Etude Critique des Tests d’Activité Immunosuppressive des Sérums Anti-Lymphocytaires Utilisés en Transplantation Renale

J-P REVILLARD, J L TOURAINE, J BROCHIER, F BERTHOUX, D FRIES et J TRAEGGER
Clinique Universitaire de Néphrologie et des Maladies Métaboliques, Hôpital de l’Antiquaille, Lyon, France

Les sérums antilymphocytaires (SAL) exercent une activité immunosuppressive très intense chez l’animal. Cet effet peut se mesurer dans différents systèmes expérimentaux: survie des greffes cutanées allogéniques ou xénogéniques, survie des organes transplantés, suppression des réactions locales ou systémiques d’hypersensibilité retardée, des phénomènes auto-immuns (encéphalomyélite allergique, arthrite des adjuvants), des réactions du greffon contre l’hôte, enfin diminution de la réponse primaire appréciée par le taux d’anticorps humoraux ou le nombre de cellules productrices d’anticorps. Les expériences chez l’animal nous apprennent que l’effet observé dépend de la dose de SAL, du mode d’injection et du moment d’injection par rapport à la stimulation antigénique, enfin des propriétés du SAL lui-même. On sait en outre que dans des conditions d’administration parfaitement définies, un même SAL peut se révéler plus actif dans l’un des tests choisis que dans d’autres systèmes de mesure (Perper, 1970).

Selon ces données expérimentales, on peut s’attendre à de grandes difficultés dans l’évaluation de l’effet immunosupresseur d’un SAL humain. Certains sérums antilymphocytes humains sont capables de prolonger la survie des allogreffes cutanées chez le singe et le chimpanzé et une corrélation satisfaisante a pu être établie entre cette propriété et certains effets in vitro de ces SAL, notamment l’inhibition du phénomène de rosettes. Une telle corrélation entre une activité in vitro mesurée sur des lymphocytes humains et un effet in vivo apprécié chez le singe suggère fortement que les deux méthodes mesurent effectivement le pouvoir immunosupresseur du SAL étudié. Notre travail se propose d’essayer de vérifier cette hypothèse, en précisant la valeur de certains critères d’activité immunosuppressive chez l’homme, notamment la suppression des réactions d’hypersensibilité retardée. Au cours de cette étude, nous avons très vite réalisé que la formation d’anticorps anti-protéines de cheval induite chez l’homme par des injections itératives de SAL, était susceptible de neutraliser une partie ou
la totalité des activités antilymphocytaires du SAL; dès lors il n’était plus possible de savoir si l’absence d’effet observé était due à la médiocre activité du SAL ou à la réponse immune du malade.

MATERIEL ET METHODES

A. PREPARATION DES SAL

Les SAL utilisés à Lyon depuis 1966 ont été préparés soit par l’Institut Pasteur soit par l’Institut Mérieux selon des méthodes déjà publiées (Carraz et al, 1970). L’antigène est habituellement la population lymphocytaire du canal thoracique obtenue par drainage du canal thoracique (Fries et al, 1970); d’autres sources d’antigène ont été utilisées de façon moins systématique: lymphocytes du sang (5 chevaux), du thymus frais ou congelé (2 chevaux) ou de l’amygdale (1 cheval). L’antigène est injecté mélangé à l’adjuvant de Freund complet ou à un adjuvant incomplet (alun); le protocole d’immunisation repose sur des injections itératives; les périodes de prélèvement s’échelonnent entre trois mois et trois ans après la sensibilisation. Après prélèvement par saignée ou plasmaphérèse, le sérum est décomplexé, adsorbé sur globules rouges humains; les globulines sont séparées par précipitation au sulfate d’ammonium (50% d’IgG) ou plus souvent avec rivanol-alcool (60 à 90% d’IgG).

Les contrôles suivants sont pratiqués systématiquement sur chaque lot: recherche de l’activité pyrogène chez le lapin, recherche des anticorps anti-plaquettaires (fixation du complément), antiprotéines humaines, agglutinines, hémolysines, composition électrophorétique, pouvoir, anticomplémentaire, effet trombopéniant chez la souris, recherche de la toxicité chez le singe macacus rhésus.

