

maternal antibodies anti-Rh or auto-antibodies, penetrate the normoblasts and, there, come into contact with the respective specific antigens.

A consequence of the immunizing conflict is that partial reduction of the surface tension occurs in the nucleo-cytoplasmic interphase which leads to the formation of "shoots" and the transformation of the normoblastic nucleus into the pathological form of paraerythroblasts.

241

## Étude du système inhibiteur de la leucoagglutination

J. COLOMBANI ET J. DAUSSET

Paris, France

L'existence d'une substance inhibitrice de la leucoagglutination est démontrée depuis plusieurs années. Nous avons tenté d'en préciser les caractères, et nous croyons pouvoir affirmer son identité avec le complément ou une fraction de celui-ci.

Dans la technique de recherche des leucoagglutinines que nous employons, le sérum à tester doit être utilisé après inactivation par chauffage à 56°, faute de quoi les sérums leucoagglutinants les plus puissants donnent un résultat négatif. Rappelons que cette technique consiste à mettre en présence un volume de suspension leucocytaire et deux volumes du sérum à tester pur ou dilué en sérum normal inactivé: la suspension leucocytaire est préparée à partir de sang défibriné additionné du  $\frac{1}{4}$  de son volume de polyvinylpyrrolidone, à 3,5 %. La lecture est faite microscopiquement au faible grossissement après 1 heure 30 d'incubation à 37°.

En faisant varier les constituants de la réaction, nous pensons avoir montré la réalité de la substance inhibitrice, et éliminé l'hypothèse d'une activation de la leucoagglutinine par chauffage. On voit dans le tableau I que lorsque la totalité ou les  $\frac{2}{3}$  de la réaction sont représentés par du sérum frais, celle-ci est négative.

Lorsque seulement  $\frac{1}{3}$  de la réaction comporte du sérum frais, la leucoagglutinine peut agir.

Enfin on peut dire que la leucoagglutinine n'est pas activée par le chauffage puisque une leucoagglutinine non chauffée peut donner un résultat positif si elle est convenablement diluée.

Tableau I

Variations de la leucoagglutination, en fonction de la quantité de sérum frais présente dans la réaction

|   | Sérum leucoagglutinant (2 volumes) | Milieu dans lequel est faite la suspension leucocytaire (1 volume) | Quantité de sérum frais présente dans la réaction | Leucoagglutination |
|---|------------------------------------|--|---|--------------------|
| 1° L'inhibition de la leucoagglutination est due à un excès de sérum frais dans la réaction | frais                              | sérum frais  | 3 volumes   | -                  |
|   | frais                              | saline   | 2 volumes   | -                  |
|   | inactivé                           | sérum frais  | 1 volume  | +                  |
| 2° La disparition de l'inhibition n'est pas due au chauffage de la leucoagglutinine         | frais dilué au 1/2 en saline       | saline   | 1 volume  | +                  |

Le premier caractère de l'inhibiteur est sa thermolabilité: il est détruit par 3 minutes de chauffage à 56°. Il est sensible au vieillissement, il disparaît après quelques jours de conservation à température de laboratoire, en même temps que le taux de complément du sérum s'abaisse. Il est sensible à l'action de substances doués de pouvoir anticomplémentaire telle que le citrate de sodium, l'EDTA et l'héparine.

Nous avons étudié parallèlement l'action de ces substances sur la réaction de leucoagglutination et sur la réaction d'hémolyse par le sérum humain frais des hématies de mouton sensibilisées par un sérum anti-mouton.

Nous avons recherché pour chacune de ces substances la dose partiellement inhibitrice du complément hémolytique, c'est-à-dire la dose qui diminue environ de moitié l'activité du complément. Lorsque l'on ajoute à une réaction de leucoagglutination faite en sérum frais, du citrate de sodium ou de l'EDTA aux doses ainsi déterminées on voit réapparaître l'agglutination. Le mécanisme d'action du citrate et de l'EDTA est le même: déplacement du  $Ca^{++}$  nécessaire à la fixation de C' 1 premier composant actif du complément. On peut donc penser que comme le complément l'inhibiteur de la leucoagglutination a besoin de  $Ca^{++}$  pour agir.

