d'EDTA ou d'EGTA ce qui nous donne une concentration finale de 10 mM de chélateur).

#### 2.4.2. Résultats

Dix populations de polynucléaires neutrophiles ont été utilisées pour l'étude de la voie d'activation du complément mise en jeu dans l'opsonisation du streptocoque A.

Chaque essai comporte l'opsonisation du Streptocoque A par le sérum témoin frais et le sérum témoin décomplémenté qui servent de référence.

Le Streptocoque A est également opsonisé :

- . par du sérum frais auquel on rajoute de l'EDTA qui inhibe la voie classique et la voie alterne du complément.

- . par du sérum frais auquel on rajoute de l'EGTA qui inhibe la voie classique.

Certains essais ont subi un lavage par une solution de  $\text{MgSO}_4$  pour stimuler la voie alterne.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux XI et XII.

D'après nos résultats, il semblerait que l'opsonisation est déclenchée à la fois par chacune des voies d'activation du complément.

En faisant la différence entre l'activité de chimio-luminescence du sérum frais et celle du complexe SF + EGTA, on peut connaître la part prise par la voie classique (tableau XII).

Quantitativement, il semble que la contribution de la voie classique dans l'opsonisation du Streptocoque A référence AM6/S43 soit plus importante que celle de la voie alterne (tableau XIII).

TABLEAU XI

CHIMILUMINESCENCE EN URL DES ESSAIS EFFECTUES POUR L'ETUDE DE LA  
VOIE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT.

ESSAIS	SF	SD	SF+EDTA	SF+EGTA	SF+EGTA (+lavage $MgSO^4$ )
1	106.800	46.980	50.190	69.400	
2	92.700	44.496	41.715	62.100	
3	87.891	40.430	39.550	56.250	
4	93.340	46.219	47.203	73.755	
5	106.810	41.500	39.600	51.200	52.800
6	107.110	42.844	47.100	72.835	80.332
7	87.500	42.360	44.500	61.900	63.300
8	82.100	36.100	38.587	60.180	65.400
9	90.769	35.400	37.275	70.800	75.338
10	104.100	51.000	48.920	74.952	83.280
MOYENNE	96.412	42.733	43.464	65.337	70.075/6



TABLEAU XII

CHIMIO-LUMINESCENCE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AU SERUM FRAIS DES  
ESSAIS EFFECTUES POUR L'ETUDE DE LA VOIE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT

ESSAIS	SF	SD	SF+EDTA	SF+EGTA	SF+EDTA (+ lavage $MgSO^4$ )
1	100	44	47	65	
2	100	48	45	67	
3	100	46	45	64	
4	100	47	48	75	
5	100	39	37	48	49
6	100	40	44	69	75
7	100	48	51	70	72
8	100	43	47	73	79
9	100	39	41	78	83
10	100	49	47	72	80
MOYENNE	100	44	45	68	73

TABLEAU XIII

ACTIVITE DE CHIMIO-LUMINESCENCE EN URL DU COMPLEMENT PAR  
 VOIE ALTERNE ET DU COMPLEMENT PAR VOIE CLASSIQUE.

	SF	SF+EDTA	SF+EGTA	VA	VC
MOYENNE	96.412	43.464	65.337	21.873	31.075

VA - voie alterne :  $[SF + EGTA] - [SF + EDTA]$

VC - voie classique :  $SF - [SF + EGTA]$



- . Gélose au sang frais de cheval (Institut Pasteur Production).
- . Milieu de TODD HEWITT (Institut Pasteur Production).

Hydrolysate tryptique de caséine	20,00 g/l
Infusion de viande de boeuf	10,00 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,00 g/l
NaCl	2,00 g/l
NaHPO <sub>4</sub> anhydre	0,40 g/l
Glucose	2,00 g/l

- . Cytochrome C SIGMA
- . Superoxyde dismutase (SOD) SIGMA

### 3.1.3. Méthode

#### 3.1.3.1. Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne est préparée de la même façon que pour le test de chimioluminescence. La souche utilisée est identique. La densité optique est ajustée à 0,500 (dilution au 1/6e) à une longueur d'onde de 550 nm.

#### 3.1.3.2. Opsonisation

L'opsonisation de la suspension bactérienne est identique à celle pratiquée pour le test de chimioluminescence.

La suspension de germes est mise en contact avec le sérum du patient à volume égal pendant 20 minutes dans un bain-marie à 37°C sous agitation douce.

La réaction est arrêtée par addition de PBS froid. Le mélange est centrifugé à 3500 tours par minute pendant 10 minutes.

Le culot est repris par le volume initial de PBS.

#### 3.1.3.3. Préparation de la suspension cellulaire

Elle est identique à celle pratiquée pour le test de chimioluminescence. La concentration finale est ajustée à  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml.

### 3.1.3.4. Préparation de la solution de ferricytochrome C

La solution de cytochrome C est préparée chaque jour, au moment de l'emploi, à une concentration de 20 mg par ml. Le cytochrome C est dissout dans du tampon de KREBS RINGER.

### 3.1.3.5. Préparation de la solution de SOD

La solution de SOD est à la concentration de 1 mg/ml Elle est préparée au moment de l'emploi. La SOD est dissoute dans une solution de KREBS RINGER.

### 3.1.3.6. Protocole

Nous travaillons avec  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml, soit  $2,5 \cdot 10^6$  PNN sous 0,5 ml.

Le Streptocoque A est opsonisé par du sérum témoin frais. L'essai comporte une série de trois tubes :

- . Un pour le blanc
- . Un pour les polynucléaires neutrophiles stimulés
- . Un pour les polynucléaires neutrophiles en présence de SOD.

TUBES	PNN	Krebs	Cyt. C	strepto A cpto.	SOD
1					
Blanc	-	0,9 ml	0,1 ml	-	-
2					
PNN stimulés	0,5 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,2 ml	-
3					
PNN + SOD	0,5 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,1 ml

On laisse incuber pendant 30 minutes au bain-marie à 37°C sous agitation douce.