B. TESTS D’ACTIVITE IN VITRO


C. GREFFES DE PEAU CHEZ LE SINGE

Ce test réalisé systématiquement sur chaque lot de SAL est pratiqué selon une méthode très proche de celle de Balner et al (1969). Chez le macacus
Rhésus, 4 allogreffes à partir de deux donneurs différents et une autogreffe sont appliquées après un prétraitement de cinq injections journalières de 5 ml de SAL. Le traitement est poursuivi à raison de trois injections par semaine. Le temps moyen de survie des allogreffes chez les témoins non traités est de 9 jours (Bonneau et al, 1970).

D. TESTS D'HYPERSENSIBILITÉ RETARDEE (HSR) CHEZ LES MALADES

L'HSR est systématiquement étudiée avant et pendant le traitement au SAL, à l'aide d'injections intradermiques de 4 antigènes: tuberculeine, candidine, toxoplasmine et streptokinase. La technique et l'interprétation de ces tests ont déjà été publiés (Traeger et al, 1969; Touraine et al, 1970).

E. CULTURES DE LYMPHOCYTES

Les cultures de lymphocytes sont réalisées à concentration cellulaire constante (700 cellules/mm³) en sérum allogène selon une méthode déjà publiée (Revillard et Brochier, 1969, 1970). La réponse est mesurée par l'incorporation de thymidine trifluorée dans la fraction du culot cellulaire précipitable par l'acide trichloracétique. Les stimulants utilisés sont la phytohémagglutinine (PHA), les SAL ou des antigènes (tuberculeine, candidine, streptokinase).

F. GREFFES DE PEAU CHEZ L'HOMME

Ces greffes sont obtenues à partir de volontaires sains, après vérification de l'absence d'antigène australien dans leur sérum (précipitation en gel et électroimmunodiffusion). Elles sont pratiquées chez des malades non candidats à la transplantation, non préalablement transfusés (cross-match leucocytaire négatif). La méthode habituelle est celle de Rapaport et al (1965): greffes de toute l'épaisseur cutanée, en disques de 1 mm de diamètre assurés par 6 points. Récemment des greffes dermo-epidermiques non suturées nous ont paru préférables. La date du rejet est déterminée par l'étude de l'arrêt de la circulation capillaire à l'aide du stéréo-microscope Leitz.

G. DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-SAL


H. COURBES D'ELIMINATION PLASMATIQUE DES GAL MARQUÉES A L'IODE RADIOACTIF

Des IgG de cheval antilymphocytes humains sont marqués à l'iode 125 ou 131
par la méthode à l'iode monochlorure (MacFarlane, 1958; Helmkamp et al, 1967) avec moins d'un atome d'iode par molécule d'immunoglobuline. Nous utilisons la protéine en tampon borate pH 8 (10 à 15 mg/ml), une solution d'iode monochlorure saturée en chlorure de sodium (pH 1; 12, 5x10⁻⁴ M/l) et une solution d'iode radioactif sans entraîneur, sans réducteur, de forte activité volumique (¹²⁵I • S₁ ou ¹³¹I • S₃ ; CEA Saclay). La séparation de l'iode libre en excès se fait par passage sur une colonne 0, 9 x 30 cm (Pharma-ncia Suède) de Séphadex G25 (Zappacosta et al, 1967). Les contrôles biochimiques (électrophorèse sur cellogel, en gel de polyacrylamide et immuno électrophorèse) et immunologiques (test de lymphocytotoxicité) n'ont pas mis en évidence d'altération significative. Pour diminuer l'auto-irradiation (Berson et al, 1957; MacFarlane, 1965), la protéine est diluée dans une solution d'IgG antilymphocytaire stable ce qui ramène l'activité spécifique à 10 ou 20 μCi/mg. Après stérilisation par passage sur filtre millipore 0, 22μ, la dose traceuse est injectée par voie intraveineuse. Elle comprend 2 mg d'IgG marquée, et 2 mg d'IgG stable pour un volume de 10 ml et une radioactivité de 25 à 40 μCi. Cette radioactivité injectée est liée pour plus de 99% aux protéines comme en attestent les précipitations par l'acide phosphotungstique ou trichloracétique.

Les sujets testés reçoivent régulièrement une solution d'iodeure de potassium: 100 gouttes quotidiennes les deux jours avant l'épreuve, 50 gouttes le jour de l'injection, puis 20 gouttes tous les jours. Pour chaque sujet, des prélèvements sanguins sont pratiqués: 4mn, 8mn, 12mn, 2h, 4h, 6h, 12h, puis tous les jours pendant au moins dix jours après l'injection ainsi qu'un recueil quotidien d'urine.

