

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES DES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES

R. ROBINEAUX*

Centre de Recherches d'Immuno-Pathologie de l'Association Claude Bernard,
Hôpital Saint-Antoine, Paris

Abstract—This paper has a twofold objective: First to determine the actual position of the researches carried out on animals on nuclear structures or on nuclear constituents considered as antigens. Secondly, to re-examine, in comparison with this work, what we can learn from the study of certain serological and cytological phenomena which accompany the "Acute Dispersed Erythematous Lupus" (ADEL). It seems well established at present that this application involves a combination of immunological reactions in which the nuclei or the nuclear constituents act as antigens. As a matter of fact, the serum of patients contains the corresponding γ -globulines which have the recognized characteristics of antibodies. As regards work on experimental immune serums one is struck by the paucity of researches and their incomplete character. This work should be taken up again making use of the precise immunological techniques which have in the meantime become available. Nevertheless, it appears that antibodies directed against DNA or nuclei have in fact been obtained experimentally. Such experiments are, however, difficult and the antigen property of the nuclear structure appears to be feeble.

As regards ADEL, it is interesting to stress the following facts: (a) the very progress of the Lupus phenomenon, which follows a well-defined course during which the nuclear lysis has a characteristic appearance which seems to condition the overall disturbance; (b) the attachment of one or several complement-fixing substances to the nuclei destined to become the seat of the Lupus phenomenon and the specific opsonin-character of these substances; (c) the specific precipitate obtained when DNA and ADEL-serum are mixed; (d) the role of deoxyribonuclease, which can inhibit the attachment of antibodies on the treated nuclei and which enables the extraction of an active principle from the specific precipitate DNA-serum ADEL; (e) the multiplicity of antibodies activity as anti-nuclei and differing from anti-DNA types which are found in the serum of patients suffering from ADEL; (f) the fact that contrary to experimental immune serums, the ADEL-serums react with DNA of very varied origin.

The antigen property of nuclear structures, chemically well-defined, is highly probable, considered from a pathological view point for man or experimentally in the case of animals. Much more work will, however, be required before the phenomenon will be completely known and understood.

The comparison of immune serums, whether obtained pathologically or experimentally, show discrepancies which at present cannot be explained.

IL EST difficile de donner une idée de cette importante question dont, nous le verrons, les incidences en pathologie humaine sont immenses et d'une grande actualité. Pour y parvenir, en raison même de cette complexité et aussi du caractère parcellaire et controversé des expériences acquises, nous ferons un exposé chronologique des faits. Il aura inévitablement un caractère de revue générale dans laquelle

* Avec la collaboration de J. PINET et J. VOISIN.

nous introduirons notre expérience personnelle. Dans une discussion synthétique qui terminera notre exposé, nous dégagerons les arguments pour ou contre cette question fondamentale: "les acides désoxyribonucléiques (ADN), les désoxy-ribonucléoprotéines sont-ils ou non antigéniques?"

C'est en 1938 que SEVAG, LACKMAN et SMOLENS établissent que les acides nucléiques ont une réactivité sérologique (SEVAG *et al.*, 1938). La même année, MENZEL et HEIDELBERGER (1938) mentionnent une précipitation de "l'acide nucléique" de bacilles acido-résistants avec le sérum homologue. Les bacilles provenaient de plusieurs souches (*Mycobacterium phlei*, bacilles humains, bovins ou aviaires), les anti-sérums furent préparés chez le lapin ou le cheval avec des bacilles entiers ou des fractions déterminées, isolées de ces bacilles. Dans leur discussion, ces auteurs ne purent éliminer une réaction due à la présence d'impuretés, peut-être un hydrate de carbone, réagissant avec l'anticarbohydrate de l'immun-sérum correspondant.

L'année suivante, HEIDELBERGER et SCHERP (1939) obtiennent des résultats comparables avec des streptocoques. Ils firent les mêmes réserves. WINKENWERDER *et al.* (1939) rapportent des réactions de sensibilisation cutanée avec les acides nucléiques et des produits de dégradation de ces acides chez des personnes sensibilisées au pollen de légumineuses. PENNELL (1939) épuise des sérums spécifiques de brucellose avec des acides nucléiques extraits de *Brucella*.

LACKMAN *et al.* (1941) étudient de façon approfondie la réactivité d'acides nucléiques de provenances très variées: streptocoques entiers, virus de la mosaïque du tabac, bacilles tuberculeux, spermatozoïdes de taureau, avec des immun-sérums de lapin ou de cheval, anti-streptococciques ou pneumococciques. Ils établissent les points suivants: (a) les acides nucléiques donnent un précipité spécifique avec certains antisérums, en particulier les antisérums de cheval anti-pneumococciques; (b) la substance sérique réagissante est dans la fraction euglobinique; (c) la réaction est fonction de la force ionique de la solution saline utilisée et dépend, pour une force ionique donnée, de la qualité des ions en présence; (d) la réaction est inhibée spécifiquement par les nucléotides, les nucléosides et les bases puriques. Les bases pyrimidiques montrent seulement une inhibition faible et les pentoses et phosphates ne sont pas inhibiteurs.

Ces auteurs paraissent avoir éliminé, par des absorptions spécifiques, l'intervention possible d'un anticorps antihydrate de carbone. Ils concluent que ces précipitations se produisent pendant l'immunisation spécifique mais ne peuvent affirmer qu'elles correspondent à une réponse immunitaire directe aux antigènes nucléoprotéiques des pneumocoques.

C'est l'incertitude de ces résultats qui amenèrent BLIX *et al.* (1954) à reprendre 10 ans plus tard cette question de l'activité antigénique des ADN et de leur spécificité sérologique. Ils sont partis de sources variées, essentiellement thymus de veau, mais aussi laitances de hareng, germes d'avoine, rate de boeuf, sarcome de souris, *Mycobacterium phlei* et *tuberculosis*. Ils ont employé, comme techniques immunologiques d'identification des anticorps, les tests de précipitation (épreuve du disque ou *ring test*), la fixation du complément, les méthodes d'anaphylaxie active et passive. En fait, leur travail repose sur une seule technique immunologique: la fixation du complément.

Tous les acides nucléiques ont pu donner lieu chez les lapins immunisés à la production d'immunsérums fixant le complément quand ils étaient testés contre le matériel homologue. Les titres les plus élevés furent obtenus avec l'ADN de thymus de veau. Quand les antisérums préparés avec différents ADN ont été testés contre d'autres ADN que l'ADN sensibilisant, ils n'ont pratiquement pas donné de réaction. L'absence de réaction croisée tend à montrer que la spécificité dépend du tissu d'origine de l'acide nucléique. Les antisérums anti-ADN ont réagi avec la nucléoprotéine d'où l'acide nucléique sensibilisant avait été extrait et, de façon plus irrégulière, avec l'histone homologue.

Toutes les nucléoprotéines ont donné des immunsérums actifs et surtout les nucléoprotéines de thymus, mais à des titres nettement plus faibles que les immunsérums de l'acide nucléique homologue. Ces sérums anti-nucléoprotéines ont donné des réactions positives avec l'ADN et plus faiblement l'histone homologue.

Aucune histone, sauf une provenant d'une préparation impure, n'a donné lieu à la formation d'anticorps chez les animaux sensibilisés. Nous avons vu que l'histone réagissait avec les sérums anti-ADN et antinucléoprotéine homologue.

On trouve encore dans ce travail quelques indications sur l'action des alcalis faibles, de la désoxyribonucléase et des ultra-sons qui font perdre à la molécule d'ADN son antigénicité.

Dans l'ensemble, c'est donc l'ADN purifié qui s'est révélé comme le meilleur et le plus constant des antigènes. Comme l'ont discuté BLIX *et al.* (1954), le fait que l'histone, non antigénique elle-même, réagisse avec les immunsérums anti-ADN et antinucléoprotéine, est un obstacle à la spécificité antigénique de l'ADN et des nucléoprotéines. La présence de faibles quantités d'acide nucléique comme impureté dans les préparations d'histone pourrait expliquer cette réactivité.

Quelques tentatives plus récentes ont été faites dans la même voie. POLLI et CELADA (1958) ont essayé d'immuniser des lapins avec de l'ADN de leucocytes leucémiques, mais les conditions dans lesquelles ils ont observé des réactions de précipitation interdisent toute conclusion (SELIGMANN, 1958). Ce dernier auteur s'est efforcé de détecter un anticorps anti-ADN chez des lapins immunisés avec des leucocytes ou des extraits leucocytaires contenant de l'ADN: les réactions de précipitation et de fixation du complément ont été constamment négatives. Enfin, LAWLIS (1958) vient de montrer que des érythrocytes formolés exposés préalablement à de l'ADN purifié sont agglutinés spécifiquement par un immunsérum anti-nucléoprotéine. Ainsi sont résumées les expériences d'immunisation faites directement avec des ADN, des nucléoprotéines ou des mélanges complexes contenant ADN ou nucléoprotéines.

Il est maintenant opportun de rapporter toutes les expériences qui, du domaine de la pathologie humaine, ont posé d'un autre point de vue, le même problème en y apportant des réponses d'une valeur indiscutable.

HARGRAVES *et al.* (1948) décrivent dans une maladie humaine mystérieuse et mortelle, le "Lupus Erythémateux Aigu Disséminé" (L.E.A.D.) des cellules particulières dites *L.E. cells*. Ces cellules particulières sont des phagocytes contenant une masse homogène en plus de leur propre noyau. Elles nécessitent pour se produire: (a) du sérum de malade atteint de L.E.A.D.; (b) des noyaux cellulaires

réactifs, le plus souvent lymphocytaires et granulocytaires, qui seront préalablement lysés par le sérum pathologique; (c) des cellules phagocytantes, polynucléaires ou monocytes, à chimiotactisme positif pour les noyaux lysés.

