

Recherches immunologiques sur la péripneumonie

VIII. — Présence possible d'un antigène à activité sérologique Forssman chez *Mycoplasma mycoïdes*

par A. PROVOST, P. PERREAU et R. QUEVAL

Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux
(Laboratoires de Fort-Lamy-Farcha et Alfort)

RÉSUMÉ

Les auteurs montrent clairement qu'une activité sérologique de type Forssman peut être ajoutée ou coexistante à une activité sérologique anti-*Mycoplasma mycoïdes*.

Par ailleurs l'hyperimmunisation de lapins selon la méthode de Forssman provoque l'apparition d'anticorps fixant le complément en présence de l'antigène péripneumonique. La nature de cet antigène est discutée.

Le galactane n'aurait par lui-même qu'une très faible activité Forssman, mais celle-ci pourrait devenir complète par couplage avec un autre antigène.

Il semble qu'il n'y ait aucune relation entre cette activité Forssman et les anticorps anti-*Mycoplasma mycoïdes* que l'on trouve normalement à faible titre dans les sérums de bovins vivant en région indemne (France, Afrique).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences que nous rapportons ci-dessous ont été motivées par une observation fortuite : un sérum hémolytique de lapin anti-hématies de chèvre déviait le complément de cobaye en présence d'un antigène péripneumonique et d'un complexe hémolytique : hématies de mouton — sérum hémolytique de lapin anti-mouton. Ce fait troublant, vérifié à plusieurs reprises, demandait que l'on élucidât la nature du complexe antigène-anticorps mis en jeu.

1. — La réaction de déviation du complément classique selon KOLMER (4) a été utilisée pour l'étude des sérums de lapins et d'ânes ; elle met en œuvre des quantités des différents réactifs (antigène, complément, sérum hémolytique...) titrés à 2 unités. La fixation du complément se fait pendant 18 heures à 4°C et la lecture s'apprécie sur une gamme d'hémolyse. On emploie normalement le couple hémolytique hématies de mouton — sérum de lapin hémolytique anti-

mouton, sauf dans les cas où le sérum à éprouver est un sérum hémolytique de lapin anti-mouton ; dans ces cas, on emploie un couple hémolytique hématies de chèvre — hémolysine de lapin anti-chèvre.

La déviation du complément appliquée à l'étude des sérums de bovins a été conduite selon une méthode adaptée de celle de KOLMER, consistant à diluer le complément dans une dilution de sérum de bovin frais et négatif vis-à-vis de la péripneumonie (7).

La réaction d'inhibition de la déviation du complément que nous avons employée pour éprouver l'activité sérologique du galactane consiste à inhiber, par ce composé ou ses dilutions, la capacité du couplage de certains sérums avec des antigènes péripneumoniques ou Forssman.

2. — La réaction d'hémolyse pour la recherche des anticorps anti-Forssman dans les sérums consiste à mettre en présence 0,2 ml de sérum ou de ses dilutions, 0,4 ml. de complément au 1/100 et 0,1 ml d'une suspension d'hématies de mouton à 1 pour 100. La lecture se fait après 1 heure d'incubation au bain-marie à 37° et apprécie le degré d'hémolyse sur une échelle de 0 à 4 +.

Dans la réaction d'inhibition, on introduit 0,1 ml. de dilutions de galactane dans la réaction (tableau n° 5).

3. — La réaction d'agglutination des particules de latex ayant absorbé le galactane est celle que l'un de nous a décrite (5).

4. — Complément de cobaye lyophilisé (*), titré à 2 unités hémolytiques par 0,4 ml en présence des antigènes respectifs.

5. — Diluants : tampon Véronal-Véronal sodique pour la déviation du complément et l'inhibition de la déviation ; sérum physiologique pour le reste.

6. — Antigène péripneumonique : notre antigène, préparé à partir d'une souche de *Mycoplasma mycoides*, remplit les normes données par CAMPBELL et TURNER (2). La dilution utilisée (2 unités antigéniques) est de 1/100.

7. — Antigène Forssman : broyat de rein de cobaye dilué à parties égales en sérum physiolo-

gique et placé 10 minutes au bain-marie bouillant. Le surnageant de la centrifugation constitue l'antigène utilisé en déviation du complément ; la dilution au 1/20 contient 2 unités antigéniques par 0,1 ml., titrées par rapport à un sérum anti-hématies de mouton. Il est désigné en abréviation dans le texte par : antigène F.

Dans d'autres expériences, on a utilisé des phosphatides de rein de cheval préparés par le Dr EYQUEM, de l'Institut Pasteur de Paris.