La radioactivité plasmatique est exprimée en % de l'activité initiale calculée d'après les prélèvements de 4mn, 8mn, et 12mn.

La courbe de radioactivité urinaire cumulative est exprimée en % de la dose injectée, elle ne permet un contrôle de l'excrétion de l'iode que si les fonctions rénales sont normales.

**RESULTATS**

1. **DEFINITION DE L'ACTIVITE DE CHAQUE LOT DE SAL**

Le titre cytotoxique ne permet pas à lui seul de définir l'activité d’un SAL. En début d’immunisation, il s’élève en même temps qu’apparaît cette activité, mais au cours d’immunisations chroniques nous avons observé des exemples de 'decay phenomenen' avec diminution de l’activité immunosuppressive et maintien du titre cytotoxique. L’inhibition des rosettes permet de prévoir pour la plupart des SAL leur activité chez le singe (cf Tableau I et J F Bach et al, 1969). Le titre d’inhibition en culture mixte est en bonne correlation avec le titre d’inhibition des rosettes (Revillard et Brochier, 1970) et avec l’effet chez le singe; les exceptions sont cependant plus nombreuses que pour
Tableau I. Comparaison de l'activité de globulines antilymphocytaires préparées à partir de sérum de chevaux immunisés avec des lymphocytes humains, provenant de divers organes. Les titres in vitro, sont exprimés par l'inverse de la plus grande dilution active; l'activité in vivo chez le singe est mesurée par le jour du rejet, le jour 0 étant le jour de la greffe.

<table>
<thead>
<tr>
<th>SAL</th>
<th>origine antigène</th>
<th>titre cytotoxique</th>
<th>titre inhibition rosettes</th>
<th>titre inhibition culture mixte</th>
<th>greffes de peau singe</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Dam 1905</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>32 000</td>
<td>2 600</td>
<td>15 - 21</td>
</tr>
<tr>
<td>Dam 3906</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>16 000</td>
<td>1 200</td>
<td>17 - 30</td>
</tr>
<tr>
<td>Dam 0542</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>16 000</td>
<td>2 200</td>
<td>17 - 17</td>
</tr>
<tr>
<td>Dam 0640</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>8 000</td>
<td>700</td>
<td>13 - 17</td>
</tr>
<tr>
<td>Dam 0640</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>16 000</td>
<td>1 400</td>
<td>14 - 15</td>
</tr>
<tr>
<td>Dam 0645</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>12 000</td>
<td>3 000</td>
<td>14 - 15</td>
</tr>
<tr>
<td>Desir 0644</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>512</td>
<td>12 000</td>
<td>2 000</td>
<td>13 - 21</td>
</tr>
<tr>
<td>Mel 0870</td>
<td>canal thoracique</td>
<td>1024</td>
<td>16 000</td>
<td>2 600</td>
<td>14 - 16</td>
</tr>
<tr>
<td>P 0404</td>
<td>sang</td>
<td>1024</td>
<td>4 000</td>
<td>250</td>
<td>9 - 10</td>
</tr>
<tr>
<td>Bar 1904</td>
<td>sang</td>
<td>1024</td>
<td>16 000</td>
<td>6 000</td>
<td>15 - 15</td>
</tr>
<tr>
<td>Dé 2907</td>
<td>sang</td>
<td>512</td>
<td>2 000</td>
<td>250</td>
<td>13 - 15</td>
</tr>
<tr>
<td>Elab 4001</td>
<td>thymus</td>
<td>1024</td>
<td>32 000</td>
<td>4 000</td>
<td>21 - 23</td>
</tr>
<tr>
<td>Gam</td>
<td>amygdale</td>
<td>1024</td>
<td>4 000</td>
<td>-</td>
<td>15 - 21</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Le test des rosettes (Revillard et Brochier, 1970). L'ensemble des corrélations établies d'après notre expérience apparaît dans le Tableau I qui montre une plus grande fréquence de SAL actifs parmi ceux préparés à partir du thymus et des leucocytes du canal thoracique. A partir de ce tableau nous définissons arbitrairement un SAL 'actif' en fonction des critères suivants: cytotoxicité ≥ 1/512, inhibition des rosettes > 1/8000, inhibition de cultures mixtes > 1000 et prolongation des greffes de peau chez le singe jusqu'au 13e jour au moins.