Ces *L.E. cells* sont liées à la présence dans le plasma du facteur globulinique décrit par HASERIK (1950) découvert dans la fraction II de COHN, et migrant par électrophorèse avec les γ -globulines.

La masse homogène contenue dans cette cellule est d'origine nucléaire, elle donne une réaction de Feulgen positive. Fait notable et sur lequel nous reviendrons, cette masse ne prend pas le vert de méthyle. Ce fait est à l'origine de conclusions erronées sur l'état de dépolymérisation de l'ADN de ces masses nucléaires (KLEMPERER *et al.*, 1950) et d'une théorie enzymatique de leur formation (KURNICK *et al.*, 1952a; KURNICK *et al.*, 1952b; KURNICK, 1953) controuvée depuis par un ensemble de preuves convergentes (GODMAN et DEITCH 1957; RIFKIND et GODMAN, 1957).

Il faut rattacher aux *L.E. cells* des formations dites "rosettes" qui sont trouvées dans les mêmes conditions et sont constituées par des couronnes de polynucléaires entourant la masse homogène Feulgen positive.

La découverte de cette masse phagocytée d'origine nucléaire, le fait que le facteur sérique responsable était apparenté aux γ -globulines, devaient orienter les recherches sur la formation de cette cellule sur des bases immunologiques.

Plusieurs auteurs frappés, dès 1952, par le caractère fondamental de la nucléolyse (MARMONT, 1952; GOLD, 1952) ont avancé, d'un point de vue purement spéculatif ou sur des bases expérimentales fragiles (CAPELLI, 1952) l'hypothèse d'une sensibilisation de l'organisme malade à ses propres substances nucléaires, faisant du L.E.A.D. une maladie par auto-immunisation.

En fait, ce sont les travaux de MIESCHER (1953) qui ont, les premiers, le plus solidement contribué à la démonstration de cette thèse. Il utilise, en place de sérums L.E.A.D., des hétérosérums anti-thymus et anti-rate et observe sur des leucocytes des formations "ressemblant" au phénomène L.E. mais dans lesquelles les altérations cytoplasmiques sont plus marquées que les altérations nucléaires. Avec FAUCONNET et BÉRAUD, il isole des noyaux cellulaires qu'il emploie comme antigène sensibilisant; les antisérums obtenus provoquent *in vitro* sur des leucocytes humains des altérations nucléaires massives et la formation d'images superposables à la cellule L.E. (MIESCHER *et al.*, 1953).

Il précise encore ses observations un peu plus tard (MIESCHER et FAUCONNET, 1954b) en comparant les effets des antisérums préparés à partir de trois constituants antigéniques du leucocyte: le cytoplasme, les nucléoprotéines, les résidus nucléaires après extraction des nucléoprotéines. Il conclut que:

(a) Le cytoplasme du leucocyte polynucléaire possède un pouvoir antigénique propre qui donne à cette cellule la spécificité antigénique de leucocyte polynucléaire (lésions cytoplasmiques, pouvoir leuco-agglutinant).

(b) Les nucléoprotéines ont un pouvoir antigénique spécifique. L'antisérum correspondant provoque des atteintes nucléaires se traduisant par une perte d'affinité pour les colorants basiques et un effacement du réseau de chromatine. On peut observer, mais semble-t-il difficilement, des images de phagocytose de substance nucléaire lysée aboutissant à des cellules proches des cellules L.E.

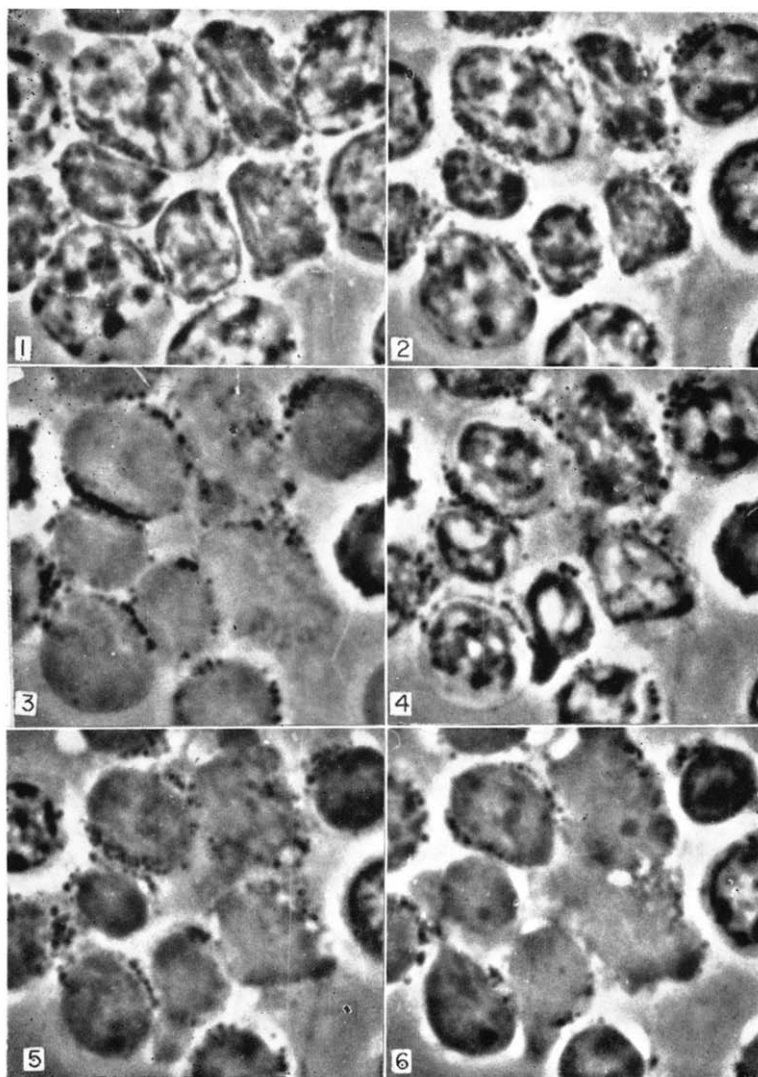


PLANCHE I. ÉTUDE DE LA LYSE NUCLÉAIRE AU COURS DU PHÉNOMÈNE L.E.
(*Leucocytes leucémiques humains morts*)

FIG. 1. Leucocytes en suspension

FIG. 2. Contraction non spécifique au moment ou on ajoute le sérum L.E.A.D.

FIG. 3. Première apparition de la lyse.

FIG. 4. Cette lyse est provisoirement réversible.

FIG. 5 et 6. Développement et extension de la lyse nucléaire définitive.

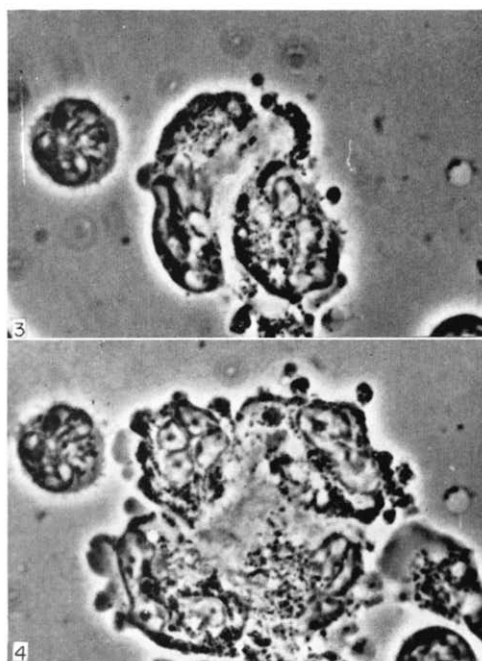
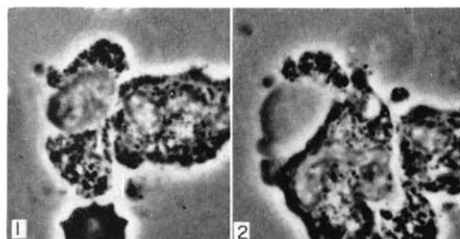


PLANCHE II. CONSTITUTION D'UNE ROSETTE APRÈS RUPTURE DE LA MEMBRANE NUCLÉAIRE

FIG. 1. Noyau incomplètement homogénéisé et un leucocyte.

FIG. 2. Homogénéisation complète et un leucocyte.

FIG. 3. Éclatement du noyau homogénéisé et deux leucocytes.

FIG. 4. Constitution de la rosette typique avec cinq leucocytes.

(c) Le résidu nucléaire sans nucléoprotéines n'est que très peu antigénique (antigénicité peut-être due à des contaminants).

(d) Les leucocytes entiers donnent des antisérums à double action, cytoplasmique et nucléaire, la première étant prédominante.

Les nucléoprotéines seraient donc responsables de l'antigénicité du noyau. Cette spécificité antigénique du noyau leucocytaire ne serait pas une spécificité leucocytaire, car elle se rencontre dans d'autres noyaux cellulaires. En rapprochant ces résultats des faits cliniques, il écrit qu'il existerait en clinique des anticorps se comportant comme des anticorps cytoplasmiques (iso-anticorps post-transfusionnels et auto-anticorps leucopénisants) et des auto-anticorps nucléaires agissant dans le L.E.A.D. et provoquant le phénomène L.E.; le leucocyte n'y serait pas atteint à cause de sa spécificité mais en tant que porteur d'un noyau.

