

Institut de Clinique et de Pathologie Médicales A. Université de Liège, Belgique.
(Prof. J. Roskam) et Fonds National de la Recherche Scientifique.

PLAQUETTES ET REACTION ANTIGENE- ANTICORPS IN VITRO

Par

Y. BOUNAMEAUX¹ et J. LECOMTE

La formation du complexe antigène-anticorps au sein du plasma prélevé chez le lapin sensibilisé, et enrichi en thrombocytes, provoque l'agglutination de ces éléments (1, 2, 3). Nous avons étudié ce phénomène et précisé son mécanisme.

TECHNIQUES

Des lapins adultes, d'un poids moyen de 2 kg., ont servi à nos expériences.

A. - *Sensibilisation des lapins*

Trois jours consécutifs, les animaux ont reçu trois semaines avant la saignée, 5 ml. de blanc d'oeuf de poule dans le tissu sous-cutané du cou. Cette technique d'immunisation a provoqué chaque fois l'apparition d'anticorps anti-ovalbumine.

La réaction antigène-anticorps est obtenue en mettant le plasma des animaux sensibilisés au contact d'une solution renfermant le blanc d'oeuf natif dilué extemporanément par NaCl à 0,9 %, à des concentrations variant de 2 à 0,02 %.

B. - *Préparation des plaquettes*

Le sang est prélevé soit à la seringue par ponction intracardiaque, soit par saignée à la carotide à l'aide d'une canule paraffinée et immédiatement citraté à 2 %. Le plasma est débarrassé des hématies et des leucocytes par une première centrifugation à 3.000 t.p.m., durant 5 minutes. Une seconde centrifugation poursuivie durant 20 minutes nous permet d'en isoler les plaquettes. Ces éléments

¹ Chargé de recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique.

sont mis en suspension dans une solution aqueuse de NaCl à 0,9 %, citratée à 2 %, puis lavés avec cette même solution. Ils sont resuspendus ensuite dans NaCl aq. isotonique et soumis à un second lavage, à l'aide de ce liquide (4).

La concentration élevée de citrate (2 %) est nécessaire si l'on veut laisser intacte la morphologie des thrombocytes.

C. — Examens microscopiques

Une goutte des diverses préparations a été déposée sur un porte-objet et recouverte d'une lamelle couvre-objet. Elle a été examinée au microscope de contraste de phase, à des grossissements variant de 960 à 1920 diamètres.

D. — Rétraction du caillot

La rétraction du caillot est mesurée selon la technique de *MacFarlane* (5). Le sang, prélevé dans une seringue paraffinée, est recueilli dans des tubes coniques gradués, à raison de 1,5 ml. par tube. Chacun d'eux contient 0,5 ml. de liquide physiologique (témoin) ou 0,5 ml. de la dilution d'ovalbumine. Ces tubes referment une fine tige de verre recourbée qui plonge dans le sang coagulé. Après une heure de séjour à 37° C., le caillot est retiré à l'aide de la tige et le sérum exsudé est ainsi facilement mesuré.

RESULTS

1. — Plasma provenant d'un animal normal

Le mélange de la solution d'ovalbumine et d'un plasma normal soit citraté à 0,38 ou à 1 %, soit hépariné à raison de 100 à 500 unités/ml., par ailleurs riche en thrombocytes provenant d'un animal normal, n'est suivi d'aucune agglutination plaquettaire, quelle que soit la durée pendant laquelle l'observation se prolonge. Le mélange de l'ovalbumine à un plasma normal citraté à 0,38 %, débarrassé de ses plaquettes et additionné de thrombocytes provenant d'un lapin sensibilisé, ne provoque pas davantage l'agglutination de ces éléments.

2. — Plasma provenant d'un animal sensibilisé

L'addition d'ovalbumine à du plasma citraté à 0,38 % ou hépariné à 100 un./ml. provenant d'un animal sensibilisé provoque l'agglutination des thrombocytes qui y sont suspendus, quelle que soit l'origine de ces derniers: animal normal ou animal sensibilisé.

a) L'examen répété du plasma dans lequel se déroule la réaction antigène-anticorps permet de suivre la formation de ces agglutinats. L'observation du phénomène est facilitée par l'utilisation de faibles concentrations d'ovalbumine, la réaction se déroulant plus lentement.