340
Les sérums 'inactifs' sont négatifs pour l'ensemble de ces critères, les SAL 'douteux' sont positifs dans certains tests, négatifs dans d'autres tests.

2. TESTS D'ACTIVITÉ DES SAL CHEZ L'HOMME

Lymphopenie. Après une première injection IV ou IM d'un SAL actif, le nombre absolu de petits lymphocytes diminue dans le sang (Traeger et al., 1968; Revillard et Traeger, 1970), puis lorsqu'on répète les injections, on observe un phénomène d'échappement, de sorte qu'après 15 jours de traitement à la dose de 5 ml/jour, le taux de lymphocytes n'est pas significativement différent de celui mesuré avant traitement (Traeger et al., 1968). Il faut rappeler toutefois que cette étude a été réalisée chez des malades en insuffisance rénale chronique qui ont déjà une diminution significative de leur taux de lymphocytes (Revillard et al., 1970). En pratique on remarque que les SAL inactifs sont très peu lymphopéniant lors des premières injections et la mesure du rapport lymphocytes/plaquettes avant l'injection et 6 à 10 heures après donne une idée approximative mais utile du rapport activité/toxicité du SAL étudié. En revanche, lors d'un traitement prolongé nous n'avons constaté aucune corrélation entre le taux de lymphocytes et l'activité immunosuppressive.

Hypersensibilité retardée. Les sérums inactifs ou douteux n'ont jamais entraîné une négativation des intraderm réactions (Tableau II) tandis qu'aux mêmes doses les sérums actifs suppriment les réactions d'hypersensibilité retardée chez la plupart des malades. Les sérums préparés à partir de lymphocytes du sang sont moins efficaces que ceux préparés à partir de la

Tableau II. Effet de différents SAL sur les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) de malades traités pendant 7 à 15 jours aux doses de 5 ml par voie I.M., 6 ou 10 ml par voie I.V. Toutes les préparations testées sont ajustées à un titre cytotoxique de 1024. L'effet + correspond à la suppression des réactions cutanée, l'effet 0 à la persistance de réactions positives

<table>
<thead>
<tr>
<th>NOMBRE DE MALADES TRAITÉS AVEC</th>
<th>EFFET SUR HSR</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>SAL 'actif'</td>
<td>37</td>
</tr>
<tr>
<td>SAL 'inactif'</td>
<td>9</td>
</tr>
<tr>
<td>SAL 'douteux'</td>
<td>7</td>
</tr>
</tbody>
</table>

lymphe du canal thoracique ou du thymus (Tableau III). Chez certains malades dont les tests cutanés demeuraient positifs après 8 à 10 jours de traitement, l'augmentation de la dose de SAL, ou bien la substitution d'un lot plus actif

341
Tableau III. Effet de SAL de différentes origines sur les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR), voir légende du Tableau I

<table>
<thead>
<tr>
<th>NOMBRE DE MALADES TRAITÉS AVEC</th>
<th>EFFET SUR HSR</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>SAL (canal thoracique)</td>
<td>41</td>
</tr>
<tr>
<td>SAL (sang)</td>
<td>13</td>
</tr>
<tr>
<td>SAL (thymus)</td>
<td>2</td>
</tr>
</tbody>
</table>

aboutissait à la négativation des tests cutanés. Ces résultats sont obtenus au cours des deux premières semaines de traitement. Chez les malades traités depuis plus d'un mois avec des SAL actifs, sur 76 tests pratiqués 42 sont positifs.

Lorsque les tests sont pratiqués pendant une crise de rejet ou dans les trois semaines qui la précèdent, la proportion de positifs est de 16 sur 18 (11 malades sur 13). Ceci suggère que lorsque le SAL est suffisamment actif pour prévenir l'apparition d'une crise de rejet, il supprime en même temps l'HSR, ce qui ne signifie pas nécessairement que la négativité des tests cutanés correspond à un degré d'immunosuppression suffisant pour garantir l'absence de crise de rejet.