8. — Galactane de *M. mycoides* : nous avons utilisé, soit la préparation originale des auteurs australiens (PLACKETT et BUTTERY (6)), soit un extrait préparé par nous-mêmes selon leur technique (8).

9. — Hématies : globules rouges de mouton et de chèvre recueillis et conservés en solution d'Alsever. Dans les réactions, on utilise la suspension à 2 pour 100 ; dans quelques-unes, indiquées dans le texte, une suspension de 1 pour 100 est utilisée.

10. — Sérums hémolytiques :

— sérum hémolytique de lapin anti-hématies de mouton (*) ;

— sérum hémolytique de lapin anti-hématies de chèvre, préparé sur lapins recevant 6 injections intraveineuses hebdomadaires d'une suspension à 10 pour 100 d'hématies de chèvre lavées ; saignée 7 jours après la dernière injection ;

— sérum anti-Forssman pur, préparé à partir de stromas bouillis d'hématies de moutons, selon la technique de KABAT et MAYER (3).

11. — Sérum antipéripneumonique : Il s'agit soit de sérums de bœufs auxquels la maladie a été conférée par intubation endobronchique de lymphes péripneumoniques naturelles ; soit de sérums d'ânes hyperimmunisés avec des corps microbiens lavés de *M. mycoides*, obtenus par culture en bouillon-tryptose additionné de 10 pour 100 de sérum de l'âne devant recevoir la culture ; soit de sérums de lapins hyperimmunisés selon le même processus.

Sérums hémolytiques et sérums antipéripneumoniques sont à la demande absorbés pendant

(*) BIOLYON, rue de la Barre, LYON (Rhône).

(*) BIOLYON, rue de la Barre, LYON (Rhône).

3 heures à 37°C par un broyat au $\frac{1}{2}$ du rein de cobaye bouilli (1 partie de sérum à absorber pour 4 de broyat), ou par le culot de centrifugation de l'antigène péripneumonique ; ils sont clarifiés par centrifugation.

* * *

RÉSULTATS

Les tableaux 1 et 2 rendent compte des premières expériences. Celles-ci indiquent nettement qu'une activité sérologique Forssman est superposable ou coexistante à une activité sérologique anti-péripneumonique dans les sérums essayés.

TABLEAU N° I

Déviation du complément effectuées avec différents sérums, purs ou absorbés, en présence d'antigène péripneumonique et d'antigène Forssman.

Sérums Antigènes	sérum - hémolytique anti-chèvre			sérum - hémolytique anti-mouton			sérum bovin péripneumonie			sérum âne anti-M. mycoïdes		
	Pur	absorbé M. mycoïdes	absorbé rein cobaye	Pur	absorbé M. mycoïdes	absorbé rein cobaye	Pur	absorbé M. mycoïdes	absorbé rein cobaye	Pur	absorbé M. mycoïdes	absorbé rein cobaye
Antigène péripneumonique.	160 (.)	10	10	320	-	-	1280	80	320	640	40	20
Antigène F (rein de cobaye bouilli)	320	- (..)	-	640	-	-	40	-	-	20	-	-

(.) Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution la plus élevée donnant une fixation d'au moins 75 p.100

(..) Le signe - indique qu'il n'y a pas de fixation.

TABLEAU N° II

Déviation du complément effectuées avec différents sérums de bovins atteints de péripneumonie. Sérums purs et absorbés.

Sérums Antigènes	Numéros des sérums							
	506		507		508		510	
	pur	A.Rc *	pur	A.Rc	pur	A.Rc	pur	A.Rc
Antigène péripneumonique	640	160	80	traces	320	20	10	-
Antigène F (rein de cobaye bouilli)	80	10	20	-	40	-	-	-

(*) Sérum absorbé par rein de cobaye bouilli

Il convenait alors de vérifier si l'hyperimmunisation de lapins avec un antigène F faisait apparaître des anticorps antipéricapneumoniques. A cet effet, 3 lapins furent immunisés selon la technique de KABAT et MAYER, ainsi que nous l'avons dit plus haut. Le tableau 3 rapporte éloquentement les résultats : l'hyperimmunisation Forssman fait apparaître des anticorps fixant spécifiquement le complément avec un antigène péripleurmonique.

Que l'hyperimmunisation à l'aide d'antigène F fasse apparaître dans les sérums une activité péripleurmonique est encore montré par le fait qu'un sérum de lapin anti-hématies A humaines (qui contiennent l'antigène F) dévie le complément au 1/80 en présence de l'antigène *M. mycoïdes*, alors qu'un sérum de lapin anti-hématies B humaines (qui ne contiennent pas l'antigène F) ne dévie pas le complément avec le même antigène.