MIESCHER et FAUCONNET (1954d) montrent que le facteur responsable du phénomène L.E. peut être absorbé par des noyaux cellulaires isolés et pensent que c'est là un argument en faveur du caractère d'anticorps anti-noyaux de ce facteur, sans qu'ils puissent exclure la possibilité que ce facteur soit un enzyme perdant son activité après action sur des noyaux. Cette restriction paraît levée quand MIESCHER (1955) démontre que la substance fixée par les noyaux est une γ -globuline, puisque des noyaux cellulaires isolés incubés avec du sérum contenant le facteur L.E. consomment des anticorps anti-globuliniques.

Dans le même temps nous nous sommes proposé d'apporter sur des bases morphologiques directes la preuve du caractère d'anticorps anti-noyau du facteur sérique responsable de la cellule L.E. C'est ainsi que nous avons pu montrer dans notre première publication (ROBINEAUX, 1956) que le mécanisme de formation de la cellule L.E. n'avait rien de commun avec ce que l'on savait de l'action cytotoxique des sérums anti-leucocytaires. En effet de nombreux travaux affirmaient que le phénomène de base dans la formation de la cellule L.E. était une autolyse mélangée, nucléocytoplasmique, et que les sérums anti-leucocytaires pouvaient donner lieu à des images semblables à la cellule L.E. (DAMESHEK et BLOOM 1950; ZIMMERMAN *et al.* 1953; BESSIS et TABUIS 1954; MOORE *et al.* 1956). C'était aussi le sens des premières constatations de CAPELLI (1952) et de MIESCHER (1953) faites avec des sérums anti-rate ou anti-thymus.

Seuls FINCH *et al.* (1953) notèrent que les polynucléaires étaient phagocytés intacts et détruits ensuite, dans le cas des hétérosérums anti-leucocytaires alors que la lyse nucléaire est l'élément préliminaire dans le phénomène L.E. Ce dernier point fondamental avait d'ailleurs été bien vu par REBUCK et BERGMAN (1950) qui étudiant le déroulement du phénomène sur la peau de volontaires humains normaux, décrivent des lésions cytoplasmiques non spécifiques suivies par un gonflement et une homogénéisation des noyaux; ceux-ci, libérés, étaient ensuite phagocytés pour donner des cellules L.E. De leur côté, MOYER et FISHER (1950), ROHN et BOND (1953), utilisant les colorations vitales, avaient eu l'idée de suivre à l'état vivant, *in vitro*, la dynamique de la formation de la cellule L.E., malheureusement dans de mauvaises conditions optiques, comme en témoigne le film de ROHN et BOND que nous avons eu l'occasion d'étudier en détail. Des conclusions importantes en ont pourtant été déduites sur le caractère préalable de la lyse nucléaire, montrant

que la phagocytose ne s'effectuait qu'après cette lyse et une dissolution partielle du cytoplasme.

C'est cette technique dynamique d'étude du phénomène L.E. sur cellules vivantes par la microcinématographie à l'accélééré que nous avons utilisée mais en la couplant à la microscopie de phase pour travailler dans les meilleures conditions optiques possibles. Elle nous a permis nos premières conclusions que nous avons largement complétées par la suite par d'autres enregistrements et en procédant à l'analyse image par image de toutes nos séquences filmées. L'ensemble de nos résultats a fait l'objet de plusieurs publications récentes (ROBINEAUX, 1958a, b; ROBINEAUX et VOISIN, 1959), auxquelles nous renvoyons pour tous les détails techniques et l'iconographie très abondante, et dont nous extrayons l'essentiel.

Lorsqu'on ajoute un peu du sérum d'un malade atteint de L.E.A.D à des leucocytes, on observe une lyse nucléaire, la formation d'images en rosettes et la formation de cellules L.E.

Étude de la lyse nucléaire (Planche I)

C'est un phénomène rapide qui survient en quelques secondes à quelques minutes. Les résultats les plus évidents ont été obtenus en ajoutant, en cours d'observation, du sérum L.E. à des leucocytes altérés provenant d'individus normaux ou leucémiques. Au moment de l'addition du sérum, on observe, dans tous les cas, une contraction brève du cytoplasme et du noyau. Cette contraction des cellules n'est pas spécifique; elle se produit aussi en présence de sérum normal. Seule donc, la lyse nucléaire est à considérer comme phénomène spécifique au cours duquel le réseau de chromatine s'efface progressivement dans le noyau qui devient homogène et augmente de volume. L'homogénéisation du noyau peut se faire de façon continue, ou bien en deux temps, avec un bref retour à une structure chromatiniennne normale, suivie d'une homogénéisation définitive. Ce phénomène de réversibilité transitoire a été observé sur des polynucléaires aussi bien que sur des lymphocytes.*

Quand le sérum test est ajouté à des leucocytes vivants, on peut observer une lyse progressive des noyaux dans des cellules qui montrent des signes d'altération, mais sont encore vivantes (*bubbling* important suivi d'une solation anormale du cytoplasme puis d'une gélification).

Nous avons aussi noté au cours de la formation de la rosette, que des leucocytes, en parfait état de vitalité puisqu'ils participent activement à la constitution de cet élément, peuvent être brusquement atteints par le facteur lytique. On observe alors une homogénéisation progressive du noyau avec une perte de la structure chromatiniennne normale. Il nous semble possible d'affirmer par conséquent qu'il existe une relation entre la rapidité de la lyse nucléaire et la vitalité de la cellule: plus la cellule est altérée, plus la lyse survient rapidement.

Il est facile de trouver sur les préparations, au bout de 15-30 min, de nombreux noyaux lysés encore entourés de cytoplasme complètement ou incomplètement.

Plusieurs faits importants doivent être soulignés. Alors que quelques noyaux lysés de polynucléaires peuvent conserver leur lobulation, plus souvent les lobes gonflent et fusionnent. Des noyaux lysés non accompagnés de cytoplasme peuvent

* Ce sont là des faits inédits que nous apportons sans les discuter. Ils doivent faire l'objet d'autres recherches.

être rencontrés, ils sont le plus souvent d'origine lymphocytaire. L'augmentation de taille des noyaux lysés est un phénomène fondamental. Cette lyse doit être d'un type spécial puisqu'elle est suivie de phagocytose. L'augmentation du volume nucléaire est ordinairement de l'ordre de trois à quatre fois le volume initial mais peut être plus importante.

Outre les phénomènes nucléaires qui dominent le tableau, on observe certains changements cytoplasmiques. La microcinématographie à l'accélééré facilite l'étude de ces phénomènes qui sont difficiles à observer directement. La cellule, au contact du sérum lupique, montre des signes d'altération. La périphérie de la cellule montre un *bubbling* violent; celui-ci s'arrête et les granulations cytoplasmiques sont animées de mouvements browniens témoignant d'une solation du hyaloplasma. Finalement une gélification rapide du cytoplasme se produit et les granulations groupées dans la région périnucléaire s'immobilisent. En même temps une phase liquide limitée par une membrane fine exsude à la périphérie de la cellule. Plus tard encore, cette fine membrane disparaît et le contenu liquide se disperse, la formation granuleuse persistant seule au contact du noyau. Il faut noter que l'accroissement de volume du noyau entraîne fréquemment la rupture de la bande cytoplasmique qui l'entoure. Il fait alors hernie à l'extérieur et se trouve en contact direct avec le milieu. Nous verrons plus loin l'importance de ce phénomène.

Il est difficile de déterminer lesquelles des modifications nucléaires ou cytoplasmiques se produisent les premières. Le plus souvent, les lésions du noyau et du cytoplasme apparaissent simultanément et évoluent parallèlement. En tous cas, des modifications importantes peuvent encore survenir dans le noyau à un moment où ne se produisent plus de changements dans le cytoplasme.

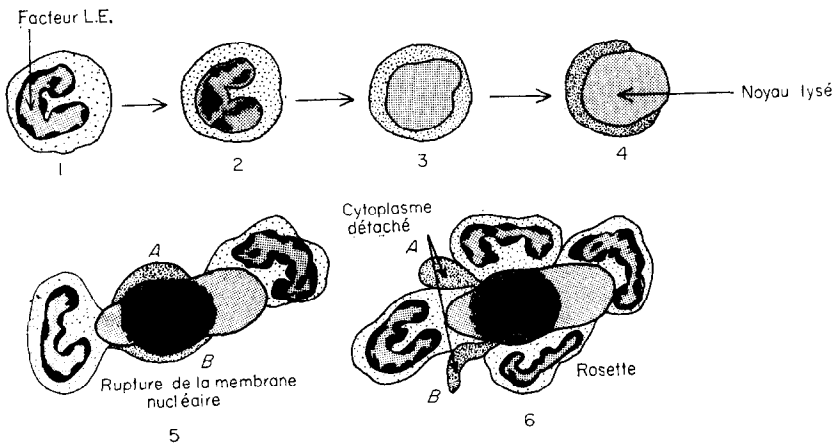
Étude de la formation des rosettes (Planche II)

Les rosettes représentent un phénomène actif. Elles sont le résultat d'un chimiotactisme positif des polynucléaires à l'égard des noyaux lysés. Le film montre que le mouvement des polynucléaires est orienté. Ce phénomène est morphologiquement comparable à celui qu'on voit quand une suspension de polynucléaires vivants en sérum frais est placée sur une lame à laquelle on a préalablement fixé des grains d'amidon de pomme de terre: ce phénomène a été étudié par DELAUNAY et PAGÈS (1946), par ROBINEAUX (1950) et par NELSON et LEBRUN (1956). Ces derniers ont démontré que l'amidon n'est pas dénué de propriétés antigéniques et que le complément et un anticorps spécifique sont tous deux nécessaires pour sa phagocytose. Puisqu'il y a une similitude morphologique évidente entre la formation des rosettes et l'adhérence des polynucléaires aux particules d'amidon de grande taille (préparées à partir de la pomme de terre), on peut logiquement penser que l'analogie étroite notée dans le chimiotactisme à l'égard des grains d'amidon et des corps L.E. suggère un mécanisme de même ordre immunologique.