Cultures de lymphocytes. Les cultures de lymphocytes en présence de tuberculine, de candidine ou de streptokinase, chez les malades traités par des SAL actifs, montrent une diminution franche ou une suppression de la réponse in vitro. Ce résultat montre que la suppression des réactions cutanées n'est pas due à un effet périphérique, anti-inflammatoire du type de celui provoqué par les corticoïdes, mais s'accompagne de la disparition des cellules capables d'être stimulées in vitro par l'antigène. Chez certains malades en revanche, les intraderm réactions demeurent positives et on trouve toujours dans le sang circulant des cellules stimulables par l'antigène spécifique. Ces cas correspondent soit à des SAL inactifs, soit à des SAL actifs mais administrés à doses insuffisantes chez des malades immunisés contre les protéines de cheval (Revillard & Traeger, 1970).

Chez les malades traités de façon efficace par un SAL actif la réponse des lymphocytes cultivés en présence de phytohémagglutinine n'est pas sensiblement modifiée après 15 jours de traitement. Il apparaît donc chez l'homme, sous traitement par le SAL, une dissociation tout à fait caractéristique entre la réponse à la phytohémagglutinine qui est conservée, et la réponse à une antigène spécifique qui est supprimée.

Greffes de peau. 5 malades traités par des SAL 'actifs' ont reçu des allo-greffes cutanées. La première avait subi une brûlure localisée 3 semaines auparavant. Les 4 autres étaient atteints de sclérose en plaque (SEP), les résultats apparaissent dans le Tableau IV.
<table>
<thead>
<tr>
<th>MALADES</th>
<th>TRAITEMENT</th>
<th>SAL</th>
<th>REJET</th>
<th>HSR</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Brûlure I</td>
<td>5 ml/j IM 30 j</td>
<td>Canal thoracique</td>
<td>35-40</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>SEP 2</td>
<td>20 ml/j IV x 2 10 ml/j IV x 4 5 ml/j IV x 5</td>
<td>Thymus</td>
<td>12 0</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>SEP 3</td>
<td>20 ml/j IV x 2 10 ml/j IV x 7</td>
<td>Thymus</td>
<td>18 j +</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>SEP* 4</td>
<td>5 ml/j IM 20 j</td>
<td>Thymus</td>
<td>16 j 0</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>SEP* 5</td>
<td>5 ml/j IM 20 j</td>
<td>Thymus</td>
<td>18 j 0</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

*Résultats aimablement communiqués par le Dr J M Dubernard*

**Effet du SAL sur les crises de rejet.** 20 crises de rejet aiguës, subaiguës ou chroniques chez des receveurs d’un transplant rénal ont été traitées par l’augmentation des doses de Gal, avec passage de la voie IM à la voie IV. Dans 14 cas les corticoïdes ont été augmentée conjointement, mais dans 6 crises de rejet, les autres éléments de la thérapeutique d’entretien (corticoides, azathioprène) ont été maintenus aux taux antérieurs ou diminués. Chez la plupart de ces malades, avec 10 à 20 mg/kg/jour d’IG antilymphocytaires pendant un mois, la fonction rénale a été d’abord stabilisée, puis elle s’est améliorée progressivement. L’effet du SAL sur un rejet déclaré semble moins rapide et moins net que celui de la prednisone à forte dose mais dans un cas de rejet subaigu, nous avons observé une franche amélioration dans les 24 heures suivant la première perfusion puis un retour à des fonctions subnormales en 6 à 8 semaines.

Par ailleurs, le SAL prescrit systématiquement diminue la fréquence des crises de rejet. Au cours des 3 premiers mois post-opératoires, en donnant une dose moyenne de 24 mg/24 h de corticoïdes, de 2 à 3 mg/kg/24 h d’azathioprène et 5 ml/24 h de SAL IM, nous n’avons observé une réaction de rejet caractérisée, égale ou supérieure à R2 que chez 19% des malades. 77% de nos malades suivis plus d’un an ont une fonction rénale absolument normale. En ce qui concerne l’histologie rénale, la fréquence des lésions interstitielles après 3 mois est comparable à celle des séries sans SAL publiées dans la littérature, tandis que les lésions glomérulaires et surtout vasculaires semblent un peu moins fréquentes (Fries, 1970).
Tableau V. Valeur de la période biologique T 1/2 et de l'extrapolation B₁ de l'ex ponentielle lente