Le premier phénomène visible à l'examen microscopique est la formation d'un précipité filamenteux, d'apparition d'autant plus précoce et de volume d'autant plus grand que la concentration du blanc d'oeuf est plus élevée. Puisqu'aucun précipité analogue ne s'observe au sein des plasmas normaux additionnés d'ovalbumine, il est légitime de conclure que celui-ci correspond à la formation du complexe antigène-anticorps. La richesse en précipitines spécifiques du plasma de lapin sensibilisé est d'ailleurs bien connue.

L'accroissement progressif de ce réseau protidique au sein du plasma d'animal sensibilisé se double bientôt d'une surcharge en plaquettes qui lui sont intimement accolées. Les agglutinats sont donc toujours mixtes: plaquettes et précipité protéique. Cette agglutination n'implique aucune destruction des thrombocytes dont la morphologie reste parfaitement reconnaissable. Aucune lyse plaquettaire n'a été constatée pendant l'heure que dure notre observation (Tableau 1).

b) Quel est le mécanisme de l'agglutination plaquettaire? La surcharge du précipité en plaquettes est-elle un phénomène

TABLEAU I
Conditions dans lesquelles se forment les agglutinats plaquettaires.

Plasma		Ovalbumine	Plaquettes		Agglutinats
N	S		N	S	
+		+	+		o
+		+		+	o
	+	+	+		oui
	+	+		+	oui
	+		+		o
	+			+	o

N: Provenant d'un animal normal.

S: Provenant d'un animal sensibilisé.

grossièrement mécanique ou correspond-elle à un processus biologique? Autrement dit, les plaquettes sont-elles entraînées dans les mailles du réseau que l'on voit progressivement se condenser en amas distincts ou bien, au contraire, viennent-elles s'y accoler comme elles adhèrent à des levures ou à des bactéries en suspension dans du plasma?

Deux expériences nous permettent de répondre à cette question. 1°) Si l'on ajoute les thrombocytes à un plasma citraté à 0,38 %, alors que la formation du précipité a déjà eu lieu, on les voit s'accoler à ce précipité. Il se forme ainsi des agglutinats mixtes comparables en tout point à ceux que l'on observe lorsque les plaquettes sont présentes avant l'adjonction de l'ovalbumine. Si, au contraire, la concentration en citrate de ce plasma a été portée à 2 %, le précipité préalablement formé ne se chargera d'aucune plaquette.

Ce réseau se comporte donc vis-à-vis des plaquettes comme une surface étrangère. Pour que ces éléments s'y accolent, il est nécessaire que le plasma qui les baigne soit « opsonisant » au sens que donne *Roskam* (1) à ce terme. Autrement dit, ce plasma doit être capable de modifier d'une certaine façon la surface préalablement à l'accolement plaquettaire. En effet, à la concentration de 2 %, le citrate de soude inhibe toute activité opsonisante du plasma chez le lapin (1).

2°) Mais quand la formation d'agglutinats est contemporaine de l'union anticorps-antigène, elle devient un phénomène à la fois mécanique et biologique, l'entraînement passif des plaquettes par le réseau en formation semblant toutefois représenter alors le facteur essentiel. Comparons en effet l'évolution des phénomènes dans un même plasma riche en thrombocytes, mais citraté tantôt à 0,38 % et tantôt à 2 %; nous verrons se constituer des agglutinats légèrement moins importants dans le second cas, mais simplement parce que la vitesse de formation du précipité est moindre. Le précipité se charge alors de thrombocytes, bien que, comme nous venons de le montrer, le plasma ne soit pas opsonisant.

c) Le chauffage à 56° C. du plasma prélevé chez un animal sensibilisé provoque l'apparition d'un précipité qui est éli-

miné par centrifugation. Si le liquide surnageant est additionné de l'antigène et d'une suspension de thrombocytes, le complexe antigène-anticorps apparaît et se garnit de plaquettes. Le complément, détruit par le chauffage, ne joue donc aucun rôle dans la constitution des amas.