La formation des rosettes est relativement lente, demandant de 10 min à 1 hr. Elle dépend de la vitalité des leucocytes et de leur nombre dans la partie de la préparation où se trouvent les noyaux lysés. La lyse est une condition nécessaire mais non suffisante pour la formation des rosettes. Il est essentiel que les noyaux

lysés soient en contact direct avec le milieu en d'autres termes que le cytoplasme ait été rompu. Un noyau complètement entouré de cytoplasme ne donne jamais lieu à la formation d'une rosette.

En décrivant la lyse nucléaire, nous avons mentionné une augmentation de volume du noyau. Ceci semble survenir à l'intérieur de la membrane nucléaire. En outre quand des polynucléaires vivants rencontrent un noyau lysé, il se produit souvent une rupture du noyau, immédiatement suivie par l'extrusion de la substance nucléaire. Dans chacun des cas observés, cette rupture, mécanique en apparence, fut suivie par la formation très rapide d'une rosette, de nombreux polynucléaires arrivant en succession rapide pour entourer le noyau rompu. L'homogénéisation du noyau n'a pas besoin d'être totale au moment où le phénomène commence. Enfin, les fragments cytoplasmiques adhérents au noyau lysé sont rejetés et ne sont pas inclus dans la rosette. Dans les séquences à l'accélééré,



Lyse nucléaire et formation des rosettes

SCHEMA I.

on peut facilement reconnaître ces fragments morts qui sont finalement complètement détachés du noyau lysé. Leur immobilité fait contraste avec les mouvements vifs des cellules voisines vivantes. Cependant, ils peuvent quelquefois être inclus dans la rosette quand ils sont petits et quand les phagocytes s'attachant au noyau les débordent de part et d'autre.

Étude de la formation des cellules L.E. (Planche III)

La cellule L.E. peut être formée de différentes façons. Un polynucléaire vivant peut phagocyter un noyau lysé de lymphocyte. En général ces noyaux ont perdu la mince couronne de cytoplasme qui, normalement, les entoure, et sont libres dans le milieu. Le mécanisme de phagocytose est simple, entièrement comparable à celui qu'on voit au cours de la phagocytose bactérienne dont nous avons fait antérieurement l'étude dynamique (FREDERIC et ROBINEAUX, 1951; ROBINEAUX, 1954). En ce qui concerne les noyaux lysés de polynucléaires, le phénomène est plus complexe. Le phagocyte peut englober un noyau entier dont les lobes ont

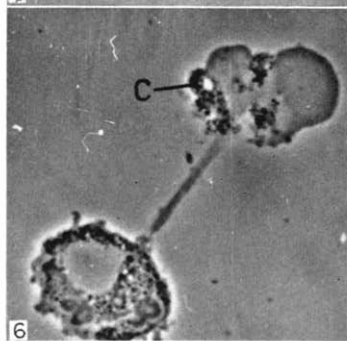
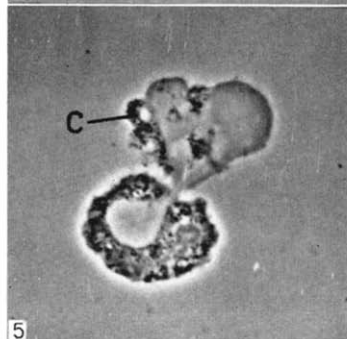
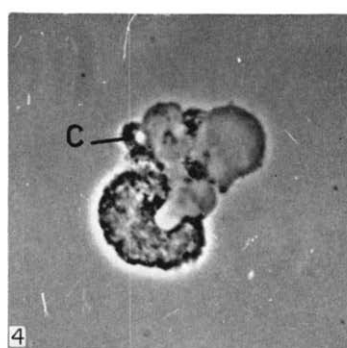
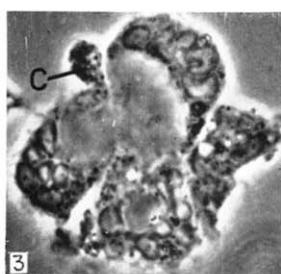
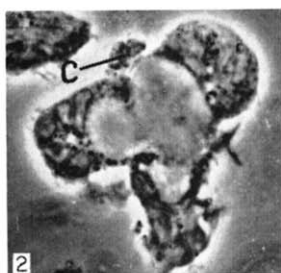
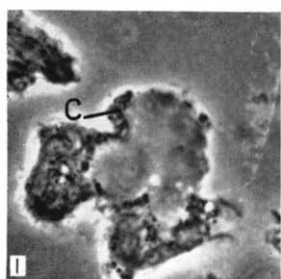
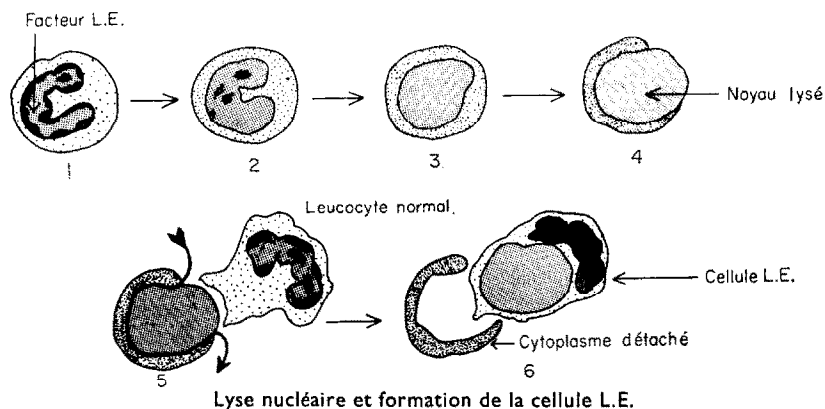


PLANCHE III. COMPARAISON DES RÉSULTATS TROUVÉS: AVEC UN SÉRUM L.E.A.D. (FIG. 1, 2 ET 3) ET UN ÉLUAT OBTENU À PARTIR DU PRÉCIPITE SPÉCIFIQUE SÉRUM L.E.A.D.—ADN (FIG. 4, 5 ET 6). Noter la similitude parfaite dans le déroulement du phénomène sur les deux séquences. Noter aussi le rejet du cytoplasme (C) sur les fig. 1, 2, 3, et l'abandon du cytoplasme (C) sur les fig. 4, 5, 6.

fusionné. A l'opposé, la phagocytose peut concerner un lobe unique quand les lobes n'ont pas fusionné. Cependant, c'est l'étude de la phagocytose des noyaux homogénéisés qui sont encore incomplètement entourés de cytoplasme, qui nous a fourni nos observations les plus intéressantes. Sur le dessin ci-dessous, la suite des événements est indiquée :

On y schématise l'extraction du noyau du leucocyte par le phagocyte dont les voiles hyaloplasmiques pénètrent à l'intérieur de la cellule altérée. Le cytoplasme reste en dehors du phagocyte et n'est pas absorbé. Ce phénomène est absolument constant.



SCHEMA II.

Ainsi donc, nous devons retenir plusieurs points très importants au cours de l'action de ces sérums :

(a) Le caractère fondamental de la lyse nucléaire suivie d'une augmentation de volume considérable du noyau, et de variation de densité optique relative.

(b) La formation des rosettes, assimilable à un chimiotactisme positif et non à une simple agglutination.

(c) La dissection du noyau, la séparation et le rejet du cytoplasme, et la phagocytose élective du noyau homogène.

Toutes ces observations dynamiques sont en faveur de la conception immunologique d'un antigène nucléaire comme substrat dans le phénomène L.E.

Certains de nos résultats devaient être confirmés par des observations de RIFKIND et GODMAN (1957) en ce qui concerne les modifications de volume des noyaux et complétées en microscopie interférométrique; ils ont montré par cette méthode l'augmentation de poids sec des noyaux des cellules traitées sous l'influence de protéines étrangères, détectées par méthodes histochimiques par GODMAN et DEITCH (1957b). D'autres expériences doivent être relatées, confirmant le caractère anti-nucléaire du facteur L.E.

L'utilisation des anticorps marqués par la fluorescéine a permis à MELLORS *et al.*, à VAZQUEZ et DIXON (1957), de montrer que la rate et le rein des malades atteints de L.E.A.D. ainsi que les cellules L.E. contenaient de fortes quantités de γ -globulines. Des constatations analogues ont été faites par HOLBOROW *et al.* (1957), par FRIOU (1957), par FRIOU *et al.* (1958) avec une technique indirecte sur des tissus normaux traités par le sérum L.E.

Dans le même temps, HOLMAN et KUNKEL (1957) suggèrent que le facteur L.E. a une affinité pour les nucléoprotéines et que l'ADN joue peut-être un rôle dans cette liaison. Ils obtiennent une phagocytose intense de noyaux cellulaires isolés, exposés au sérum L.E. puis lavés. Ils ont pu éluer de ces noyaux une γ -globuline et constater une diminution importante de la phagocytose de ces noyaux après élution. Ils réussissent l'absorption du facteur L.E. sur des nucléoprotéines extraites de ces noyaux et obtiennent des images de phagocytose de ces nucléoprotéines. Le traitement préalable de ces nucléoprotéines par la désoxyribonucléase supprime l'absorption du facteur L.E. et met en évidence un rôle possible de l'ADN. Ainsi le problème se circonscrit et MIESCHER et STRAESSLE (1957) proposent pour la détection du facteur L.E., une réaction d'agglutination des érythrocytes de mouton préalablement traités à l'acide tannique et recouverts avec de "la nucléoprotéine" ou avec de l'acide désoxyribonucléique. Une technique identique fut préconisée par GOODMAN et BOWSER (1958). Cette technique, remplie de difficultés, fut remplacée peu après par une fixation sur latex (MIESCHER et STRAESSLE, 1959; CHRISTIAN *et al.*, 1958).