<table>
<thead>
<tr>
<th>SUJETS EXPLORES</th>
<th>T 1/2 (jours)</th>
<th>B₁ (% dose)</th>
<th>TRAITEMENT PAR GAL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Pas de traitement</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>Intra veineux quotidien (début à J-3)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>IV quotidien (début à J-27) dose de J-27 à JO = 6 700 mg</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>IV quotidien (début à JO)</td>
</tr>
<tr>
<td>NORMAUX</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>1</td>
<td>7,50</td>
<td>53</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2a</td>
<td>3,57*</td>
<td>77</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2b</td>
<td>0,61</td>
<td>34</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>3,68*</td>
<td>72</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>INSUFFISANTS RENAINS</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>(Traités par EER)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>8,00</td>
<td>61</td>
<td>1 seule injection IV à J-10 (800mg)</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>8,40</td>
<td>72</td>
<td>1 seule injection IV à J-12 (1180mg)</td>
</tr>
<tr>
<td>5a</td>
<td>4,98*</td>
<td>81</td>
<td>IV quotidien (début à J-1)</td>
</tr>
<tr>
<td>5b</td>
<td>1,70</td>
<td>42</td>
<td>IV quotidien de J-82 à J-74</td>
</tr>
<tr>
<td>TRANSPLANTES A FONCTIONS RENALES VARIABLES</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>5,44</td>
<td>61</td>
<td>IV quotidien (début à J-66) dose de J-66 à JO = 14 200mg</td>
</tr>
<tr>
<td>9</td>
<td>5,10</td>
<td>73</td>
<td>Traitement chronique IV ou IM depuis 9 mois</td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>4,77</td>
<td>58</td>
<td>IV quotidien (début à J-26) dose de J-26 à JO = 10 000mg</td>
</tr>
<tr>
<td>11</td>
<td>4,00</td>
<td>75</td>
<td>Traitement chronique IV ou IM depuis 14 mois</td>
</tr>
<tr>
<td>recevant:</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>- GAL</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>- Corticoïdes</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>- Imuran</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>12</td>
<td>3,96</td>
<td>77</td>
<td>Traitement chronique IV ou IM depuis 18 mois</td>
</tr>
<tr>
<td>13</td>
<td>3,80</td>
<td>63</td>
<td>IV quotidien (début à J-28) dose de J-28 à JO = 9100mg</td>
</tr>
<tr>
<td>14</td>
<td>3,65</td>
<td>61</td>
<td>Traitement chronique IV ou IM depuis 6 mois</td>
</tr>
<tr>
<td>15</td>
<td>2,50</td>
<td>19</td>
<td>Traitement chronique IV ou IM depuis 26 mois</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* cassure nette de la courbe plasmatique au 10e j de traitement (J₇ pour 2a; J10 pour 3; J pour 5a)
O Pas de cassure pendant les 14 premiers jours de traitement
JO Jour de l'injection IV de la dose traceuse de GAL 125 I ou 131 I

344
3. REACTION IMMUNE INDUISTE PAR LE SAL

1. Anticorps antiprotéines de cheval et anti-SAL. La plupart des malades ont dans leur sérum un excès d'anticorps antiprotéines de cheval, détectables par hémagglutination ou précipitation. Chez de nombreux malades, le titre d'anticorps diminue progressivement alors que les injections de SAL sont poursuivies, et il n'est pas rare que ces anticorps ne soient plus détectables après le sixième mois de traitement (Traeger et al., 1968). Il s'agit là de tests très peu sensibles dont il faut seulement retenir la positivité. On rappellera qu'un malade qui a un titre de précipitines antiprotéines de cheval de 1/8 a suffisamment d'anticorps pour neutraliser 5 000 fois le volume de SAL qui lui est administré chaque jour. Les anticorps neutralisant les activités in vitro du SAL sont détectables chez la plupart des malades traités au long cours, y compris ceux qui reçoivent de fortes doses de SAL (30 ml/jour) et chez qui les anticorps ne sont pas détectables par hémagglutination.

2. Courbes d'élimination des GAL marquées. Les courbes expérimentales de concentration radioactive plasmatique sont de type biexponentiel, la période biologique (T 1/2) et l'extrapolation à l'ordonnée B₀ sont les caractéristiques de l'exponentielle lente. Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau V.