d) Le plasma de lapin sensibilisé, hépariné à raison de 100 à 500 unités/ml., se comporte comme le plasma faiblement citraté: formation d'un précipité spécifique chargé de plaquettes.

e) La germanine (Bayer 205, Moranyl, Suramine), à la concentration de 2 mg/ml., accroît la vitesse de formation du précipité et en augmente la masse. L'agglutination plaquettaire y est plus importante.

f) Le salicylate de soude à la concentration de 0,2 %, tout comme le citrate de soude à 2 %, diminue la vitesse de formation du précipité. L'importance du réseau protéique est moindre et, de la sorte, les agglutinats plaquettaires moins marqués.

3. — *Plaquettes en solution physiologique*

Les plaquettes provenant d'un lapin sensibilisé, centrifugées et lavées à deux reprises, puis remises en suspension dans du liquide physiologique additionné d'ovalbumine, ne montrent aucune tendance à l'agglutination réciproque lorsqu'elles sont observées pendant 60 minutes.

Après 4 heures, une seule des suspensions plaquettaires contenant 500.000 plaquettes par mm^3 et isolées d'un plasma particulièrement riche en anticorps, a formé des agglutinats très nets, groupés également autour d'un précipité figuré analogue à celui observé en milieu plasmatique. Il faut donc admettre que les anticorps ont diffusé à partir des plaquettes, ou plutôt, à partir de ce que *Roskam* a appelé l'« atmosphère plasmatique » des plaquettes. Notre observation apporte donc un argument supplémentaire à la conception de *Roskam* (1).

4. — *Rétraction du caillot*

L'addition de 0,5 ml. d'ovalbumine diluée au quart, à 1,5

Origine du sang	Sérum exudé en % du volume du sang coagulé	
	+ NaCl à 1 ⁰ / ₁₀	+ Ovalbumine
Animal normal	51,0	51,0
Animal sensibilisé	60,0	0
2	53,0	35,0
3	52,0	26,5

ml. de sang d'un animal normal, ne modifie pas l'intensité de la rétraction du caillot. La même quantité de sérum est exsudée que dans les tubes témoins, où 0,5 ml. de NaCl aq. isotonique ont été ajoutés au même volume de sang.

Si le sang provient d'un animal sensibilisé, la présence de l'ovalbumine inhibe, et parfois supprime complètement, la rétraction du caillot (Tableau II).

DISCUSSION

1. — L'agglutination des plaquettes qui s'observe dans le plasma des lapins sensibilisés après addition de l'antigène, ne dépend pas des thrombocytes, mais bien en ordre principal d'un facteur présent dans le seul plasma. C'est l'anticorps susceptible de réagir avec l'antigène ajouté. Le complément ne joue aucun rôle en l'occurrence, puisque le plasma chauffé se comporte comme le plasma normal.

La réunion de l'antigène à l'anticorps provoque l'insolubilisation de ces molécules protéiques et un précipité bien visible apparaît. L'accolement des plaquettes à ce dernier répond à un mécanisme double: certains thrombocytes sont mécaniquement entraînés dans la masse du précipité; les autres s'y accolent progressivement pourvu que le plasma soit « opsonisant » au sens de *Roskam* (1).

Le salicylate de soude, qui freine l'apparition du précipité antigène-anticorps (6), limite l'accolement plaquettaire. La germanine, qui l'accélère, provoque la formation d'amas thrombocytaires plus volumineux.

L'addition de sédormid au sang des patients affectés de purpura thrombopénique par sensibilisation à cette substance provoque également l'agglutination, puis la lyse des thrombocytes de ces malades. La formation préalable d'un complexe entre les plaquettes et le sédormid est obligatoire pour que s'observe en présence des anticorps spécifiques, la formation d'amas thrombocytaires. Les plaquettes sont, dans ce cas particulier, le substrat protéique auquel s'unit le radical hapténique sédormid pour constituer l'antigène réactionnel (7).