La réaction est arrêtée en mettant les tubes dans de la glace pilée pendant 10 minutes.

On réalise ensuite une centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes.

Le surnageant est prélevé puis dilué au 1/3 dans une solution de Krebs - Ringer (0,4 ml de surnageant + 0,8 ml de Krebs).

La lecture se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm. Le zéro est fait avec de l'eau distillée.

### 3.1.3.7. Calculs

$$\frac{(\text{DO tube 2} - \text{DO tube 1}) - (\text{DO tube 3} - \text{DO tube 1})}{21,1 \times \text{nombre de PNN}} \times 3000$$

unité = nmole  $\text{O}_2^-$  /  $10^6$  PNN pendant 30 minutes.

21,1 = coefficient d'extraction

3000 = 1000 pour ramener au nmole

et x 3 (dilution au 1/3 du surnageant)

## 3.2. ANALYSE DE CERTAINS PARAMETRES DE LA TECHNIQUE

La méthode de dosage des anions superoxydes utilisée en routine au laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon, dérive de celle de BABIOR (1973). Elle est définie pour le Zymosan.

Avant d'appliquer ce protocole au Streptocoque A, nous avons étudié l'influence du nombre de germes et du nombre de polynucléaires neutrophiles sur le dosage d' $\text{O}_2^-$

### 3.2.1. Résultats

#### 3.2.1.1. Influence du nombre de germes

Nous avons testé trois suspensions bactériennes de densité optique différentes : 0,300 - 0,500 - 1,000.

Les essais sont réalisés avec  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml.

L'opsonisation est faite par du sérum témoin frais.

La figure 20 donne les résultats obtenus. Il apparaît que plus le nombre de germes augmente, plus la quantité d' $O_2^-$  produite augmente.

Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de travailler avec une densité optique de 0,500 (dilution au 1/6e  $d = 550$  nm) soit avec  $10^8$  germes/ml.

### 3.2.1.2. Influence du nombre de polynucléaires neutrophili

La production de superoxydes dépend du nombre de particules phagocytées et du nombre de phagocytes.

Les travaux de ROSEN (1976) montrent que la relation  $O_2^-$  (nombre de polynucléaires neutrophiles linéaire pour des concentrations de 0 à  $5 \cdot 10^5$  PNN/ml).

Pour avoir des résultats comparables, il faut se situer dans une même zone de concentration.

Nous avons donc travaillé avec des concentrations se situant entre  $3,7 \cdot 10^6$  PNN/ml et  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml.

### 3.2.2. Protocole retenu

Le Streptocoque A, en suspension dans du PBS, est utilisé à une concentration de  $10^8$  germes/ml, correspondant à une densité optique de 0,500 (dilution au 1/6e).

L'opsonisation est effectuée comme pour le test de chimioluminescence. Les polynucléaires neutrophiles sont utilisés à une concentration entre  $3,7$  et  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml. Ils sont en suspension dans une solution de KREBS RINGER.

Le cytochrome C est à la concentration de 20 mg/ml dans du tampon KREBS. Le SOD, à une concentration de 1 mg/ml en tampon KREBS.

La distribution des réactifs se fait suivant le tableau récapitulatif du paragraphe 3.1.3.6.

### 3.2.3. Etude de la reproductibilité

L'étude de la reproductibilité du dosage de l'anion superoxyde a été réalisée sur le sérum décomplémenté par rapport au sérum frais.

L'étude porte sur sept essais.