![Graphique de l'élimination des globulines antilymphocytaires (GAL) marquées à l'iode 125 ou 131. Les courbes individuelles sont représentatives des différents types d'élimination décrits dans le texte: type 1 (cas No 4), type 2 (cas No 5a), type 3 (cas No 11), types 4 et 5 (cas No 2b, 5b, 15)
Nous donnons dans la Figure 1 les différents types de courbe obtenue:

**Type 1:** (cas No 1) sujet n’ayant reçu qu’une seule dose traceuse. Les cas No 4 et 7, bien qu’ayant reçu dix jours auparavant une injection IV de GAL montrent une élimination comparable.

**Type 2:** (cas No 2a, 3, 5a, 6) sujets explorés dès le début du traitement quotidien par les GAL et recevant de 300 à 600 mg par 24 heures par voie IV. La cassure de la courbe au 10ème jour du traitement objective l’apparition des premiers anticorps antiprotéines et permet d’affirmer l’immunisation (cas No 2a, 3, 5a). Avant cassure, la période biologique se situe entre 3, 25 j et 5, 25 jours et ceci nous semble un reflet de la quantité injectée. Les injections quotidiennes créent un pool non physiologique d’IgG de cheval, et ce pool a une régulation propre. Des arguments expérimentaux sont en faveur de cette hypothèse: la dépélation ou l’augmentation d’un pool protéique chez l’animal entraîne respectivement une diminution ou une augmentation du taux de dégradation quotidien (Mathews, 1961).

**Type 3:** la période biologique se situe entre 3, 25 jours et 5, 25 jours. L’extrapolation BI varie de 60 à 90% environ. Ce type correspond à la plupart des sujets traités au long cours et recevant la triple médication immunodépressive: GAL azathioprine et corticoïdes.

**Type 4 et 5:** (cas No 2b, 5b, 15). Ces types représentent schématiquement les courbes d’élimination immune. La période biologique est très abaissée et la valeur de BI très basse (< 50%) traduit la neutralisation immédiate d’une partie de la dose traceuse par un excès d’anticorps libres antiprotéines de cheval.


**DISCUSSION**

1. **CRITERES D’ACTIVITE IMMUNOSUPPRESSIVE D’UN LOT DE SAL**

Les 4 tests d’activité utilisés en routine dans notre groupe — cytoxicité, inhibition des rosettes, inhibition des cultures mixtes et greffes de peau chez le singe — permettent de se faire une idée approximative de l’activité du lot de SAL étudié, c’est-à-dire de sa concentration en anticorps immuno-supresseurs. Cependant, aucun de ces tests n’est suffisant quand il est pris isolément: les résultats des tests in vitro ne peuvent être donnés qu’à une dilution près et en pratique les différences observées entre des sérums obtenus selon les mêmes protocoles d’immunisation se situent entre des limites
relativement étroites. Les greffes de peau chez le singe sont difficilement interprétables lorsque le lot de SAL testé est thrombopéniant dans cette espèce animale, et le calcul du temps moyen de survie exigerait en principe plus de deux animaux d’expérience par lot. C’est pour ces motifs que nous estimons préférable l’emploi simultané et comparatif de ces différents tests. D’autres tests d’activité in vitro ont été proposés et pourraient être ajoutés à cette liste mais nous n’en avons pas d’expérience personnelle. Il s’agit essentiellement de l’opsonisation (Roitt, 1969) et de la cytotoxicité après absorption des SAL sur macrophages et sur plaquettes (Eijsvoogel, 1970).

2. CRITERES D’ACTIVITE DU SAL CHEZ L’HOMME

Nous retenons comme critères d’activité la négativation des réactions cutanées d’HSR, la suppression de la stimulation in vitro des lymphocytes du malade par des antigènes vis-à-vis desquels le sujet traité était préalablement sensibilisé, et enfin la prolongation des allogreffes de peau. La lymphopénie et l’effet sur les crises de rejet aigües ou sur les phénomènes autoimmuns (ophthalmie sympathique) sont des critères plus difficiles à interpréter. L’effet immunosuppresseur d’un lot de SAL ne peut être évalué que lors d’un traitement à court terme, ou du moins pendant les 10 premiers jours de traitement, avant le début de l’immunisation du malade contre les protéines de cheval. Pendant cette période, l’effet obtenu dépend de l’activité du lot de SAL mais aussi de la dose administrée. Il n’est pas possible actuellement de calculer à priori la dose de SAL qui doit être administrée à chaque malade. Nous avons proposé en revanche une méthode qui permet à posteriori de vérifier si la dose administrée était suffisante (Traeger et al, 1970; Revillard et Traeger, 1970). Cette méthode est illustrée dans la Figure 2 qui représente deux malades traités par la même dose du même lot de SAL. Chez le malade A la dose de SAL était insuffisante: il n’y a pas d’anticorps antilymphocytaires détectables dans la circulation, les intradermreactions et la réponse in vitro des lymphocytes à la tuberculine étaient positives. Chez le malade B on trouve des anticorps libres dans le plasma et on constate les signes d’une immunosuppression efficace. Dans cette expérience, la présence d’anticorps antilymphocytaires était mise en évidence par l’inhibition de la réponse in vitro à la tuberculine; l’inhibition du phénomène de rosettes donne les mêmes résultats et peut être réalisée plus rapidement pour suivre un traitement. Le principe de cette méthode est comparable à la mesure du pouvoir bactériostatique ou bactéricide du sérum d’un malade traité par un antibiotique.