C'est également en 1957 que SELIGMANN (1957a, b) entreprend l'étude immuno-chimique des sérums L.E. par *ring-tests*, technique d'Ouchterlony et immuno-électrophorèse selon GRABAR et WILLIAMS. Des sérums L.E. mis en présence d'extraits leucocytaires préparés par les ultra-sons, donnent lieu à la formation de précipités. SELIGMANN identifie dans les extraits leucocytaires un des composants réactionnels sous forme d'ADN et montre que des sérums L.E. mis en présence d'ADN de provenance multiple donnent des précipitations comparables. Il s'efforce de comprendre la nature de la substance sérique responsable, anticorps ou histone, et identifie avec nous les rapports entre cette substance et le facteur L.E. Vingt-quatre sur trente-sept des sérums L.E. qu'il a étudiés ont donné une précipitation avec l'ADN. La substance qui précipite n'est pas une histone et possède les propriétés d'un anticorps:

(a) Elle fixe le complément en présence d'ADN (SELIGMANN et MILGROM, 1957).

(b) Comme l'a montré OVARY (1959), elle donne lieu à des réactions d'anaphylaxie cutanée passive chez le cobaye: on observe l'apparition de taches colorées au point d'injection intra-dermique du sérum L.E.A.D. après injection intra-veineuse d'un mélange ADN-bleu d'Evans.

(c) Elle possède la spécificité antigénique des γ -globulines. D'une part elle précipite avec un hétérosérum anti- γ -globulines humaines, montrant qu'il s'agit bien d'une γ -globuline, d'autre part le précipité spécifique qu'elle donne en présence d'ADN peut être dissocié par la désoxyribonucléase ou les solutions salines concentrées. La substance éluee de ce précipité spécifique a tous les caractères d'une γ -globuline.

La précipitation s'est bien faite avec l'ADN et non avec une impureté contaminante, car les anticorps précipitants sont épuisés par de faibles quantités d'ADN; on retrouve tout l'ADN dans le précipité dans la zone d'excès d'anticorps; la réaction devient négative après action de la désoxyribonucléase et reste positive après l'action de la trypsine. Point important sur lequel nous reviendrons, la réaction est positive avec des ADN de provenance très variée: thymus de veau,

bactériophage, pneumocoque, leucocytes humains, érythrocytes de coq et de canard, sperme de truite, et il ne s'agit pas de réactions croisées car la réaction avec un ADN déterminé devient négative, après épuisement des sérums par une quelconque des autres préparations d'ADN. De plus, par la technique d'OUCHTERLONY, la réaction entre ces différents ADN et le sérum L.E.A.D. donne des lignes de précipitation qui sont en continuité parfaite.

La même année, des conclusions analogues sur la présence d'un facteur sérique précipitant avec l'ADN et fixant le complément ont été apportées par ROBBINS *et al.* (1957); CEPPELINI *et al.* (1957); PEARSON *et al.* (1958).

Cependant, les conclusions de ROBBINS *et al.* (1957) vont ouvrir une controverse: ces auteurs montrent que les noyaux, la nucléoprotéine de thymus de veau, l'histone correspondante et des ADN isolés de thymus, de sperme de saumon, de leucocytes humains et de pneumocoques, fixent inégalement le complément en présence de sérums L.E. Ils observent, en particulier, que la fixation est la plus forte et à des titres approximativement parallèles, avec les noyaux et les ADN; cependant ils ont observé une réaction dissociée, positive avec les noyaux, négative avec l'ADN qui les amène à concevoir l'existence de deux facteurs distincts chez les malades atteints de L.E.A.D.: le facteur L.E. serait responsable de la fixation du complément avec les noyaux, et serait différent du facteur fixant le complément avec l'ADN.

Nous reviendrons sur ces conclusions après avoir résumé les faits qui nous ont amenés à retrouver l'activité L.E. dans le facteur précipitant avec l'ADN.

SELIGMANN (1958) a montré qu'on pouvait éluer une γ -globuline du précipité spécifique sérum L.E.-ADN. Nous avons avec lui (SELIGMANN et ROBINEAUX, 1958) étudié les propriétés cellulaires de cette γ -globuline dans des conditions analogues à celles qui nous ont permis d'élucider le mécanisme intime de formation de la cellule L.E. Lorsqu'on ajoute à des leucocytes vivants, en présence de sérum frais, l'éluat obtenu après traitement du précipité sérum L.E.-ADN par la désoxyribonucléase ou le NaCl 2 M, on observe les faits suivants:

(a) Production d'une lyse nucléaire importante de caractère extensif, suivie d'une rupture du cytoplasme qui reste le plus souvent attaché au noyau.

(b) Présence d'un chimiotactisme positif des leucocytes normaux pour les masses lysées, aboutissant à la constitution d'images en rosettes.

(c) Phagocytose élective de tout ou partie des masses nucléaires lysées, aboutissant à la formation de cellules de Hargraves: le polynucléaire qui phagocyte abandonne les restes cytoplasmiques qui entouraient le noyau lysé.

Ces faits sont rigoureusement superposables à ceux observés lorsqu'on fait agir un sérum de L.E.A.D. sur des leucocytes normaux. Ni les surnageants de contrôle, ni une solution témoin renfermant de l'ADN, de la désoxyribonucléase et du Mg^{++} , à des concentrations identiques à celles de nos expériences, n'ont provoqué la formation de ces images caractéristiques. Nous avons remarqué que la présence de sérum normal frais était indispensable pour que les surnageants contenant l'anticorps anti-ADN, ainsi mis au contact de leucocytes normaux lavés, provoquent le phénomène L.E. Si des leucocytes normaux sont remis en suspension dans leur propre sérum préalablement inactivé par chauffage, les images caractéristiques ne se produisent pas. Ces constatations incitent à envisager le rôle du complément.

L'existence de modifications morphologiques profondes, dans le noyau sous

l'influence des sérums L.E.A.D. et l'origine immunologique de ces modifications ne fait plus de doute. La théorie purement enzymatique de la dépolymérisation (KURNICK *et al.*, 1952a, b; KURNICK, 1953) proposée pour expliquer l'homogénéisation des noyaux n'est plus admise. Elle reposait essentiellement sur la perte d'affinité pour le vert de méthyle, des noyaux traités. On sait, dans le cas présent, que le défaut de coloration par le vert de méthyle ne permet pas de conclure à la dépolymérisation de l'ADN: l'existence d'une incorporation de protéines étrangères, bloquant les radicaux qui sont présumés fixer le vert de méthyle, paraît démontrée (GODMAN et DEITCH, 1957a, b; RIFKIND et GODMAN, 1957). La consommation de complément par les noyaux en présence de sérum L.E.A.D. est un bon argument de l'existence d'une réaction antigène-anticorps. La présence de γ -globuline dans ces noyaux a été montrée et confirmée par de nombreux auteurs utilisant les techniques de fluorescence, et ceci très récemment encore (BARDAWIL, TOY et BAYLES, 1958).

Cependant, l'accord n'est pas complet pour autant. La discussion reste ouverte quant aux structures chimiques intéressées par le ou les anticorps en cause.

Elle ne porte pas sur les rapports entre les globulines qui se fixent sur les noyaux et le facteur L.E., l'absorption du principe formateur de la cellule L.E. sur des noyaux isolés n'est discutée par personne.

La discussion ne porte pas non plus sur la nature même du facteur sérique précipitant avec l'ADN. SELIGMANN (1958), DEICHER *et al.* (1959), ont bien discuté ce point. Les conditions dans lesquelles l'ADN précipite, le caractère immunologique des courbes de précipitation obtenues, le fait que le complément est fixé pendant ces réactions, permettent d'exclure la possibilité de réactions non spécifiques entre ADN et protéines en général. Cependant l'influence de la concentration en sels dans les réactions de précipitation est plus marquée qu'habituellement avec d'autres systèmes antigène-anticorps; il y aurait une importante participation de groupes chargés dans la réaction ADN-facteur L.E.A.D. (DEICHER *et al.*, 1959). Ce facteur précipitant paraît donc bien être une γ -globuline.

Ce sont les rapports entre le facteur précipitant l'ADN et le facteur responsable de la formation de la cellule L.E. qui sont encore controversés. Pourquoi?

Nous avons rapporté plus haut les travaux de FRIOU *et al.* (1958) d'HOLBORROW *et al.* (1957) et de BARDAWIL *et al.* (1958). Les γ -globulines sériques qu'on peut détecter avec des anticorps fluorescents sur des préparations cyto-histologiques traitées par le sérum L.E.A.D., sont celles qui, dans la plupart des cas, provoquent la formation de la cellule L.E. Un traitement préalable des préparations par la désoxyribonucléase supprime cette fluorescence. Il résulte de ce traitement enzymatique une perte d'affinité des noyaux pour les γ -globulines L.E.A.D. Ces faits suggéraient l'existence de rapports étroits entre facteur inducteur L.E. et facteur précipitant l'ADN.*

* Nous devons toutefois signaler des essais récents faits par AISENBERG (1959) directement avec des γ -globulines L.E.A.D. fluorescentes, et non plus avec des anti- γ marquées comme dans le *sandwich* de COONS, utilisé par les auteurs précités. Il n'est pas parvenu à empêcher, par la désoxyribonucléase, la fixation des γ -globulines L.E.A.D. fluorescentes sur des noyaux; il n'est pas non plus parvenu à extraire par la désoxyribonucléase ces γ -globulines fluorescentes préalablement fixées. Il a pu, par contre, extraire complètement par le NaCl 1 M un complexe d'ADN, de protéines non histoniques et d'histone en faisant perdre ainsi au noyau sa fluorescence. Il suggère alors que le facteur L.E. réagit avec la fraction protéinique non histonique plutôt qu'avec l'ADN du noyau.