Pareille participation directe et nécessaire des plaquettes à la constitution de l'antigène n'est pas obligatoire pour que s'observe leur agglutination. Celle-ci est en effet, dans nos expériences, indépendante de la constitution intime des agents protéiques intéressés dans la formation du complexe antigène-anticorps.

2. — Nos travaux antérieurs (8) nous ont permis d'établir qu'il n'existe aucune relation entre la libération de l'histamine constitutive des plaquettes et l'agglutination réciproque de ces éléments. Si la réaction antigène-anticorps s'accompagne également chez le lapin d'une libération de l'histamine plaquettaire (3, 9, 10), la cause de ce phénomène ne doit pas être davantage cherchée dans l'agglutination des thrombocytes. En effet, cette libération est inhibée par le chauffage du plasma à 56° C., sans que soit alors réduite la formation des amas plaquettaires. Après réaction antigène-anticorps, nous observons d'ailleurs un accolement des thrombocytes à un précipité protéique plutôt qu'une agglutination réciproque de ces éléments.

3. — Les expériences d'*Ackroyd* ont montré que la rétraction du caillot est inhibée lorsque l'on ajoute du sédormid au sang du sujet sensibilisé à ce médicament. Cette inhibition est due à une destruction des plaquettes. Celle-ci ne s'observe pas dès qu'un anticoagulant est ajouté au milieu (7). Nos expériences ne nous permettent pas d'affirmer que dans le sang complet, dans les conditions où nous recherchons la rétraction du caillot, il n'y a pas de destruction plaquettaire lors de la réaction antigène-anticorps. Une autre hypothèse peut toutefois être soulevée pour expliquer la diminution de rétraction du caillot: la

fixation des plaquettes sur le précipité résultant de la réaction antigène-anticorps les rendrait inaptes à se fixer sur la fibrine et à entraîner la rétraction du caillot.

4. — La thrombopénie qui accompagne le choc anaphylactique du lapin ne dépend pas d'une destruction des plaquettes, mais de leur agglutination, puis de l'arrêt dans les différents territoires capillaires des amas ainsi formés (1).

Comment s'effectue l'agglutination plaquettaire après injection intraveineuse de l'antigène chez l'animal sensibilisé?

Elle peut soit dépendre d'un accolement de ces éléments aux parois vasculaires jouant le rôle d'organe de choc (11), soit être secondaire à la formation *in vivo* du précipité spécifique. Aucun fait n'établit la réalité de ce dernier mécanisme. Tout au plus peut-on légitimement en supposer l'existence chez le lapin, animal producteur de précipitines à des taux plasmatiques élevés.

RESUME

1. — Chez le lapin, la réaction antigène-anticorps qui se déroule au sein du plasma entraîne la formation d'agglutinats mixtes composés d'un précipité protéique et de plaquettes.

2. — La constitution de ces agglutinats mixtes dépend essentiellement d'un entraînement passif des plaquettes par le précipité en formation; pour autant que le plasma soit « opsonisant », les plaquettes s'y accolent secondairement.

3. — La présence de ces agglutinats entraîne une diminution de la rétraction du caillot.

BIBLIOGRAPHIE

1. Roskam, J.: Physiologie normale et pathologique du globulin, in 8°, Presses Universitaires de France, Paris, 1922.
2. Stetson, C.: J. exp. Med., 93, 489, 1951.
3. Humphrey J. & Jaques R.: J. of Physiol., 128, 9, 1955.
4. Roskam, J.: Arch. internat. Physiol. 20, 241, 1923.
5. MacFarlane, R.: Lancet, 199, 1, 1939.

6. *Coburn, A. & Kapp, E.*: J. exp. Med., 77, 173, 1943.
7. *Ackroyd, J.*: Clin. Sc., 8, 269, 1949 et 10, 185, 1951.
8. *Lecomte, J. & Bounameaux, Y.*: Acta Allergol., 8, 189, 1955.
9. *Katz, G.*: Science 91, 221, 1940.
10. *Dragstedt, C., de Arellano, M. & Lawton, A.*: Science, 91, 617, 1940.
11. *Lecomte, J. & Hugues, J.*: Intern. Arch. Allergy Appl. Immun., 1955, sous presse.

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.