

ZV000 1158.

OK

**Les Rosettes E, chez le mouton marqué par probable
du lymphocyte T**

par J. SARR*, H. SALMON**, et Ch. LEBLAN**

Les Rosettes E, chez le mouton marqueur probable du lymphocyte T

par J. SARR*, H. SALMON**, et Ch. LE JAN**

RÉSUMÉ

Le test de rosettes E est utilisé chez le mouton comme un marqueur des lymphocytes T. Les lymphocytes du sang périphérique, du thymus, de la rate et des ganglions mésentériques sont comparés quant à leur aptitude à former des rosettes avec les globules rouges de différentes espèces animales (mouton, porc, chèvre, veau). Pour obtenir de bons résultats, il est important que les lymphocytes et les globules rouges du mouton soient préparés en environnement protéique, susceptible de préserver les propriétés des membranes des cellules : la présence de sérum est une condition essentielle à l'obtention d'un taux élevé de rosettes E.

L'action inhibitrice d'un sérum de lapin antithymocytes de mouton est également étudiée.

SUMMARY

E Rosette test is used in sheep as a T lymphocyte marker. Peripheral blood, thymic, spleen and mesenteric lymphnode lymphocytes are compared on their capacity to form E rosettes with the red blood cells of different species of animal.~ (sheep, pig, goat and calf). To obtain good results, it is important that lymphocytes and red blood cells might be prepared in proteic environment: the presence of calf serum in the test is an essential condition for having high levels of E rosettes.

The inhibitory activity, on rosette formation, of a rabbit antiserum prepared against sheep thymic cells is also studied.

ABREVIATIONS

s v	: Sérum de veau inactivé à 56°/30 mn.
SVF	: Sérum de veau fœtal inactivé à 56° / 30 mn.
EL	: Earle Hydrolysate de lactalbumine.
Rosette E	: Rosette érythrocyte - lymphocyte.
Rosette EA	: Rosette érythrocyte - anticorps - lymphocyte.
Rosette ZC	: Rosette zymosan - complément - lymphocyte

* Laboratoire National de l'Élevage (I.S.R.A.), BP 2057, Dakar (Sénégal).

** I.N.R.A., Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie - 78850 Thiver-

INTRODUCTION

Les sous-populations lymphocytaires du mouton sont mal connues [4, 5, 8]. Pour identifier les diverses catégories de cellules participant aux mécanismes immunitaires des ovins nous avons cherché à caractériser les lymphocytes T. Chez l'homme [2, 10], le bovin [6, 9] et le porc [7, 14], les lymphocytes T fixent les hématies de mouton en formant des rosettes. Nous avons donc mis en œuvre diverses techniques pour identifier chez le mouton les lymphocytes porteurs de ce marqueur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. LES ANIMAUX

Quatre moutons adultes, de formule leucocytaire normale, ont servi comme donneurs de lymphocytes.

Le mouton, le veau, la chèvre et le porc donneurs d'hématies sont des animaux sains élevés au laboratoire.

2. LE SÉRUM DE VEAU

Le sérum de veau est recueilli aux abattoirs sur des animaux de 5 mois (200 kg) ; inactivé 30 mn à 56° C, il est absorbé sur globules rouges de mouton (deux volumes de sérum pour un volume de culot globulaire) 1 h à + 37° C, une nuit à + 4° C. Le surnageant recueilli par centrifugation est alors filtré sur millipore (0,45 μ).

3. HÉMATIES POUR ROSETTES E

Les sangs héparinés (Liquémine Roche à 1 p. 100, de mouton, de chèvre, de porc et de veau sont lavés trois fois en milieu de Earle-Lactalbumine (EL) par centrifugation à 200 g, puis les hématies sont ajustées à 1 p. 100 en milieu EL contenant 10 p. 100 de sérum de veau (EL, SV 10) et conservées à 4 °C. On peut ainsi les utiliser pendant une semaine.

4. HÉMATIES POUR ROSETTES EA

Des globules rouges de veau sont sensibilisés pendant une heure au bain-marie à 37° C avec un sérum de porc antiglobules rouges de veau (EA). Ils sont ensuite lavés trois fois en milieu EL et repris en suspension à 1 p. 100 dans ce milieu. Conservés à + 4° C, on peut

5. LE ZYMOBAN POUR ROSETTES ZC

Le zymosan est un résidu insoluble préparé à partir de cellules de levure. Les grains de zymosan porteurs de la fraction C₃b du complément sont préparés selon une technique déjà décrite chez le porc [16].