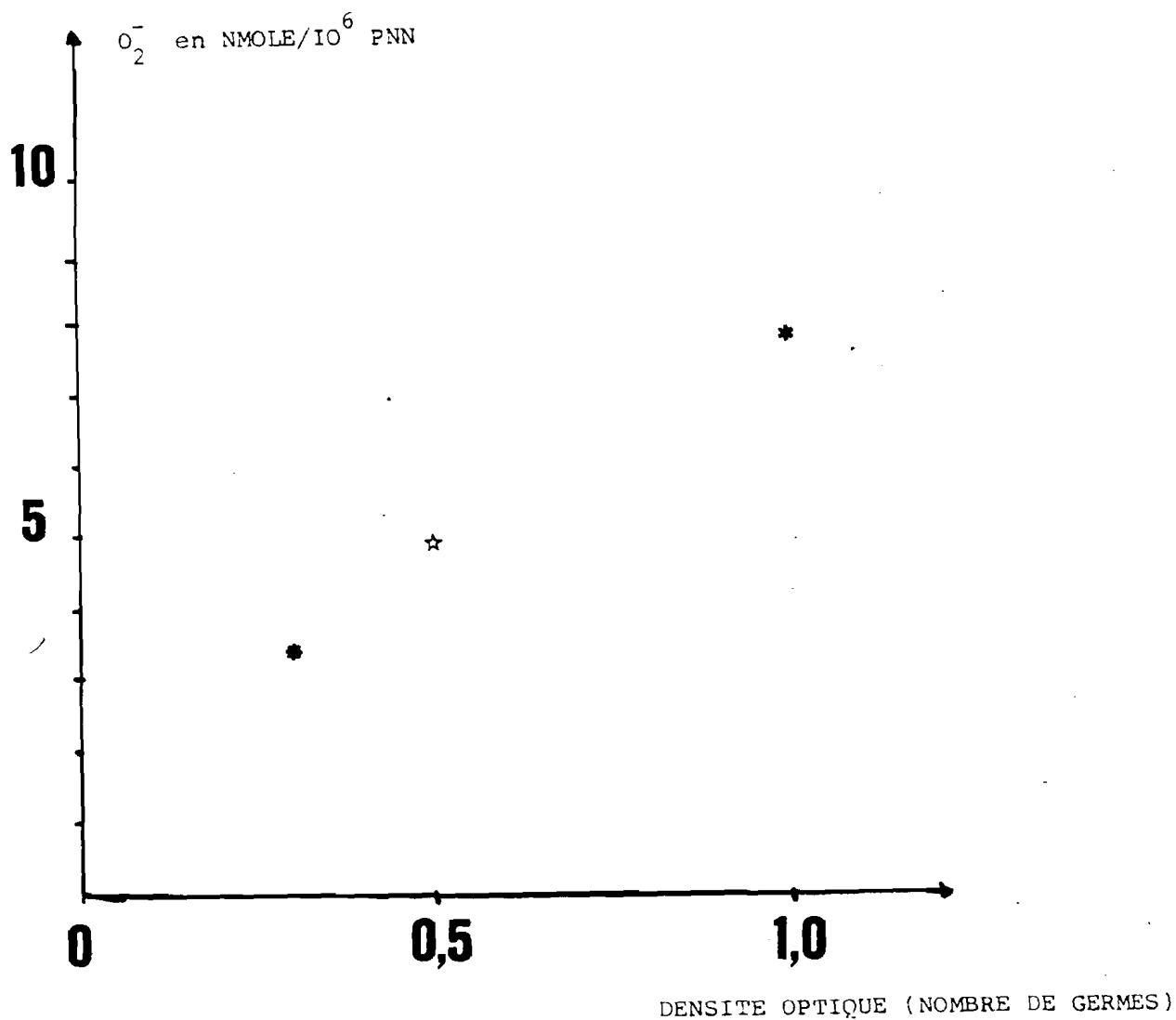


Figure 20

Influence du nombre de germes (DO) sur le dosage des anions superoxydes

- Moyenne de 3 essais effectués avec une DO de 0,300
- ☆ Moyenne de 3 essais effectués avec une DO de 0,500
- \* Moyenne de 3 essais effectués avec une DO de 1,000
-



L'examen du tableau XIV montre un écart type et un coefficient de variation très élevés.

Il met en évidence l'imprécision de la technique.

TABLEAU XIV

ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'ANION SUPEROXYDE

SERUM FRAIS $O_2^-$ en nmole/ $IO^6$ PN/30mn	SERUM DECOMPLEMENTE $O_2^-$ en nmole/ $IO^6$ PN/30mn	SERUM DECOMPLEMENTE en % / sérum frais
5,54	2,55	46
4,82	1,07	22
4,19	1,84	44
2,49	1,59	64
2,63	1,94	73
2,34	1,50	64
5,25	1,53	29

	nb ESSAIS	MOYENNE %	ECART TYPE	COEFFICIENT de variation
SERUM	7	49	17,68	36
DECOMPLEMENTE				

$$CV = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

### 3.3. APPLICATION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE OPSONISANTE DE PREPARATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

Nous avons testé par le dosage des anions superoxydes quatre préparations d'immunoglobulines.

#### 3.3.1. Préparations d'immunoglobulines testées.

Nous avons étudié l'activité opsonisante de :

- . La Gamma I6<sup>r</sup>
- . La Veinoglobuline<sup>r</sup>
- . La Gammaglobuline à I6,5% du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon
- . La Diammaglobuline<sup>r</sup>

Les principales caractéristiques de ces immunoglobulines sont données dans le paragraphe 2.3.1.1.

#### 3.3.2. Méthode

Le protocole est le même que celui décrit dans le paragraphe 3.2.2.

#### 3.3.3. Résultats

Sept populations de polynucléaires neutrophiles ont été utilisées.

Chaque essai comporte l'opsonisation du germe par les 4 préparations d'immunoglobulines (à 5%) en absence et en présence de complément apporté par du sérum frais.

On réalise simultanément une opsonisation du germe par du sérum témoin frais et du sérum témoin décomplémenté qui servent de référence.

On mesure les densités optiques au VITATRON à 515 nm. Les résultats sont calculés suivant l'équation donnée dans le paragraphe 3.1.3.7. Ils sont exprimés en nmole d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> / 10<sup>6</sup> PNN pendant 30 minutes (tableau XV) et en pourcentage par rapport au sérum frais (tableau XVI).

TABLEAU XV  
 RESULTATS DU DOSAGE D'ANION SUPEROXYDE  
 ESSAIS EFFECTUES SUR LES PREPARATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

<u>ESSAI 1</u>	SF	SD	G16	G16+SF	V	V+SF	TS I6	TSI6+SF	D	D+SF	MOYENNE
blanc	0,417	0,357	0,337	0,363	0,375	0,367	0,345	0,345	0,341	0,349	<u>0,359</u>
PN stimulés	0,445	0,419	0,407	0,403	0,425	0,457	0,421	0,443	0,431	0,425	PN = 4.10 <sup>6</sup> /m.
PN+SOD	0,367	0,383	0,367	0,355	0,397	0,375	0,367	0,349	0,381	0,343	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5,54	2,55	2,84	3,41	1,99	5,82	3,83	6,68	3,55	5,82	
<u>ESSAI 2</u>											
blanc	0,215	0,325	0,205	0,241	0,273	0,325	0,354	0,355	0,391	0,340	<u>0,302</u>
PN stimulés	0,415	0,359	0,385	0,395	0,375	0,447	0,369	0,374	0,402	0,420	PN = 5,3.10 <sup>6</sup> /:
PN+SOD	0,325	0,339	0,359	0,311	0,365	0,389	0,341	0,322	0,368	0,348	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4,82	1,07	1,39	4,50	0,64	3,11	1,50	2,78	1,82	3,86	
<u>ESSAI 3</u>											
blanc	0,230	0,261	0,280	0,219	0,283	0,225	0,247	0,261	0,251	0,293	<u>0,255</u>
PN stimulés	0,391	0,344	0,346	0,342	0,335	0,363	0,365	0,391	0,339	0,363	PN = 4.10 <sup>6</sup> /m.
PN+SOD	0,332	0,318	0,305	0,295	0,303	0,265	0,267	0,285	0,309	0,275	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4,19	1,84	2,91	3,34	2,27	6,96	6,96	7,50	2,13	6,25	
<u>ESSAI 4</u>											
blanc	0,356	0,383	0,492	0,354	0,358	0,392	0,379	0,395	0,393	0,383	<u>0,388</u>
PN stimulés	0,376	0,398	0,407	0,485	0,444	0,439	0,417	0,437	0,515	0,451	PN = 4,1.10 <sup>6</sup>
PN+SOD	0,340	0,375	0,384	0,391	0,420	0,383	0,387	0,401	0,479	0,403	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,49	1,59	1,59	6,51	1,66	3,88	2,08	2,49	2,49	3,32	
<u>ESSAI 5</u>											
blanc	0,327	0,342	0,322	0,356	0,341	0,331	0,417	0,334	0,322	0,324	<u>0,341</u>
PN stimulés	0,405	0,430	0,409	0,436	0,404	0,433	0,448	0,432	0,439	0,464	PN = 4,1.10 <sup>6</sup>
PN+SOD	0,370	0,402	0,376	0,369	0,390	0,356	0,405	0,355	0,374	0,359	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,63	1,94	2,28	4,64	0,97	3,60	2,98	5,34	4,50	7,28	
<u>ESSAI 6</u>											
blanc	0,387	0,431	0,393	0,345	0,365	0,340	0,431	0,380	0,341	0,409	<u>0,382</u>
PN stimulés	0,386	0,537	0,447	0,439	0,473	0,474	0,537	0,456	0,415	0,479	PN = 3,4.10 <sup>6</sup>
PN+SOD	0,355	0,519	0,428	0,371	0,417	0,405	0,519	0,399	0,377	0,417	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,34	1,50	1,58	5,68	1,00	5,77	1,50	4,76	3,17	5,18	