Ces mesures nous suggèrent deux considérations d’importance pratique:

1. La dose administrée en début de traitement pour obtenir un effet immédiat (24 à 48 heures) est, chez la plupart des malades, de l’ordre de 20 à 30ml par jour (20 à 25 mg IgG/kg/jour).
2. La dose de SAL nécessaire pour obtenir une négativation des réactions d'HSR étant plus faible chez l’insuffisant rénal que chez le sujet non lymphopénique, on peut espérer augmenter l’efficacité du SAL à doses égales en induisant une déplétion lymphocytaire immédiatement avant le début du traitement. Cette déplétion pourrait être obtenue par irradiation extracorporelle ou par drainage du canal thoracique. Chez l’animal, en effet, l’irradiation totale (Levey et Medawar, 1966) ou le drainage du canal thoracique (Woodruff et Anderson, 1963) potentiellement l’effet du SAL.

3. L’IMMUNISATION CONTRE LE SAL

Lors d’un traitement à moyen ou long terme, l’efficacité du SAL dépend non seulement des caractéristiques du lot lui-même, de la dose administrée et de la 'susceptibilité individuelle' du malade traité, mais encore de la réponse immune de ce sujet. Dans plusieurs modèles expérimentaux, il a été prouvé

Chez l'homme nous retrouvons des faits analogues: l'activité des GAL ne peut plus être démontrée chez les malades les plus fortement immunisés même lorsque les doses injectées sont augmentées; dans certains cas, 80% des GAL sont neutralisées dans les heures qui suivent l'injection par les anticorps anti IgG synthétisés par le receveur. Lorsque l'immunisation est véritablement très intense, il convient soit d'arrêter le SAL soit d'utiliser un SAL préparé dans une autre espèce animale après avoir vérifié l'absence d'antigénicité commune entre les IgG des 2 espèces.


RESUME

L'activité immunosuppressive d'un SAL peut être mesurée chez l'homme par la modification des tests cutanés d'hypersensibilité retardée à différents antigènes et par la réponse des lymphocytes cultivés in vitro en présence de l'antigène spécifique. Les SAL actifs administrés à doses suffisantes suppriment ces 2 types de réactivité après 8 à 15 heures de traitement. Au delà de cette période, la réponse immune du malade peut dans certains cas, inacterie partiellement ou totalement le SAL injecté. Les sérums déclarés inactifs d'après les tests in vitro (inhibition des rosettes, inhibition de la réaction lymphocytaire mixte) ou d'après leur effet sur les greffes de peau chez le singe, ne suppriment pas les réactions d'hypersensibilité retardée chez l'homme. La dose de SAL administrée à un malade doit être ajustée de façon à maintenir un excès d'anticorps antilymphocytaires immuno-dépresseurs dans la circulation.

REFERENCES


Munksgaard, Copenhagen


Pitman Medical & Scientific Publishing Co. Ltd., London


Hardy, M. A., Quint, J. and Monaco, A. P. (1970) Transplantation, 9, 487


MacFarlane, A. S. (1965) Bulletin of the Swiss Academy of Medical Sciences, 21, 173

Matthews, C. M. E. (1961) Journal of Clinical Investigation, 40, 603


Raju, S. and Grogan, J. B. (1969) Transplantation, 8, 695

Rapaport, F. T., Dausset, J., Converse, J. M. and Lawrence, H. S. (1965) Transplantation, 3, 490


Touraine, J. L. and Revillard, J. P. (1970) Lyon Médical,