6. GRADIENT DE DENSITÉ

Nous employons une solution d'un polymère de sucrose de poids moléculaire 400 000 (Ficoll 400) à 9 p. 100 en eau distillée ajustée par addition d'un opacifiant utilisé en radiologie, le Telebrix, à une densité $d = 1,060$.

7. PRÉPARATION DES LYMPHOCYTES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE

Le sang hépariné est dilué au 1/3 en milieu EL et déposé sur le gradient dans le rapport : deux volumes de sang dilué pour un volume de gradient de ficoll [6]. Après centrifugation pendant 30 mn à 200 g, 4° C, l'interface est prélevé et les hématies résiduelles lysées par une solution de chlorure d'ammonium [14]. Puis les lymphocytes sont lavés trois fois en milieu EL par centrifugation à 200 g, 10 mn et ajustés à $2.5 \cdot 10^6$ cellules par millilitre en milieu EL SV 10 et conservés dans un bain de glace fondante. Les rendements en lymphocytes sont de 40 à 60 p. 100 avec une vitalité testée par la capacité des cellules à absorber le trypan bleu, de 90 à 98 p. 100. La contamination par polynucléaires et monocytes après coloration par le May Grunwald Giemsa et la peroxydase [16] est de 4 à 8 p. 100.

8. PRÉPARATION DES LYMPHOCYTES DU THYMUS, DES GANGLIONS ET DE LA RATE

Chaque organe est lavé plusieurs fois en milieu EL, découpé en fragments, et mis en suspension dans ce milieu sous agitation lente pendant 5 mn à la température du laboratoire puis filtré sur gaze. Le filtrat est alors purifié sur gradient de ficoll comme le sang.

9. SÉPARATION DES LYMPHOCYTES SUR BOURRE DE NYLON

A. *Élimination des macrophages par le fer carbonyl*

A neuf volumes de sang hépariné, on ajoute un volume d'une solution de fer carbonyl-gomme arabe [1] ; l'ensemble est incubé 1 h à 37° C, en agitation lente avant la séparation sur gradient de ficoll.

B. *Préparation de la colonne [11]*

Les fibres de polyamide après cardage sont lavées plusieurs fois

C. Séparation des lymphocytes

La suspension cellulaire est incubée dans la colonne 1 h à 37° C puis la bourre de nylon est lavée (3 à 5 ml/mn) pour recueillir toutes les cellules non adhérentes qui sont alors ajustées à 2.5 10⁶ cellules par ml en milieu EL SV 10.

La bourre de nylon est reprise en milieu EL, triturée pour éluer les cellules adhérentes qui sont remises en suspension à 2.15 10⁶ cellules par ml en milieu EL SV 10.

La vitalité des cellules n'est pas affectée par ce traitement ; le rendement moyen en cellules est de 45 à 65 p. 100 par rapport à la suspension de départ.

10. TEST DE ROSETTE E STANDARD

50 µl de suspension leucocytaire repris en EL SV 10 sont ajoutés à 50 µl de suspension de globules rouges de mouton ; le mélange est placé 15 mn au bain-marie à 37° C centrifugé 5 mn à 200 g et laissé une nuit à + 4° C.

Les culots sont remis en suspension et après coloration au bleu de méthylène [16] on compte sur un total de 400 leucocytes le nombre de cellules formant rosettes.

RESULTATS

1. INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA FORMATION DE ROSETTE E

a) *Espèce fournissant les globules rouges*

Les hématies de différentes espèces animales ont été éprouvées avec les leucocytes sanguins de quatre moutons.

Les pourcentages de rosettes obtenus sont regroupés dans le tableau I et montrent que les hématies de mouton donnent un pourcentage de rosettes bien plus élevé que les hématies de porc, de veau ou de chèvre.

Lorsque les hématies et les lymphocytes proviennent du même mouton, le pourcentage de rosettes est le même.