Nous n'insisterons pas sur l'interprétation des résultats obtenus en raison de la mauvaise reproductibilité et de la non fiabilité de la méthode utilisée.

En absence de complément, la Gamma 16<sup>r</sup>, la Diammaglobuline<sup>r</sup> et la TSI6 ont une assez bonne activité opsonisante (58% - 89%) par rapport au sérum décomplémenté (49%) contrairement à la Veinoglobuline<sup>r</sup> (38%).

En présence de complément apporté par le sérum frais, l'activité opsonisante de ces préparations d'immunoglobulines est nettement supérieure à celle du sérum frais.

°                    °  
°

## **D**ISCUSSION



Les recommandations de l'OMS ainsi que des études récentes sur les mécanismes de la résistance à l'infection par des cocci gram positif ont déterminé le choix de notre sujet de travail.

Nous avons, à partir d'un protocole de base utilisé en routine au laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon pour l'étude de l'activité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles vis à vis des staphylocoques, défini un protocole adapté aux streptocoques du groupe A qui, selon les souches, activent soit la voie classique, soit la voie alterne du complément (COLOMB, 1983).

Les deux techniques que nous avons étudiées sont la chimioluminescence et le dosage des anions superoxydes.

Une concentration de  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml est suffisante pour avoir une phagocytose mesurable en chimioluminescence.

La suspension bactérienne est ajustée à une densité optique de 0,500 (dilution au 1/6e) correspondant à  $10^8$  CFU/ml. Dans de précédents travaux, nous avons comme densité optique de travail 0,750. Mais, en multipliant les essais, nous avons remarqué qu'une densité optique de 0,500 nous donnait des résultats acceptables.

Le luminol, amplificateur de la réaction, sera utilisé à la concentration de  $2 \cdot 10^5$  M.

Une fois commencée, la technique doit être poursuivie sans interruption. Les cellules doivent être manipulées de façon très douce, plus particulièrement pendant la resuspension des leucocytes obtenue par centrifugation.

Le problème majeur qui se pose est celui de la conservation des polynucléaires. Certaines populations de polynucléaires neutrophiles présentent une diminution d'activité dans les heures qui suivent le prélèvement. Cette diminution d'activité semble liée à l'agrégation des polynucléaires neutrophiles (ANDERSON, 1979).

Ce phénomène n'est pas constant et les polynucléaires neutrophiles de chaque donneur de sang se comportent différemment.

La récente commercialisation par BOEHRINGER-MANNHEIM FRANCE SA d'un milieu essentiel minimum pour la chimioluminescence devrait aider à résoudre ce problème (WROGEMAN, 1978).

Un autre point important est l'opsonisation des bactéries. Les polynucléaires neutrophiles sont porteurs de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour le C3b du complément. Ils se lient à la bactérie opsonisée par les immunoglobulines et le complément.

Cette interaction déclenche la phagocytose.

Dans certains déficits immunitaires, l'administration d'immunoglobulines permet d'assurer aux malades une immunité anti-infectieuse.

Les préparations d'immunoglobulines doivent répondre à des critères de tolérance et d'efficacité couvrant la neutralisation de l'antigène, le maintien d'une demi-vie biologique et le plein pouvoir d'interaction avec les récepteurs humoraux et cellulaires.

Les préparations d'immunoglobulines doivent donc présenter une bonne qualité anticorps et une bonne aptitude à l'opsonisation.

La concentration d'anticorps et l'intégrité du fragment Fc doivent pouvoir assurer leur fixation sur leurs récepteurs et permettre l'activation du complément par voie classique ou par voie alterne.

La mesure du caractère opsonisant quantifie une des plus importantes fonctions des gammaglobulines *in vivo*.

Nous avons testé cinq préparations d'immunoglobulines par le test de chimioluminescence. Les gammaglobulines à usage intramusculaire à 16,5% ont été ramenées à 5% en vue d'une comparaison avec les gammaglobulines à usage intraveineux (5%).

Effectué en absence de complément, ce test met en évidence l'activité opsonisante de ces préparations passant par l'activation des récepteurs Fc des polynucléaires.

Effectué en présence de sérum frais qui apporte le complément, il montre l'aptitude des préparations d'immunoglobulines à participer à l'activation du système complément et d'intervenir également par l'intermédiaire des récepteurs C3b.

La Gamma 16<sup>r</sup> et la Diammaglobuline<sup>r</sup>, à usage intramusculaire, sont préparées par la méthode de COHN qui est un fractionnement à l'alcool. Ce mode de préparation respecte l'activité et la structure de la molécule anticorps.