L'héparine est également capable, à faible dose, d'empêcher l'action de l'inhibiteur, mais cette dose est différente de celle qui inhibe partiellement le complément.

Le dernier argument en faveur de l'identité du complément et de l'inhibiteur est la possibilité de fixation élective du complément sur un système antigène-anticorps. On peut ainsi décomplémenter un sérum leucoagglutinant, en même temps que le complément l'inhibiteur disparaît (tableau II).

Nous avons utilisé comme complexe antigène-anticorps des hématies A revêtues d'anti-A immun préalablement inactivé, puis ces hématies ont été lavées, hémolysées, et lavées à nouveau. Ce sont les stromas sensibilisés qui ont servi à fixer le complément et l'inhibiteur à la fois d'un sérum normal et d'un sérum leucoagglutinant frais. Des témoins ont été faits en traitant les mêmes sérums par des stromas non sensibilisés.

Tableau II

Disparition du pouvoir inhibiteur de la leucoagglutination d'un sérum dont le complément a été absorbé sur un complexe antigène-anticorps

| Sérum leucoagglutinant   | Complément dans le sérum | Leuco-agglutination |
|--|--------------------------|---------------------|
| frais  | présent                  | -                   |
| inactivé   | absent                   | +                   |
| absorbé sur stromas d'hématies A sensibilisées par un anti-A immun | absent                   | +                   |

On voit donc que comme le complément, l'inhibiteur est thermolabile, sensible au vieillissement, que son action est empêchée par les substances anti-complémentaires, qu'il se fixe électivement sur un complexe antigène-anticorps.

Un argument supplémentaire est apporté par le fait que les sérums de malades atteints de lupus érythémateux disséminé, s'ils contiennent fréquemment une substance leucoagglutinante, sont dépourvus d'inhibiteur. La leucoagglutinine est active même en sérum frais, or le plus souvent ces malades présentent une baisse importante de titre de complément.

Il semble donc possible de conclure à l'identité de l'inhibiteur et du complément.

Certains auteurs ont nié la nécessité d'inactiver les sérums pour mettre en évidence la leucoagglutinine, nous pensons que ceci est dû dans la plupart des cas à des différences de techniques: suspension leucocytaire en sérum physiologique ou en plasma sequestré ou citaté, toutes modifications qui suffisent à empêcher partiellement l'action du complément et partant de l'inhibiteur.

#### *L'action du complément est quantitative*

En effet lorsqu'on fait varier dans une série de réactions de leucoagglutination la quantité de sérum frais, et partant de complément on observe une variation du titre de la leucoagglutinine. On voit que la leucoagglutination est optima pour des quantités de sérum frais de l'ordre du  $\frac{1}{3}$  du taux normal. L'effet inhibiteur commence à se manifester lorsque 50 à 60 % du complément est présent, il est total au delà (fig. 1).

En l'absence de complément, la réaction de leucoagglutination est négative dans 3 cas sur 10.

Ce fait a été vérifié soit en utilisant une leucoagglutinine chauffée et une suspension leucocytaire en sérum physiologique, ou encore en ajoutant à la réaction des substances anti-complémentaires à forte dose. La présence d'une petite quantité de sérum frais est nécessaire pour que l'agglutination se produise. On peut donc parler d'une substance activatrice qui présente elle aussi les caractères du C'. Elle est présente dans le sérum humain et dans le sérum de cobaye, en quantité proportionnelle à la teneur de ces sérums en complément. La quantité d'activateur