Les mêmes suspensions leucocytaires sont chauffées à 56° C pendant 30 mn. Avec une vitalité inférieure ou égale à 1 p. 100, 2 à 5 p. 100 des cellules forment encore des rosettes montrant que la vitalité est une condition nécessaire à la formation des rosettes.

b) *Rôle du sérum de veau*

Les résultats du tableau II montrent le faible pourcentage de rosettes en l'absence de sérum de veau ; le nombre de cellules for-

TABLEAU I

Influence de l'origine des globules rouges sur le nombre de rosettes E pour 100 leucocytes sanguins

Leucocytes \ Origine des moutons \ g	Mouton	Porc	Chèvre	Veau
01	36	16	9	1
02	28	19	10	0
03	34	18	7	2
04	32	17	8	1
Moyennes	32,5	17,5	8,5	1

TABLEAU II

Influence du sérum de veau sur le nombre de rosettes E pour 100 leucocytes sanguins

Concentration de sérum de veau	0 p. 100	10 p. 100	20 p. 100	50 p. 100	10 p. 100*
Mouton n° 1	3	32	nt	nt	17
Mouton n° 2	4	29	27	24	22
Mouton n° 3	6	34	35	30	25
Moyennes	4,5±1,5	31±3	31±4	27,33	21,5±4,5

* Sérum foetal de veau.

mant rosette est maximum avec 10 p. 100 de sérum de veau ; le sérum de veau foetal à cette même concentration apparaît un peu moins efficace que le sérum de veau de 4 mois. Pour s'assurer qu'il n'existe pas dans le sérum de veau un anticorps naturel dirigé contre

EL SV 10 est incubée pendant 30 mn à 37° C en présence de différentes doses de complément [17] : en présence d'un anticorps anti-lymphocyte de mouton, le complément devrait provoquer la lyse des lymphocytes ; or la vitalité des cellules varie de 88 à 92 p. 100 pour les lymphocytes en milieu EL SV 10 et de 90 à 94 p. 100 dans le milieu sans sérum (EL).

c) Le Dextran

Nous avons également cherché à améliorer le pourcentage de cellules formant **rosette** par addition dans le milieu d'un **poly-saccharide** de poids moléculaire 70 000, le Dextran T 70, comme cela avait été obtenu dans d'autres espèces [17].

Le tableau III montre qu'avec 10 p. 100 de Dextran dans la suspension de globules rouges nous avons obtenu une **augmentation** du nombre des lymphocytes formant **rosette** E qui varie avec le tissu d'origine des lymphocytes : les lymphocytes du thymus ou des ganglions mésentériques forment beaucoup plus de rosettes lorsque l'on travaille en présence de Dextran tandis que les lymphocytes sanguin paraissent peu sensibles à cet agent.

TABLEAU III

Influence du dextran sur le nombre de rosettes E pour 100 leucocytes, dans le thymus, le ganglion et le sang

Source de lymphocyte	Thymus	Ganglion mésentérique	Rate	Sang*
Rosettes E	65	62	50	34.5 (32-37)
Rosettes ED	80	71	54	40.5 (39-42)

* Il s'agit d'une moyenne sur 4 individus ; valeurs extrêmes entre parenthèses.

Avec 2 et 5 p. 100 de Dextran l'augmentation du nombre de cellules formant rosette E n'est pas significative.

2. DISTRIBUTION DES ROSETTES E DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES LYMPHOÏDES

Le tableau IV présente les résultats obtenus avec les lymphocytes A... thymus de la rate et des ganglions mésentériques. L'augmentation de

TABLEAU IV

Influence de l'origine des cellules sur le nombre de rosettes E pour 100 lymphocytes dans le thymus, la rate, le ganglion mésentérique et le sang

Lymphocytes	Rate	G M	TH	Sang	
				n° 1	n° 2
p. 100	66	60	52	34	33

de lymphocytes formant rosette E est plus élevé dans le thymus que dans les ganglions, la rate et le sang. Néanmoins le thymus ne fournit pas 100 p. 100 de cellules formant rosette E.

3. LES LYMPHOCYTES FORMANT ROSETTE E SONT DISTINCTS DE CEUX FORMANT ROSETTE EA OU ZC

Après séparation de suspensions lymphocytaires sur bourre de nylon, nous avons comparé les cellules adhérentes et non adhérentes à la fibre, ainsi que le montre le tableau V.