La Gamma 16<sup>r</sup> et la Diammaglobuline<sup>r</sup> ne contiennent que des immunoglobulines G intactes, de demi-vie normale, représentant tous les anticorps normalement présents chez les donneurs.

Les immunoglobulines à usage intraveineux subissent un mode de préparation plus complexe.

La Veinoglobuline subit un traitement à la plasmine. Les produits sont fractionnés à 60-70% et sont donc moins efficaces que la Gamma 16<sup>r</sup> et la Diammaglobuline<sup>r</sup>.

Mais la voie intraveineuse présente plusieurs avantages par rapport à la voie intramusculaire :

- elle est moins douloureuse
- elle permet l'administration de doses élevées en une seule fois.
- elle prévient la dégradation locale des immunoglobulines G dans le dépôt musculaire, avant leur passage dans la circulation.
- elle permet d'atteindre plus rapidement les sites effecteurs et cause moins d'effets secondaires. (NYDEGGER, 1983).

Les échantillons d'immunoglobulines du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon nous ont été directement fournis par ce centre. Elles sont à usage intramusculaire (I6,5%) et intraveineux (5%).

Les immunoglobulines à I6,5% subissent le même procédé de fabrication que la Gamma 16<sup>r</sup> et la Diammaglobuline<sup>r</sup>.

Celles à 5% subissent un traitement à pH acide (pH 4), permettant d'obtenir des immunoglobulines G intactes, sans activité anticomplémentaire.

Dans notre étude, ces deux préparations d'immunoglobulines du centre de transfusion sanguine de Lyon présentent un pouvoir opsonisant au moins équivalent à celui de la Gamma 16<sup>r</sup>, et un peu plus faible que celui de la Diammaglobuline<sup>r</sup>.

La faible activité de la Veinoglobuline<sup>r</sup> par rapport aux autres préparations d'immunoglobulines testées peut être attribuée au traitement par la plasmine qu'elle a subi. Les immunoglobulines traitées par la plasmine présentent un fragment Fc ayant perdu son activité biologique (MOLLER, 1984).

La Veinoglobuline ne peut ainsi assurer qu'une activation directe du complément par la voie alterne.

Les immunoglobulines intactes comme la Gamma 16<sup>r</sup>, la Diammaglobuline<sup>r</sup> et les gammaglobulines du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon, exercent leur activité opsonisante par l'action combinée du fragment Fc et du complément.

Ces immunoglobulines ont, en présence de complément, une meilleure activité opsonisante.

Ce qui confirme l'activité in vivo reconnue de ces préparations qui sont capables d'activer la réaction de défense de l'hôte.

Cette défense antibactérienne étant donc étroitement liée à l'activation du complément.



Les bactéries sont elles-mêmes capables de provoquer directement cette activation par un effet direct de leur paroi. Cette dernière joue un rôle important dans la réaction de défense puisqu'elle représente par ailleurs la cible sur laquelle va s'exercer l'activité opsonisante ou lytique du complément (COLOMB, 1983). Les bactéries vont, selon les souches, activer la voie alterne ou la voie classique du complément.

Nous avons réalisé des essais avec du sérum frais complexé :

- . soit par l'EDTA, qui, en chélatant  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ , bloque les deux voies d'activation du complément.

- . soit par l'EGTA qui, en chélatant  $\text{Ca}^{++}$ , inhibe seulement la voie classique.

Les essais réalisés avec le sérum témoin frais et le sérum témoin décomplémenté ont servi de référence.

Les résultats obtenus indiquent que l'opsonisation, dans le cas de la souche étudiée, est déclenchée à la fois par la voie alterne et la voie classique. Et il semblerait que la voie classique soit prépondérante.

Ainsi donc, la technique de chimioluminescence, une fois les paramètres de la méthode bien définis, est facile à mettre en oeuvre. Elle présente une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité. Elle est fiable. Dans le cadre des examens cliniques, elle reflète bien l'activité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles, ainsi que l'activité opsonisante des anticorps sériques des sujets sains et de préparations d'immunoglobulines injectables.

Le dosage des anions superoxydes permet une mesure quantitative de la libération de molécules impliquées dans le phénomène de chimioluminescence.

L'interaction entre les dérivés oxygénés actifs et les cellules phagocytaires induit l'activation d'une oxydase membranaire qui déclenche l'explosion respiratoire (BABIOR, 1982). L'anion  $\text{O}_2^-$  est formé par réduction de l'oxygène.

Une concentration de  $5 \cdot 10^6$  PNN/ml a été utilisée pour le dosage de l' $\text{O}_2^-$ . Les polynucléaires neutrophiles sont en suspension dans une solution de KREBS RINGER.

La suspension bactérienne est, comme pour la chimioluminescence, ajustée à une densité optique de 0,500 (au I/6e) à 515 nm.

La solution de ferricytochrome C est à 20 mg/ml dans du KREBS RINGER. La SOD est à la concentration de 1 mg/ml dans du KREBS RINGER. Les résultats obtenus dans notre étude montrent que le dosage des anions superoxydes semble moins adapté à la mesure de l'activité opsonisante. Il ne permet d'apprécier que l'excédent des anions  $O_2^-$  libéré à l'extérieur de la cellule phagocytaire.

Et la méthode présente en plus une mauvaise reproductibilité. Néanmoins, nous avons étudié le comportement de quatre préparations d'immunoglobulines.

En moyenne, les résultats obtenus avec le dosage d' $O_2^-$  suivent ceux de la chimioluminescence.

## CONCLUSIONS.

THESE SOUTENUE PAR Mademoiselle Maquette SYLLA

Les infections à *Streptococcus pyogenes* posent un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Elles peuvent être graves par elles-mêmes ou par l'apparition secondaire de complications.

La défense de l'organisme contre ces infections passe par la phagocytose et la destruction de ces bactéries. Les streptocoques du groupe A sont opsonisés par les immunoglobulines et le complément avant d'être ingérés et tués par les phagocytes.