Lorsque nous avons relaté nos expériences avec SELIGMANN (SELIGMANN et ROBINEAUX, 1958) nous avons fait deux réserves: (a) certains sérums L.E.A.D. contiennent le facteur formateur de cellule L.E. et ne contiennent pas le facteur précipitant avec l'ADN; (b) le phénomène L.E. persiste dans les sérums L.E.A.D. après épuisement de l'anticorps précipitant de ces sérums avec l'ADN. Ce dernier point a été largement confirmé par d'autres auteurs (ROBBINS *et al.*, 1957; HYMANS, 1958).

En fait, nous étions seuls jusqu'ici à obtenir à partir du précipité spécifique, un éluat susceptible d'induire le phénomène L.E. Pour lever l'apparente contradiction de la seconde réserve, d'autres éluats ont été récemment testés provenant de huit nouveaux sérums pathologiques—nous avons obtenu les mêmes résultats: les précipités spécifiques contiennent le principe inducteur; ils en contiennent même d'autant plus qu'on se trouve dans la zone d'équivalence.

Nous venons d'apprendre qu'HYMANS (1959) a, ces jours-ci, confirmé nos observations, avec nos propres sérums mais un autre ADN.

Ainsi donc, DEICHER *et al.* (1959) pensent que le facteur précipitant l'ADN et le facteur inducteur de la cellule L.E. sont deux globulines séparées. Ils supposent que ce dernier réagit spécifiquement avec la nucléoprotéine nucléaire; la réaction exigerait ADN et histone pour se produire.

Nous avons de notre côté (SELIGMANN et ROBINEAUX, 1958), de même qu'HYMANS, retrouvé une activité L.E. dans le précipité spécifique avec l'ADN, mais aussi dans le sérum L.E.A.D. épuisé par l'ADN. Comment expliquer ces faits?

DEICHER *et al.* (1959) invoquent l'existence d'une faible réaction croisée entre le facteur formateur de cellule L.E. et l'ADN seul, ou encore d'une co-précipitation entre ces éléments. SELIGMANN (1958, 1959) suggère, sur des analogies, que la spécificité de l'anticorps antiprotéine non épuisé par l'ADN et inducteur de la cellule L.E. au même titre que l'anticorps épuisé pourrait correspondre à un groupement situé entre ADN et protéine. Il invoque aussi: la possibilité d'anticorps dirigés contre des groupements spécifiques différents de la molécule d'ADN et l'existence de complexes antigène-anticorps solubles passant dans le surnageant à partir du précipité spécifique sérum L.E.A.D.-ADN et susceptibles de jouer le rôle d'anticorps isolé au contact des protéines des noyaux leucocytaires réactifs. Cette hypothèse serait conforme aux constatations de BORDUAS et GRABAR (1953) sur le comportement de complexes solubles obtenus dans la zone d'excès d'antigène dans la réaction d'hémagglutination. Il reste à la démontrer.

La tendance actuelle est de considérer les anticorps anti-noyaux des sérums L.E.A.D. comme multiples. Nous en avons déjà parlé en rapportant plus haut les résultats de ROBBINS *et al.* (1958). Ces faits ont été vus par d'autres, par MIESCHER (1958), HYMANS et KLEIN (1959) et par SELIGMANN (1959). Ce dernier observe: des précipitations entre sérum L.E. et nucléoprotéine alors que la réaction avec l'ADN est négative, et la persistance de réaction positive avec les nucléoprotéines après absorption par l'ADN.

KUNKEL *et al.* (1959), enfin, auraient obtenu des réactions positives dans le L.E.A.D., mais aussi dans des maladies autres que le L.E.A.D., avec des substances extraites des noyaux, par les tampons, et dont le constituant actif n'est ni la nucléoprotéine, ni l'ADN, ni l'histone.

L'existence de propriétés antigéniques des ADN et des désoxyribonucléoprotéines ne paraît guère pouvoir être discutée. Tous les faits empruntés à la pathologie que nous avons rapportés plaident dans ce sens. Il n'est pas dans notre propos de discuter de la place de ces anticorps dans le L.E.A.D., ni de leur signification du point de vue de la pathologie générale, nous renvoyons le lecteur à des mises au point récentes (KOURILSKY *et al.*, 1958; ROBINEAUX et VOISIN, 1959; KOURILSKY, 1959). Par contre nous devons essayer de comparer sur certains points ces anticorps pathologiques aux anticorps expérimentaux dont nous avons parlé au début de l'exposé. Ces derniers paraissent difficiles à obtenir, et les structures nucléaires semblent au total assez pauvrement antigéniques. A l'opposé, nous sommes frappés de la facilité avec laquelle les malades atteints de L.E.A.D. fabriquent des anticorps réagissant avec certains de leurs noyaux.

On sait, bien sûr, que ces malades fabriquent très facilement des anticorps contre de multiples antigènes et l'hypothèse d'une autosensibilisation contre certaines de leurs structures nucléaires doit être retenue. Encore faut-il supposer des modifications suffisantes de ces structures qui leur feraient perdre leur spécificité d'individu tout en leur conservant leur spécificité d'organe, selon la théorie de formation des auto-anticorps (VOISIN, 1956): l'organisme malade ne reconnaissant plus ces structures modifiées fabriquerait contre elles des anticorps. Ceux-ci pourraient ensuite réagir, non seulement contre les antigènes nucléaires inducteurs mais aussi contre des antigènes homologues ou hétérologues; nous avons vu que les anticorps du L.E.A.D. étaient hétéro-spécifiques et qu'en particulier, ils pouvaient réagir contre de multiples ADN. C'est là un point qui est d'ailleurs en contradiction avec les expériences de BLIX *et al.* (1954) qui ont montré l'absence de réactivité des sérums expérimentaux anti-ADN, mis en présence d'ADN d'autre nature que l'ADN sensibilisant, ce qui tend à montrer une certaine spécificité du tissu d'origine de l'acide nucléique. Quoiqu'il en soit, si cette hypothèse est la bonne, la nature des modifications nécessaires pour que la molécule devienne antigénique reste mystérieuse. Dans cette autosensibilisation, l'antigène pourrait d'ailleurs être d'origine étrangère, il pourrait s'agir, comme le suggère SELIGMANN (1958) d'anticorps anti-ADN fabriqués par ces malades à l'occasion d'infections bactériennes, streptococciques par exemple, et qui réagiraient avec l'ADN de certains de leurs noyaux cellulaires, l'ADN nucléaire se comportant comme un haptène, c'est à dire comme une substance incapable d'entraîner à elle seule la formation d'anticorps mais susceptible de réagir avec un anticorps déjà formé. Ce ne sont là que des hypothèses.

Retenons comme pratiquement certaine, au cours du L.E.A.D., la formation d'anticorps multiples dirigés contre différentes structures chimiques du noyau, sans qu'on puisse dire s'il s'agit de structures normales ou modifiées. Retenons l'existence probable d'anticorps expérimentaux obtenus avec des noyaux cellulaires, des nucléoprotéines et des ADN, sans oublier que les résultats formulés par les expériences systématiques faites dans ce domaine ne peuvent être considérés comme décisifs et devraient être repris. Les conclusions les plus importantes, celles de BLIX *et al.* (1954) ne reposent pratiquement que sur une seule technique immunologique. Les essais de reproduction du phénomène L.E. tentés par MIESCHER

avec des antisérums expérimentaux ne sont pas, à cause des techniques cytologiques utilisées, absolument convaincants.

Bien entendu, la tâche reste grande dans le domaine des anticorps pathologiques, anti-ADN en particulier, pour préciser la nature des déterminants antigéniques réactifs. Des travaux dans ce sens sont actuellement poursuivis (SELIGMANN, 1959). Cependant, c'est sous l'angle de l'antigénicité des structures chimiques normales du noyau que le travail devrait être maintenant essentiellement repris et continué.

RÉSUMÉ

Ce travail se propose un double but: d'une part faire le point des travaux réalisés chez l'animal à l'aide de structures nucléaires ou de constituants nucléaires considérés comme antigènes; d'autre part reprendre, par comparaison avec ces travaux, ce que nous apporte l'étude de certains phénomènes sérologiques et cellulaires dans le "Lupus Erythémateux Aigu Disséminé" (L.E.A.D.).

Il semble bien établi actuellement qu'il existe dans cette affection un ensemble de réactions immunologiques dans lesquelles les noyaux ou les constituants nucléaires représentent des antigènes. On détecte en effet dans le sérum des malades les γ -globulines qui leur correspondent et possèdent les caractères reconnus aux anticorps.

On est frappé par le petit nombre et le caractère incomplet des travaux sur les immunsérums expérimentaux. Ils devraient être repris à l'aide des techniques immunologiques précises dont nous disposons actuellement. Quoiqu'il en soit, il semble qu'on ait effectivement obtenu expérimentalement des anticorps dirigés contre l'ADN ou des noyaux, mais ils sont difficiles à obtenir, et l'antigénicité des structures nucléaires semble faible.