TABLEAU V

Influence de la filtration sur bourre de nylon sur le nombre de rosettes E, EA et ZC pour 100 lymphocytes sanguins

Lymphocytes sanguins	Fraction	E	EA	ZC
Mouton n° 1	T	39	10	12
	F ₁	65	2	0
	F ₂	12	6	7
Mouton n° 2	T	42	12	14
	F ₁	59	1	1
	F ₂	7	5	9

T : Témoins lymphocytes avant passage sur bourre de nylon.

F₁ : Cellules non adhérentes.

F₂ : Cellules adhérentes.

Le passage sur bourre de nylon enrichit nettement les suspensions en cellules formant rosette E et élimine les cellules capables de former les rosettes EA et ZC. Au contraire les cellules retenues sur la bourre de nylon puis **éluées** forment des rosettes EA et ZC et **peu** de rosettes E. Les cellules de thymus de mouton ne forment pratiquement pas de rosettes EA [9] et ZC [13, 17] qui sont des marqueurs des cellules B dans les autres espèces.

4. INHIBITION DE LA FORMATION DES ROSETTES E PAR UN SÉRUM ANTITHYMUS DE MOUTON

Un sérum de lapin antithymus de mouton en cours de préparation est utilisé aux dilutions **1/5, 1/10, 1/20** et son action **inhibitrice** est comparée à celle d'un sérum normal de lapin et à celle d'un sérum de lapin anti-immunoglobulines de mouton.

Le sérum antithymique" inhibe complètement la formation de rosettes tandis que le sérum normal et le sérum **anti-immunoglobulines** ne sont pas inhibiteurs.

DISCUSSION

30 à 40 p. 100 des lymphocytes sanguins de mouton forment des rosettes E avec les globules rouges de mouton ; dans le thymus ce pourcentage s'élève à **65-70** p. 100.

Il est important pendant la préparation des suspensions cellulaires d'opérer en environnement protéique pour préserver les propriétés de membrane des globules rouges et des lymphocytes ; en effet, si on lave les lymphocytes en tampon salin (PBS) et non en milieu de Earle Lactalbumine (EL) on n'observe pas de formation de rosettes.

La présence de sérum de veau ou de mouton dans les suspensions de lymphocytes et de globules rouges est essentielle pour la **formation** des rosettes. Lorsqu'on ajoute 10 p. 100 de Dextran dans la suspension de globules rouges, nous augmentons de 5 p. 100 le nombre de rosettes E formé par les lymphocytes du sang et de la rate ; **cette** augmentation est plus marquée pour les lymphocytes du thymus et des ganglions méésentériques. Il est possible que d'autres traitements [3, 15] utilisés dans d'autres espèces pour augmenter le nombre dz rosettes E, soient aussi efficaces chez le mouton.

Les lymphocytes responsables de la formation des **rosettes E** chez le mouton sont vraisemblablement des lymphocytes **T** parce que :

— le thymus est plus riche en lymphocytes formant rosette E que tous les autres organes lymphoïdes ;

— les lymphocytes qui adhèrent à la boure ; nylon forment peu de rosette E tandis que 60 p. 100 de ceux qui se fixent pas en forment ;

— ces rosettes E ne sont pas inhibées par un sérum de lapin anti-immunoglobulines de mouton ;

— ces rosettes E sont inhibées par un sérum antithymus de mouton.

Les rosettes E observées chez le mouton sont en même temps des autorosettes puisque les globules rouges du donneur de lymphocytes conviennent aussi bien que les globules rouges d'un autre individu. La formation des autorosettes chez le mouton, très fortement dépendante de la présence de sérum de veau ou de mouton, diffère de celle observée chez la souris [12] puisque chez cet animal le sérum homologue est inhibiteur.

Le phénomène des autorosettes spécifiques du lymphocyte T du mouton peut s'expliquer par la présence de récepteurs à la surface des lymphocytes ou des hématies. Ce récepteur n'est pas un auto anticorps fixé à la surface du lymphocyte puisqu'un sérum anti-immunoglobulines de mouton n'est pas inhibiteur. Nous n'avons pas mis en évidence d'anticorps antimouton dans ce sérum de veau, il ne s'agit donc pas d'un anticorps qui lierait directement ou indirectement les lymphocytes aux globules rouges.