Dans l'étude que nous avons présentée, nous avons mis au point une technique de chimioluminescence et de dosage des anions superoxydes adaptés aux streptocoques A et permettant d'évaluer *in vitro* l'activité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles et l'activité opsonisante des anticorps sériques.

Les différents paramètres ont été analysés et optimisés.

Le test de chimioluminescence a permis de montrer que l'opsonisation du Streptocoque AM6/S43 est à la fois déclenchée par l'activation de la voie alterne et celle de la voie classique.

La chimioluminescence et le dosage des anions superoxydes ont été appliqués à l'étude de l'activité opsonisante de cinq préparations d'immunoglobulines.

En présence de complément, ces immunoglobulines présentent une activité opsonisante remarquable. Ce qui confirme l'activité reconnue de ces préparations.

Il apparait que ces deux techniques permettent d'apprécier la bioactivité des préparations d'immunoglobulines injectables.

Ces préparations, surtout celles destinées à l'usage intraveineux, doivent présenter une activité modulée qui leur assure l'efficacité nécessaire pour amplifier *in vivo* les réactions de défense de l'hôte, médiées par les immunoglobulines et le complément sans risquer d'induire une activité non spécifique du complément.

Cette étude montre que les tests de chimioluminescence et de dosage des anions superoxydes constituent un moyen de contrôle *in vivo* de l'activité des préparations d'immunoglobulines injectables et apporte un argument en faveur de leur intérêt en thérapeutique.

Vu, le Directeur de la Thèse,

---

---

## R É S U M É

---

---

La chimioluminescence et le dosage des anions superoxydes permettent d'évaluer *in vitro* l'activité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de sujets souffrant de différentes anomalies dans leurs mécanismes de défense et d'étudier l'activité opsonisante des anticorps sériques.

Nous avons adapté ces deux techniques à Streptococcus pyogenes en analysant les différents paramètres et en les optimisant.

La chimioluminescence a permis d'étudier la voie d'activation du complément mise en jeu dans l'opsonisation de Streptococcus pyogenes. Nous avons appliqué la chimioluminescence et le dosage des anions superoxydes à l'étude de l'activité opsonisante de cinq préparations d'immunoglobulines utilisées comme médication supplétive chez des sujets présentant des hypo ou agammaglobulinémies : la Gamma 16<sup>rt</sup>, la Veinoglobuline<sup>rt</sup>, les gammaglobulines du Centre de Transfusion Sanguine de Lyon (16,5% et 5%) et la Diammaglobuline<sup>rt</sup>.

Pratiqué sur dix populations de polynucléaires neutrophiles provenant de donneurs sains, le test de chimioluminescence montre une activité opsonisante en présence et en absence de complément vis à vis de Streptococcus pyogenes. Cette activité diffère selon le mode de préparation des immunoglobulines. Le dosage des anions superoxydes a confirmé les résultats obtenus en chimioluminescence. Cette étude confirme l'activité reconnue de ces préparations d'immunoglobulines et leur intérêt en thérapeutique.

# REFERENCES **b**IBLIOGRAPHIQUES

---

---

1. ALLEN R.C., STJERNHOLM R.L., STELLA R.H.  
Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 47, 679-684
2. ANDERSON B.R. and AMIRAUULT H.J.  
Important variables granulocyte chemiluminescence  
*Proc. Soc. exp. biol. med.*, 1979, 162, 139-145
3. BABIOR B.M.  
The production of superoxide by neutrophils.  
In *Phagocytosis. Past and Future.*  
p. 157-166. Copyright 1982 by Academic Press. Inc.
4. BABIOR B.M., KIPNES R.S., CURNUTTE J.T.  
The production by leukocytes of superoxide, a potential bacterial agent.  
*J. Clin. Invest.*, 1973, 52, 741-744
5. BALDRIDGE C.W. and GERARD R.W.  
The extra respiration of phagocytosis.  
*Am. J. Physiol.*, 103, 235, 1933.
6. BEACHEY E.H. and CUNNINGHAM M.  
Type specific inhibitor of preopsonization versus immunoprecipitation by streptococcal M protein.  
*Infect. Immun.* 8, 1973, 19-24.
7. BEACHEY E.H. and STOLLERMAN G.H.  
Toxic effect of streptococcal M protein on platelets and polymorphonuclear leukocytes in human blood.  
*J. Exp. Med.* 134, 1971, 351-365
8. BEACHEY E.H. and STOLLERMAN G.H.  
Mediation of cytotoxic effects of streptococcal M protein by non type specific antibody in human sera.  
*J. Clin. Invest.* 1973, 52, 2563-2570
9. BERTRAND Ed. et N'DORI R.  
*Les valvulopathies rhumatismales en Afrique : situation et problèmes épidémiologiques.*  
19e congrès international des médecins de langue française  
10-14 avril 1984, Edition Bordeaux Médical 1985, p 87-100
10. BING D.H.  
The interaction of immune serum globulin and immune globulin intravenous with complement.  
*Molecular Immunology*, vol. 20, 1983, n 8, 893-900.
11. BJORNSON A.B. and MICHAEL J.G.  
Factors in normal human serum that promote bacterial phagocytosis.  
*J. Infect. Dis.*, 1973, 128, 5, 182