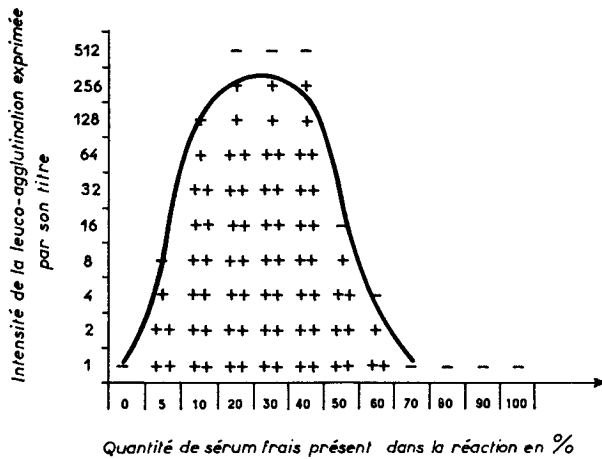


Fig. 1. Variations de la leuco-agglutination en fonction de la quantité de sérum frais et de complément présent dans la réaction.

capable de faire apparaître l'agglutination représente environ  $1/10$  à  $1/30$  du taux de complément d'un sérum humain normal.

L'explication de ces phénomènes est difficile, particulièrement en ce qui concerne le rôle inhibiteur du complément. Rappelons qu'un phénomène analogue bien que d'intensité plus faible a été observé à propos de l'isoagglutination érythrocytaire.

Une hypothèse pourrait être avancée: Lorsque la réaction est faite en sérum frais, on observe des images de lyse, et la disparition après incubation d'environ 50 % des leucocytes de la suspension. On peut donc imaginer une concurrence entre la leucoagglutinine et une éventuelle leucolysine, celle-ci ayant besoin de complément à forte dose pour être active. Lorsque cette dose est atteinte, la leucolysine endommagerait suffisamment les cellules pour les rendre inagglutinables.

Rappelons à ce propos que les anticorps anti-leucocytaires fixent le complément aussi bien *in vitro* comme l'ont montré *Milgrom et Libanski*, que *in vivo* (fig. 2).

Cette courbe montre l'abaissement du taux du complément après transfusion de sang contenant des leucocytes que le sérum du malade agglutinait *in vitro*, inversement, la transfusion de sang dépourvu de leucocytes n'entraîne pas de baisse du complément.

En ce qui concerne l'action du complément comme substance activatrice de la leucoagglutination, celle qui nous semble la plus séduisante actuellement consiste à considérer la leucoagglutination comme un phénomène actif, les cellules opsonisées par le sérum antileucocytaire, s'accolant les unes aux autres, cet accolement constituant le premier acte d'une phagocytose qui n'aura pas lieu en raison des altérations cellulaires provoquées par l'antisérum. Comme pour la phagocytose le complément serait nécessaire à cet accolement.

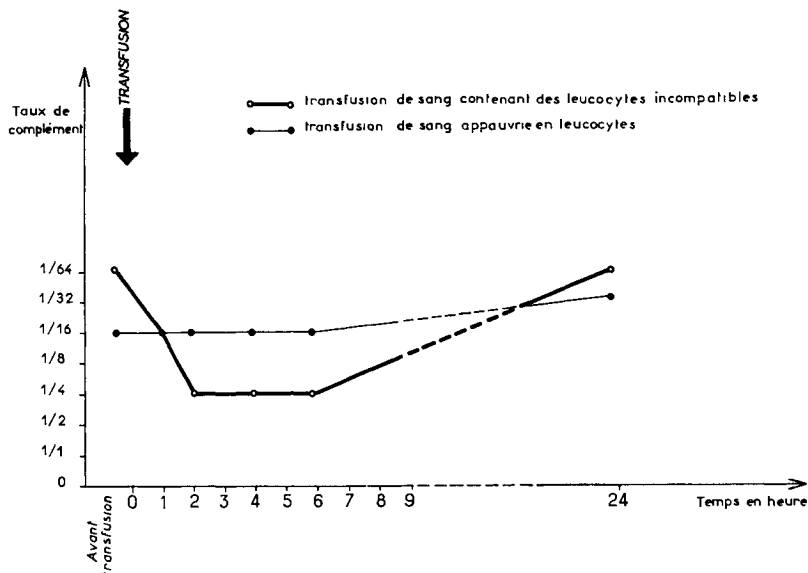


Fig. 2. Chute du complément *in vivo* après transfusion de sang contenant des leucocytes incompatibles.