Par ailleurs tous les lymphocytes T ne forment pas de rosettes E avec les globules rouges de mouton dans les conditions où nous avons travaillé puisque même à partir du thymus on n'obtient jamais 100 p. 100 de cellules formant rosette E. Avec la préparation sur gradient de ficoll on ne saurait exclure la perte de sous-populations lymphocytaires compte tenu du rendement obtenu (50 p. 100).

Nous pensons utiliser ce marqueur des lymphocytes T dans l'étude des mécanismes immunitaires lors d'invasions parasitaires, microbiennes et virales dans l'espèce ovine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABO (T.), YAMAGUCHI (T.), SHIMIZU (F.) and KUMAGAI (K.). — Studies of surface immunoglobulins on B lymphocytes. *J. Immunol.*, 1976, 117, 1781-1787.
- [2] BACH (J. F.). — Evaluation of T cells and thymic serum factors in man using the rosette technique. *Transpl. review*, 1973, 10, 196-217.
- [3] BENTWICH (Z.), DOUGLAS (S.D.), SKUTELSKY (E.) and KUNKEL (H. G.). — Sheep red blood cell binding to human lymphocytes treated with neuraminidase enhancement of T cell binding and identification of a subpopulation of B cells. *J. clin. Med.*, 1973, 137, 1532-1537.

- [4] BRAGANZA (C. M.), STATHOPOULOS (C.), DAVIES (A. J. S.), ELLIOTT (E. V.), KERBELL (R. S.), PAPAMICHAIL (M.) and HOLBOROW (E. J.). — Lymphocyte erythrocyte rosettes as indicator of the heterogeneity of lymphocytes in a variety of mammalian species. *Cell*, 1975, 4, 103-106.
- [5] BURRELLS (C.) and WELLS (P. W.). — In vitro stimulation of ovine lymphocytes by various mitogens. *Res. Vet. Sci.*, 1977, 23, 84-86.
- [6] CARSON (C.A.), SELLS (D. M.) and RISTIK (H.). — A method for separation of bovine blood leukocytes for in vitro studies. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, 36, 1091-1094.
- [7] ESCAJADILLO (C.) and BINNS (R. M.). — Rosette formation with sheep erythrocytes. A possible T cell marker in the pig. *Int. Arch. Allergy*, 1975, 48, 261-275.
- [8] EY (P.L.). — Immunoglobulins on the surface of sheep lymphocytes. *Eur. J. immunol.*, 1973, 3, 402-409.
- [9] GREWAL (A.S.), ROUSE (B. T.) and BABIUK (L. A.). — Characterization of surface receptors on bovine leukocytes. *Int. Arch. of Appl. immun.*, 1978, 56, 289-300.
- [10] JONDAL (M.), HOLM (G.) and WIGZELL (H.). — Surface markers on human T and B lymphocytes. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood lymphocytes. *J. exp. Med.*, 1972, 136, 207-215.
- [11] JULIUS (M. H.), SIMPSON (E.) and HERZENBERG (L. A.). — A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. immunol.*, 1973, 3, 645-649.
- [12] KOLB (H.). — A receptor for self on lymphocytes. *Immunology*, 1977, 33, 859-862.
- [13] MENDES (M. F.), MIKI (S. S.) and PEIXINHO. — Combined detection of human T and B lymphocytes by rosette formation with sheep erythrocytes and zimosan C₃ complexes. *J. of imm.*, 1974, 113, 531-536.
- [14] PARK (S.) and BARKLEY (D. M.). — Isolation and fractionation of porcine peripheral lymphocytes. *B.B.A.*, 1976, 303, 527-533.
- [15] PELLEGRINO (M. A.), FEKRONE (S.), DIERICH (M. F.) and REISFELD (R. A.). — Enhancement of sheep red blood cell human lymphocyte rosette formation by the sulfhydryl compound 2 Ammo Ethyl isothio uronium bromide. *Clin. Immunol. and Immunopath.*, 1975, 3, 324-333.
- [16] SALMON (H.), GORET (P.) et RIVIÈRE (Y.). — Caractérisation et particularités des lymphocytes T du porc. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, Sér. D., 1973, 277, 471-474.
- [17] SALMON (H.). — Specificity of Pig T lymphocyte antiserum. *Ann. Imm. Inst. Past.*, 1978, 129 C, 571-584.

*
**

MM. GORET, GRIMPRET, GUILLOT et PILET interviennent.

L'insertion est acceptée à l'unanimité.