12. BREMARD C., OURY  
*La Revue du Praticien, tome XXXV n° 4*  
 CANDO AH 32 p. 3f. Internat 21.3.02
13. CHRISTENSEN P.  
*The streptococcal immunoglobulin receptor*  
 University of Lund, Lund 1976.
14. CHRISTENSEN P., JOHANSEN B.G., KRONVALL G.  
*Interaction of streptococci with the Fc fragment of IgG.*  
*Acta path. microbiol. scand. sect. C84, 1976, 73-76*
15. COLOMB M.G., BENZA J.C., CHESNE S., AUBERT B.  
*Interaction entre le système complémentaire et les parois bactériennes.*  
*Bull. europ. Physiopath. resp., 1983, 19, 131-136*
16. CURNUTTE J.T. and BABIOR B.M.  
*Biological defense mechanisms. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes.*  
*J. Clin. Invest., 5, 1662, 1974.*
17. DE CHATELET L.R., MC CALL C.E., COOPER M.R. and SHIRLEY P.S.  
*Ascorbic acid levels in phagocytic cells.*  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 145, 1170.*
18. DEWALD B., BAGGIOLINI M., CURNUTTE J.T. and BABIOR B.M.  
*Subcellular localization of the superoxide forming enzyme in human neutrophils*  
*J. Clin. Invest., 1979, 63, 21.*
19. DRATH D.B. and KARNOVSKY M.L.  
*Bactericidal activity of metal mediated peroxide ascorbate systems.*  
*Infect. immun., 10, 1077, 1976.*
20. ESSER A.F.  
*Interactions between complement proteins and biological and model membranes.*  
*In Biological Membranes, 1982, vol. 4, 277-325*  
 Ed. Chapman
21. FAURE M.  
*Chimiotaxie du polynucléaire neutrophile. Physiologie. Aspects pathologiques. Sa place dans le processus de phagocytose.*  
*Thèse de doctorat en médecine, Lyon, 1978.*
22. FINCH S.C.  
*Granulocyte disorders benign, quantitative disorders of granulocytes in hematology.*  
 New York, 1972, 628.
23. FISCHETTI V.A.  
*Requirements for the opsonic activity of human IgG directed to type 6 group A streptococci : net basic charge and intact Fc region.*  
*J. immunol. vol 130 n°2, 1983, 896-901.*



24. FOLEY M.J. and WOOD W.B. JR.  
*Studies on the pathogenicity of group A streptococci*  
 II. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel.  
*J. Exp. Med.*, 110, 617, 1959.
25. FORSGREN A. and QUIE P.G.  
*Effects of staphylococcal protein A on heat labile opsonins*  
*J. Immunol.* 112 (1974) 1177-1180.
26. GIGLI J. and NELSON R.A. Jr  
*Complement dependent immune phagocytosis.*  
 I. requirements for C1, C4, C2, C3.  
*Exp. Cell. Res.*, 51, 45, 1968.
27. GOLDSTEIN I.M., KAPLAN H.B., RADIN A. and FROSCH M.  
*Independent effects of IgG and complement upon human polymorpho-nuclear leukocyte function.*  
*J. Immunol.*, 117, 1282, 1976.
28. GOLDSTEIN I.M., ROOS D., KAPLAN H.B. and WEISSMAN G.  
*Complement and immunoglobulin stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis.*  
*Clin. Invest.* 56, 1155, 1975.
29. HEMMING V.G., HAIL R.T., RHODES P.G., SHIGEOKA A.O and HILL H.R.  
*Assessment of group A streptococcal opsonins in human and rabbit serum by neutrophil chemiluminescence.*  
*J. Clin. Invest.*, 1976, 58, 1379-1387
30. HORAUD T.  
*Streptococcaceae*  
*in "Bactériologie Médicale" Léon LE MINOR, M. VERON*  
*Editions Flammarion, Paris, 1982, pp 529-549*
31. JASIN H.E.  
*Human heatlabile opsonins : evidence for their mediation via the alternate pathway of complement activation.*  
*J. Immunol.*, 109, 26, 1972.
32. JOHNSTON R.B., KLEMPERES M.R., ALPEN C.A. and ROSEN F.  
*The enhancement of bacterial phagocytosis by serum. The rôle of complement components and two cofactors.*  
*J. Exp. Med.*, 129, 1275, 1969.
33. JOHNSTON R.B. and STROUD R.M.  
*Complement and host defense against infection*  
*J. Pediatr.* 1977, 90, 169-179
34. KELLER H.V., WILKINSON P.C., ABERCOMBIE M., BECKER E.L., HIRSCH J.G. MILLER M.E., RAMSEY W.S., ZIGMOND S.H.  
*A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells.*  
*Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 27, 377-380

35. LEFFELL M.S. and SPITZNAGEL J.K.  
*Role of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytosing human neutrophils : effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on beads.*  
*Infect. Immun.* 12, 813, 1975.
36. LEHRER R.I.  
*Effects of colchicin and chloramphenicol on the oxidative metabolism and phagocytic activity of human neutrophils.*  
*J. Infect. Dis.*, 127, 40, 1973.
37. METCHNIKOFF E.  
*Immunity in infectious diseases*  
 Johnson reprint, New York, 1968, 28.
38. MICHELL R.H., PANCAKE S.J., NOSE WORTHY J. and KARNOVSKY M.  
*Measurement of rates of phagocytosis, the use of cellular monolayers.*  
*J. Cell. Biol.*, 40, 216, 1969.
39. MILLER T.E.  
*Killing and lysis of gram negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme.*  
*J. Bacteriol.*, 98, 949, 1969.
40. MOLLER R.J., BRANDSLUND I. and SVEHAG S.E.  
*In vitro investigations of human immunoglobulin preparations Fc receptor reactivity and complement consumption.*  
*Acta Path. microbiol. immunol. scand.*, sect C, 92, 335-340, 1984
41. MUDDS Mc., CUTCHEAN M. and LUCKE B.  
*Phagocytosis.*  
*Physiol. Rev.*, 14, 210, 1934.
42. MUSCHEL L.H., FONG J.S.C.  
*Serum bactericidal activity and complement.*  
*in : Comprehensive immunology vol 2 R.A. Good and S.B. Day eds Plenum Press., New York, 1977, pp 137-158.*
43. NYDEGGER V.E.  
*Critères d'évaluation des préparations d'immunoglobulines G intraveineuses.*  
*La Presse Médicale*, 1983, 12, 2619-2624.
44. PICARD C.  
*Mise au point d'une technique de chimioluminescence appliquée à l'étude de l'activité opsonisante de sérums après vaccination anti pneumococcique.*  
*Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Lyon, 1985.*
45. RABINOVITCH M.  
*Phagocytosis : the engulfment stage*  
*Serv. Hematology S 134, 1968.*