Toutefois il ne s'agit que d'une hypothèse pour et contre laquelle nous avons résumé ici les arguments qui peuvent être avancés.

Comme la phagocytose, la leucoagglutination ne se produit qu'avec des leucocytes frais, en présence de complément. Les réactions faussement positives soulignent la similitude d'aspect entre la phagocytose bactérienne et la leucoagglutination.

Cependant d'autres faits militent contre cette hypothèse :

- La bactério-phagocytose est inhibée par l'action d'un sérum antileucocytaire.
- Les lymphocytes dépourvus d'activité phagocytaire s'agglutinent comme les polynucléaires.

- Enfin des anticorps actifs à la fois contre les leucocytes et contre les plaquettes, sont capables d'agglutiner celles-ci; l'absence de complément, et sans que bien entendu on puisse invoquer un mécanisme de phagocytose.

*En conclusion :* On peut donc avancer que le complément est nécessaire à la leucoagglutination à une dose optima, au delà de cette dose il inhibe la réaction, en deçà son absence empêche dans certains cas la leucoagglutination. On doit souligner le comportement très spécial de la leucoagglutination à cet égard, aucune autre réaction d'agglutination n'étant complètement empêchée de la sorte par un excès de complément. Des travaux ultérieurs permettront de préciser le mode d'action du complément dans ce cas.

### Summary

1. The qualitative study of the inhibiting substances of the leuco-agglutination shows that it has the characteristics of complement. It is thermolabile, sensitive to storage, specifically

adsorbable on an antigen-antibody complex. Its action is inhibited by anticomplementary substances, such as sodium citrate, EDTA, heparin.

2. The quantitative study shows that the intensity of the leuco-agglutination depends on the amount of complement which is present in the reaction: the excess of complement (more than  $\frac{2}{3}$  of normal) inhibits the leuco-agglutination; the optimum is equal to  $\frac{1}{3}$  of the normal level; in the absence of complement the leuco-agglutination is inhibited in 30 % of the leuco-agglutinins tested.

242

## Iso- and Auto-Immureactions in Systemic Lupus Erythematosus

PETER MIESCHER\*

Basel, Switzerland

Investigations have shown that iso- and auto-immureactions taking place in systemic lupus erythematosus (SLE) are more numerous than in any other disease. Cases with false positive syphilis reactions have long been known. Furthermore, it has been found that patients suffering from this condition are particularly liable to form erythrocytic iso-antibodies, even against substances of weak antigenicity.

The discovery of the L.E.-cell phenomenon by *Hargraves* and co-workers issued in a new epoch in the study of immunological reactions associated with SLE. We would merely recall here that the L.E. factor, responsible for the L.E.-cell phenomenon, was shown to be a gamma-globulin which can be adsorbed specifically on cell nuclei, irrespective of the species or organ from which the cell nuclei originate<sup>5,6</sup>. Cell nuclei can be replaced by nucleoprotein<sup>2,6</sup>. Recently, it was found that desoxyribonucleic acid plays an important part in the antinuclear reactions<sup>2,6,7,9,10,11</sup>. This immunological differentiation of the reactions according to the reactive substances is on the point of yielding further surprising results. We can already say that there are various antinuclear factors, for some of which the specific substrate is nucleoprotein and for others DNA. A short time ago, *Kunkel* and associates at the Rockefeller Institute even succeeded in one case in demonstrating a specific serum reaction with histone<sup>4</sup>. This would mean that the cell nucleus contains at least three specific nuclear antigens or haptens: thus making it possible for antibodies to be formed against nucleoprotein, against the specific nuclear protein histone, and finally against DNA. The L.E.-cell factor is probably a

\* For his valuable help in preparing the English version of this paper, the author wishes to express his sincerest thanks to Mr. *I. C. W. Bigland*, M.A., c/o Ciba Ltd., Basle, Switzerland.