Dans le cas du L.E.A.D., il est intéressant de souligner les faits suivants: (a) le déroulement même du phénomène L.E. qui suit un processus bien particulier, où la lyse nucléaire revêt un aspect caractéristique qui semble conditionner l'ensemble du phénomène; (b) la fixation incontestable d'une ou plusieurs substances, fixant le complément, sur les noyaux qui seront le siège du phénomène L.E. et le caractère d'opsonines spécifiques de ces substances; (c) l'obtention d'un précipité spécifique entre ADN et sérum L.E.A.D.; (d) le rôle de la désoxyribonucléase, capable d'inhiber la fixation d'anticorps sur les noyaux traités et permettant l'éluion d'un principe actif à partir d'un précipité spécifique ADN-sérum L.E.A.D.; (e) la multiplicité des anticorps anti-nucléaires, autres qu'anti-ADN, trouvés dans le sérum des malades atteints de L.E.A.D; (f) le fait que, contrairement aux immunsérums expérimentaux, les sérums L.E.A.D. réagissent avec des ADN de sources très variées.

L'antigénicité de structures nucléaires, chimiquement bien définies, considérées d'un point de vue pathologique chez l'homme ou expérimental chez l'animal, est très probable mais nécessitera encore de nombreux travaux avant d'être parfaitement connue et comprise. La comparaison des immunsérums, pathologiques ou expérimentaux, fait ressortir des divergences qui restent, pour l'instant, inexplicables.

BIBLIOGRAPHIE

- AISENBERG A. C. (1959) *J. Clin. Invest.* **38**, 325.
- BARDAWIL W. A., TOY B. L. et BAYLES T. B. (1958) *Amer. J. Path.* **34**, 607.
- BESSIS M. et TABUIS J. (1954) *Rev. Hémat.* **9**, 127.
- BLIX U., ILAND C. N. et STACEY M. (1954) *Brit. J. Exp. Path.* **35**, 241.
- BORDUAS A. G. et GRABAR P. (1953) *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 903.
- CAPELLI E. (1952) *Minerva Derm.* **27**, No. 10.
- CEPPELINI R., POLLI E. et CELADA F. A. (1957) *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y. **96**, 572.
- CHRISTIAN C. I., MENDEZ-BRYAN R. et LARSON B. L. (1958) *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y. **98**, 820.
- DAMESHEK W. et BLOOM M. L. (1950), *Blood* **5**, 101.
- DEICHER H. R. G., HOLMAN H. R. et KUNKEL H. G. (1959) *J. Exp. Med.* **109**, 97.
- DELAUNAY A. et PAGES J. (1946) *Rev. Immunol.* **10**, 33.
- FINCH S. C., ROSS J. F. et EBAUCH F. G. (1953) *J. Lab. Clin. Med.* **42**, 555.
- FREDERIC J. et ROBINEAUX R. (1951) *J. Physiol., Paris* **43**, 732.
- FRIOU G. J. (1957) *J. Clin. Invest.* **36**, 890.
- FRIOU G. J., FINCH S. C. et DETRE K. D. (1958) *J. Immunol.* **80**, 324.
- GODMAN G. C. et DEITCH A. D. (1957a) *J. Exp. Med.* **106**, 575.
- GODMAN G. C. et DEITCH A. D. (1957b) *J. Exp. Med.* **106**, 593.
- GOLD S. C. (1952) *J. Invest. Derm.* **19**, 333.
- GOODMAN H. G. et BOWSER R. (1958) *Fed. Proc.* **17**, 220.
- HARGRAVES M. M., RICHMOND H. et MORTON R. (1948) *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **23**, 25.
- HASERIK J. R., LEWIS L. A. et BORTZ D. W. (1950) *Amer. J. Med. Sci.* **219**, 660.
- HEIDELBERGER M. et SCHERP H. W. (1939) *J. Immunol.* **37**, 536.
- HOLBOROW E. J., WEIR D. M. et JOHNSON G. D. (1957) *Brit. Med. J.* No. 5047, 732.
- HOLMAN H. R. et KUNKEL H. G. (1957) *Science* **126**, 162.
- HYMANS W. (1958) Cité par SELIGMANN M. (1958) *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.* **3**, 558.
- HYMANS W. (1959). Communication personnelle.
- HYMANS W. et KLEIN F. (1959) cités par SELIGMANN M. dans "Proceedings of the Eighth Congress of International Society of Blood Transfusion, London 1959". S. Karger, Bâle. Sous presse.
- KLEMPERER P., GUEFT B., LEE S. L., LEUCHTENBERGER C. et POLLISTER A. W. (1950) *Arch. Path. (Lab. Med.)* **49**, 503.
- KOURILSKY R., VOISIN G. et ROBINEAUX R. (1958) Dans *Huit Colloques de Biologie Clinique*. p. 781. Presses Académiques, Bruxelles.
- KOURILSKY R. (1959) *J. Med. Alger* Sous presse.
- KUNKEL H. G., HOLMAN H. R. et DEICHER R. G. (1959) dans *Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity*, publié par WOLSTENHOLME G. E. W. et O'CONNOR C. M., Churchill, London.
- KURNICK N. B. (1953) *Amer. J. Med.* **14**, 753.
- KURNICK N. B., PARISER S., SCHWARTZ L. I., LEE S. L. et IRVINE W. (1952a) *J. Clin. Invest.* **31**, 1036.
- KURNICK N. B., SCHWARTZ L., PARISER S. et IRVINE W. (1952b) *J. Clin. Invest.* **31**, 645.
- LACKMAN D., MUDD S., SEVAG M. G., SMOLENS J. et WIENER M. (1941) *J. Immunol.* **40**, 1.
- LAWLIS J. F. (1958) *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y. **98**, 300.
- MARMONT A. (1952) *Schweiz. med. Wschr.* **82**, 1111.
- MELLORS R. C., ORTEGA M. D. et HOLMAN H. R. (1957) *J. Exp. Med.* **106**, 191.
- MENZEL A. et HEIDELBERGER M. (1938) *J. Biol. Chem.* **124**, 301.
- MIESCHER P. (1953) *Schweiz. med. Wschr.* **83**, 1042.
- MIESCHER P. (1955) *Vox Sang.* **5**, 121.
- MIESCHER P. (1958) Dans *Troisième Congrès International d'Allergologie, Paris 1958* p. 537. Flammarion, Paris.
- MIESCHER P. et FAUCONNET M. (1954a) *Experientia* **10**, 252.
- MIESCHER P. et FAUCONNET M. (1954b) *Schweiz. med. Wschr.* **84**, 1036.
- MIESCHER P. A., FAUCONNET M. et BERAUD T. (1953) *Exp. Med. Surg.* **11**, 173.
- MIESCHER P. et STRAESSLE R. (1957) *Vox Sang.* **2**, 283.

- MIESCHER P. et STRAESSLE R. (1959) Dans *Premier Symposium d'Immunopathologie Seelisberg*. 1958, p. 454. Benno Schwabe, Basel.
- MOORE R. D., WEISBERGER, A. S. et BOWERFIND E. S. (1956) *Arch. Path. (Lab. Med.)* **62**, 472.
- MOYER J. B. et FISHER G. S. (1950) *Amer. J. Clin. Path.* **20**, 1011.
- NELSON R. A., JR et LEBRUN J. (1956) *J. Hyg., Camb.* **54**, 8.
- OVARY, Z. (1959) Inédit.
- PEARSON C. M., CRADDOCK C. G. et SIMMONS N. S. (1958) *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 580.
- PENNEL L. R. B. (1939) *Abstracts and Communications of the Third International Congress for Microbiology, New York 1939*, p. 791. Waverly Press, Baltimore.
- POLLI E. et CELADA F. (1958) cités par SELIGMANN M. dans "*Proceedings of the Seventh Congress of International Society of Blood Transfusion, Rome 1958*". p. 849. S. Karger, Bâle.
- REBUCK J. W. et BERGMAN L. (1950) *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* **75**, 259.
- RIFKIND R. A. et GODMAN G. C. (1957) *J. Exp. Med.* **106**, 607.
- ROBBINS W. C., HOLMAN H. R., DEICHER H. et KUNKEL H. G. (1957) *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* **96**, 575.
- ROBINEAUX R. (1950) *Sang* **21**, 791.
- ROBINEAUX R. (1954) *Rev. Hémat.* **9**, 364.
- ROBINEAUX R. (1956) *Ann. Inst. Pasteur* **91**, 109.
- ROBINEAUX R. (1958a) Dans *International Symposium on the Mechanisms of Hypersensitivity* p. 371. Little, Brown, Detroit.
- ROBINEAUX R. (1958b) Dans *Premier Symposium d'Immunopathologie Seelisberg* 1958 p. 416. Benno Schwabe, Basel.
- ROBINEAUX R. et VOISIN G. (1959) *Belg. Tijdschr. Geneesk.* **15**, 105.
- ROHN R. J. et BOND W. H. (1953) *J. Lab. Clin. Med.* **42**, 939.
- SELIGMANN M. (1957a) *Vox Sang.* **2**, 270.
- SELIGMANN M. (1957b) *C.R. Acad. Sci., Paris* **245**, 243.
- SELIGMANN M. (1958) *Rev. Franc. Et. Clin. Biol.* **3**, 558.
- SELIGMANN M. (1959) *Premier Symposium d'Immunopathologie Seelisberg* 1958 p. 402. Benno Schwabe, Basel.
- SELIGMANN M. (1959) dans *Proceedings of the Seventh Congress of International Society of Blood Transfusion, London 1959*, S. Karger, Bâle. Sous presse.
- SELIGMANN M. et MILGROM F. (1957) *C.R. Acad. Sci., Paris* **245**, 1472.
- SELIGMANN M. et ROBINEAUX R. (1958) *C.R. Acad. Sci., Paris* **246**, 1472.
- SEVAG M. G., LACKMAN D. B. et SMOLENS J. (1938) *J. Biol. Chem.* **124**, 425.
- VOISIN G. (1956) *Rev. Hémat.* **11**, 49.
- VASQUEZ J. et DIXON F. J. (1957) *Lab. Invest.* **6**, 205.
- WINKENWERDER W. L., BUELL, M. V. et HOWARD J. E. (1939) *Science* **90**, 356.
- ZIMMERMAN H. J., WALSH J. R. et HELLER P. (1953) *Clin. Fed. Proc.* **1**, 69.