46. RAICHVARG D., AGNERAY J.  
Opsonisation et immunité.  
4e colloque international de biologie prospective  
Ann. biol. clin., 1978, 36, 149-334
47. REBUCK J.W. and CROWLEY J.H.  
A method of studying leukocyte functions in vivo  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 59, 757, 1955.
48. ROOT R.K. and METCALF J.A.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis :  
relationship to superoxide anion formation and cellular catabo-  
lism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : studies with normal and cytocholasin B treated  
cells.  
J. Clin. Invest., 57, 1352, 1977.
49. ROSEN H. and KLEBANOFF S.J.  
Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase  
deficient leukocytes.  
J. Clin. Invest., 58, 50, 1976.
50. ROTTA J.  
Etat actuel des infections streptococciques de groupe A et  
leurs complications.  
Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, Prague, Tchécoslovaquie  
Presented at the conference "le diagnostic au laboratoire des  
infections streptococciques et leurs complications" organized  
by the "Institut Pasteur de Lyon" on 2 June 1980.
51. ROTTA J.  
Streptococcal M. vaccine  
Information for WHO, mars 1983.
52. SBARRA A.J. and KARNOVSKY M.L.  
The biochemical basis of phagocytosis.  
In metabolic changes during the ingestion of particles by polymor-  
phonuclear leukocytes.  
J. Biol. chem., 234, 1355, 1959.
53. STEVENS P. and YOUNG L.S.  
In: Act. immun., 16, 796, 1977.
54. STOSSEL T.P.  
Phagocytosis.  
N. England. J. Med., 290, 717, 1974.
55. STOSSEL T.P.  
Phagocytosis.  
recognition and ingestion.  
Semin. Hematol., 1975, 12, (1), 83-116.
56. SYLLA M.  
Chimiluminescence appliquée au Streptocoque A pour l'étude  
de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles humains  
Mémoire de DEA d'Immunologie, Lyon, 1984.

57. TANAKA Y. and GOODMAN J.R.  
Electron microscopy of human blood cells.  
New York, 1972, 116.
58. TRUSH M.A., WILSON M.E. and VANDYKE K.  
The generation of chemiluminescence by phagocytic cells.  
In "Bioluminescence and chemiluminescence methods in enzymology".  
M.A. Deluca, Eds Academic Press, New York, San Francisco, London,  
1978, pp 462-495.
59. TYLEWSKA S., KLOSINSTA-KITA E. and MALINOWSKI W.  
Chemotactic activity of polymorphonuclear leukocytes to  
*Streptococcus pyogenes*.  
Zbl. Bakt. Hyg I. Abt. orig. A 241 (1978) 294-300.
60. TYLEWSKA S. and HRYNIEWICZ S.  
The role of M protein in phagocytosis.  
I. activity of some enzymes in phagocytic cells during infection  
with *Streptococcus pyogenes* in vivo.  
Zbl. Bakt. Hyg I. Abt. orig. A 245 (1979) 33-43
61. VANFURTH R.  
The origin and turn over of promonocytes and macrophages in  
normal mice, in mononuclear phagocytes.  
Van Furth R., Ed Blackwell Scientific, Oxford, 1970, chap. 10
62. WEENING R.S., WEVER R. and ROOS D.  
Quantitative aspects of the production of superoxyde radicals  
by phagocytosing human granulocytes.  
J. lab. Clin. Med., 85, 245.
63. WHO CHRONICLE  
Community control of rheumatic heart disease in developing  
countries : 1. A major public health problem.  
WHO Chronicle, 34? 336-345, 1980.
64. WILSON M.E., TRUSH L.A., VAN DYKE K., MULLETT M.D. and NEAL W.A.  
. 1977, *Pediatr. Res.*, 11, 496  
. Luminol dependent chemiluminescence analysis of opsonophago-  
cytic dysfunctions.  
*J. Immunol. Methods.*, 1978, 23, 315-326
65. WRIGHT A.E. and DOUGLAS S.R.  
An experimental investigation of the role of blood fluids  
in connection with phagocytosis.  
*Proc. R. Soc. London, Ser B.*, 72, 357, 1903.
66. WROGEMANN K. et al. EV.  
*J. Immunol.*, 8, 749-752, 1978.

# SERMENT DE Galien.

**J**e jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui l'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;

**D'** exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine;

**E**n aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels;

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque .

\*\*\*

---

---

TABLE DES MATIÈRES

---

---

	<u>Pages</u>
Introduction .....	1
Chapitre I - Rappels bibliographiques .....	2
1. Les streptocoques du groupe A ou <i>Streptococcus pyogenes</i> ...	3
1.1. Caractères morphologiques et cultureux .....	3
1.2. Structure antigénique .....	5
1.3. Pouvoir pathogène .....	11
1.4. Epidémiologie .....	13
1.5. Prophylaxie .....	18
2. La phagocytose .....	20
2.1. Les cellules de la phagocytose .....	20
2.2. Les différentes étapes de la phagocytose .....	21
2.3. Pathologie de la phagocytose .....	34
2.4. Méthodes d'exploration de la phagocytose .....	36
Chapitre II - Travail personnel .....	40
1. Introduction .....	41
2. Etude de l'opsonisation du streptocoque A par chimiolumi- nescence .....	42
2.1. Matériel et méthode .....	42
2.2. Analyse des différents paramètres de la technique et optimisation .....	50
2.3. Application à l'étude de l'activité opsonisante de préparations de gammaglobulines .....	64
2.4. Application à l'étude de la voie d'activation du complément mise en jeu dans l'opsonisation du streptocoque A .....	71
3. Etude de l'opsonisation du streptocoque A par le dosage des anions superoxydes .....	76
3.1. Matériel et méthode .....	76
3.2. Analyse de certains paramètres de la technique.....	79
3.3. Application à l'étude de l'activité opsonisante de préparations de gammaglobulines .....	83
Discussion .....	87
Conclusions .....	93
Références bibliographiques .....	96