DISCUSSION

P. ALEXANDER: Which is the isoelectric point of your globulin?

R. ROBINEAUX: Pour répondre à la question de M. ALEXANDER concernant le pH auquel se font les précipitations spécifiques, je peux dire que les réactions de précipitation en gélose entre sérum L.E. et ADN, se font à un pH de 7 ou 8,2 selon le type de réaction utilisé. Récemment DEICHER *et al.* ont discuté la question de la précipitation non spécifique entre protéines et ADN qui se fait à pH acide et ne se produit pas au-dessus de pH 7.

A. DELAUNAY:

(1) Dans les sérums de malades atteints de lupus érythémateux, quel élément distingue les cellules dont le noyau va être phagocyté de celles qui vont phagocyter?

(2) Observe-t-on des images comparables à celles qui sont montrées par votre film quand, *in vitro*, on ajoute par exemple à un sérum de lapin antileucocyte de cobaye des leucocytes de cobaye (e.g. phagocytose du seul noyau leucocytaire)?

(3) Des noyaux cellulaires isolés sont-ils, en règle générale, aisément phagocytés?

R. ROBINEAUX:

(1) Un fait est connu: lorsqu'on fait agir des leucocytes vivants sur des préparations de cellules mortes préalablement traitées par le sérum pathologique, on obtient un très grand nombre de cellules L.E. Cette constatation est à l'origine d'une théorie selon laquelle seuls les noyaux des cellules mortes sont atteints par le facteur L.E.

Nous avons montré qu'il n'en était pas réellement ainsi puisque des cellules vivantes participant à la formation de rosettes peuvent être au cours de la constitution de ces éléments, touchés par le facteur L.E. Pour expliquer que certains leucocytes seulement sont touchés sans qu'on puisse décider d'ailleurs à l'examen d'une population de cellules, lesquelles seront atteintes, nous avons fait intervenir la notion de gradient de vitalité. Toutes les cellules ne sont pas au même stade de leur existence, la population est hétérogène, les plus âgées d'entre elles sont assez vraisemblablement les plus fragiles. Il n'est pas exclu que leur perméabilité soit plus grande, traduisant un début d'altération non morphologiquement décelable. Ces modifications de perméabilité seraient à leur maximum dans les cellules mortes. Ceci cadre assez bien avec le caractère massif et brutal de la lyse qu'on observe dans les noyaux de cellules mortes quand on ajoute le sérum L.E. alors que les noyaux des cellules vivantes qui seront atteints présentent dans les mêmes conditions, une lyse nucléaire bien plus progressive.

(2) Nous insistons longuement dans notre texte sur ce problème. Notre étude dynamique nous a précisément permis de différencier complètement l'action des sérums L.E. de l'action des sérums antileucocytaires. Dans ce dernier cas, la sensibilisation est essentiellement cytoplasmique; on observe, ou bien une phagocytose cellulaire suivie ultérieurement d'une lyse nucléaire dans la cellule phagocytée ou bien si les sérums sont très actifs des lésions cytoplasmiques et nucléaires évoluant parallèlement avec éclatement du noyau qui se mélange au cytoplasme, la phagocytose peut intervenir ultérieurement sur cette masse nucléocytoplasmique indistincte. On n'observe jamais de phagocytose exclusive du noyau.

(3) Nous n'avons pas une grande expérience personnelle de ce problème. On observe assez facilement semble-t-il une phagocytose de noyaux isolés lorsqu'on met en présence des noyaux et un sérum normal hétérologue; nous ne pensons pas qu'il y ait de phagocytose notable quand les éléments en présence sont homologues ou autologues. Nous avons dit que des noyaux lysés de leucocytes humains traités par un sérum L.E. donc homologue, n'étaient phagocytés qu'après des modifications profondes. On ne doit pas oublier que dans le phénomène L.E., la phagocytose étroitement spécifique d'une seule structure cellulaire, ne représente qu'un temps secondaire. Le temps primordial c'est l'incorporation de protéines étrangères, probablement des γ -globulines, au niveau du noyau qui acquiert de ce fait une morphologie et des propriétés physiques et chimiques nouvelles.

R. VENDRELY: M'excusant être arrivé légèrement en retard au début de l'exposé de M. ROBINEAUX, je le prie de me donner quelques précisions sur ce qu'il sait de la spécificité de l'anticorps mis en évidence, vis-à-vis de nucléoprotéines ou d'ADN de provenances variées.

R. ROBINEAUX: Ce point de la spécificité des anticorps dans les sérums L.E. a été longuement discuté par les auteurs qui se sont occupés de cette question. Vous trouverez dans notre texte les faits qui plaident en faveur de cette spécificité. Je peux, toutefois, vous les résumer. En ce qui concerne l'anticorps anti-ADN: la courbe de précipitation des sérums lupiques en présence d'ADN est de type immunologique, rapidement croissante en excès d'anticorps, horizontale au point d'équivalence, lentement décroissante en excès d'antigène; les anticorps précipitants sont épuisés par une faible quantité d'ADN; tout l'ADN est retrouvé dans le précipité, dans la zone d'excès d'anticorps; la désoxyribonucléase, négative les réactions mais pas la trypsine.

M. ERRERA: Connait-on le sort de l'ADN ainsi phagocyté?

R. ROBINEAUX: Aucune expérience n'a, à ma connaissance, été faite qui permette de répondre à votre question. Les seuls renseignements qu'on pourrait donner, concernent l'évolution du noyau lysé dans la cellule L.E.; mais ils sont pauvres car nous n'avons pas fait porter notre étude sur ce point. L'évolution d'une cellule L.E. se fait vers la mort dans un délai assez rapide. Les noyaux phagocytés pourraient subir l'action des enzymes cytoplasmiques comme c'est le cas pour les bactéries. On peut en effet souvent observer autour des masses nucléaires phagocytées, des formations claires en croissant, représentant sans doute une vacuole. Nous n'avons cependant jamais observé de disparition de la masse phagocytée, mais quelquefois sa recondensation en une masse réduite très dense en contraste de phase.

P. MANDEL: Quelle est l'origine de l'ADN ayant servi pour la réaction de précipitation?

R. ROBINEAUX: Les réactions de précipitation entre ADN et sérums lupiques ont été faites par mon collègue et ami, M. SELIGMANN. C'est l'ADN de thymus de veau isolé par M. BARBU, par la technique de SIGNER et SCHWARDER modifiée, qui a été essentiellement utilisé pour l'étude du phénomène inducteur de la cellule L.E. par l'anticorps précipitant avec l'ADN. D'autres ADN ont servi aux expériences, ils étaient de provenance très variée (bactériophages, salmonelles, pneumocoques, leucocytes humains, hématies d'oiseau, sperme de truite) et ont permis de préciser le caractère hétérospécifique de l'anticorps précipitant avec l'ADN. Cette hétérospécificité avait été, rappelons-le décrite par MIESCHER avec des noyaux isolés.

J. TURCHINI. Je serais heureux d'avoir quelques précisions sur le mécanisme de l'action des ultra-sons que M. ROBINEAUX a utilisés.

R. ROBINEAUX: Je n'ai pas étudié personnellement l'action des ultra-sons. Je n'ai fait que relater quelques observations de BLIX *et al.* concernant l'antigénicité des ADN ultra-sonnés, qui disparaît après ce traitement et des constatations de SELIGMANN montrant que l'ADN ultra-sonné réagit encore avec le facteur sérique précipitant. Cette constatation est d'ailleurs à rapprocher d'une autre observation

de BLIX *et al.* selon laquelle l'ADN ultra-sonné peut inhiber la fixation du complément entre immunsérums expérimentaux anti-ADN et ADN intact.

Il semble donc que les ultra-sons suppriment l'antigénicité de l'ADN mais n'empêche pas la réactivité avec les antisérums correspondants pathologiques ou expérimentaux. D'après des observations très récentes de SELIGMANN et BARBU l'anticorps pathologique réagirait avec des chaînes comprenant dix à cinquante nucléotides.

Quant au mécanisme d'action des ultra-sons, je demanderai, à un physico-chimiste de l'assistance de répondre à ma place: je crois qu'il n'y a pas dénaturation.

M. THOMAS: Les ultra-sons fragmentent les molécules d'ADN en segments qui, chacun, gardent leur structure secondaire en double hélice: il y a fragmentation sans dénaturation.

R. WEGMANN: Trouve-t-on des *L.E.-cells* également dans la sérosité des bulles de lupus?

R. ROBINEAUX: Je ne saurais vous le dire, mais il n'est pas exclu, *a priori*, qu'elles y existent. Rappelons qu'on peut les provoquer avec d'autres exsudats, tels que les exsudats pleuraux qui contiennent le facteur L.E.

R. WEGMANN: Je vous ai posé cette question parce que, il y a plusieurs années, nous avons constaté un fait troublant qui pourrait être en rapport avec de pareilles cellules, ou du moins avec leur antigénicité. Dans de la sérosité de bulles la dénaturation se produisait très facilement comme s'il existait un état latent de dénaturation. Le simple étalement de la sérosité sur les prismes dénaturait irréversiblement les protéines à moins que la dénaturation ait déjà existé dans la sérosité du sujet vivant. Ce fait, démontré par spectrographie infra-rouge, n'a jamais pu être retrouvé dans d'autres cas, comme par exemple dans la maladie de Brocq-Dühning ou encore dans de la sérosité de bulles dues à des brûlures, voire même d'une solution d'eau albumineuse.