TABLEAU N° III

Hyperimmunisation des lapins par l'antigène Forssman :
recherche des anticorps anti-*M. mycoïdes* et anti-F.

N°s des lapins	avant immunisation		après immunisation	
	Ag <i>M. mycoïdes</i>	Ag. F	Ag <i>M. mycoïdes</i>	Ag F
94	10 (traces)	20 (*)	160	25.600
96	10 (traces)	20	160	12.800
97	traces à 1/1	10	80	12.800

(*) Titre exprimé par l'inverse de la dilution la plus élevée donnant une fixation d'au moins 75 p.100.

Il convenait, inversement, de rechercher l'élaboration d'anticorps à activité sérologique anti-Forssman dans les sérums de lapins hyperimmunisés avec *M. mycoïdes*. Cette recherche est résumée dans le tableau 4 : dans ce but on n'a pas employé la déviation du complément classique, mais l'hémolyse directe utilisant comme sérum hémolytique le sérum de lapin anti-*M. mycoïdes* agissant sur 0,1 ml d'une suspension d'hématies de mouton à 1 pour 100 en présence de 0,4 ml de C' au 1/100. L'activité hémolytique (activité anti-Forssman) apparaît dans les sérums de lapins après hyperimmunisation ; faible, elle est sans commune mesure avec la richesse en anticorps antipéricapneumoniques spécifiques, comme le montre le tableau 4.

On était en droit de se demander quel motif antigénique sur *M. mycoïdes* jouissait de l'activité

Forssman ; en premier lieu, il était tentant de penser au galactane. Effectivement, le galactane inhibe les hémolysines anti-globules rouges de mouton d'un sérum de lapin anti-*M. mycoïdes* (tableau 5).

Par ailleurs, un sérum de lapin fixant le complément au 1/512 et hémagglutinant au titre 1/2500 lyse les hématies de mouton au 1/40 ; cette activité est inhibée par des dilutions de galactane. Ce résultat vient recouper les observations du tableau 1 où les sérums de bovin et d'âne voyaient leur activité anti-Forssman abolie après absorption par le microbe péripleurmonique.

De la même façon, un sérum de bovin atteint de péripleurmonie, fixant le complément au 1/1280 avec l'antigène péripleurmonique et au 1/40 avec l'antigène F, voit ces deux activités

TABLEAU N° IV

Hyperimmunisation des lapins par *M. mycoïdes* : recherche des anticorps anti-*M. mycoïdes* et anti F.

Numéros des lapins	Titre agglutinant les particules de latex sensibilisées par le galactane	Réaction d'hémolyse (*) Dilution au :					
		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
80	20,480	4	4	4	2	0	0
82	5,120	4	4	4	2	0	0
85	5,120	4	4	3	2	0	0
87	10,240	4	4	3	2	0	0

(*) Réaction d'hémolyse décrite dans le texte. Les chiffres 4,3,2,0 indiquent le degré d'hémolyse.

TABLEAU N° V

Inhibition de l'activité hémolytique d'un sérum de lapin anti-*M. mycoïdes* par le galactane

	Dilutions du sérum							
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
Sérum non traité	4	4	4	4	2	1	-	-
Inhibition par le galactane	20 / μ g	4	4	3	1	-	-	-
	40 / μ g	4	4	3	1	-	-	-
	100 / μ g	4	4	2	tr.	-	-	-
	200 / μ g	4	3	1	-	-	-	-
	500 / μ g	4	2	-	-	-	-	-
	1 mg	4	1	-	-	-	-	-
	2,5 mg	-	-	-	-	-	-	-
	5 mg	-	-	-	-	-	-	-

Disposition de la réaction : 0,2 ml de sérum ou de ses dilutions
0,4 ml C' au 1/100
0,1 ml dilution galactane
0,1 ml d'hématies de mouton à 1 p.100 .

abolies lorsqu'on lui fait subir une absorption préalable avec des quantités de galactane allant de 50 μ g à 1mg/ml.

Si cette activité anti-Forsman des sérums peut être inhibée par le galactane, il est par contre troublant de constater que :

— les sérums de lapin anti-hématies de mou-

ton n'agglutinent par les particules de latex sensibilisées par le galactane ;

— les sérums de lapin anti-*M. mycoïdes* après absorption par les phosphatides de rein de cheval (antigène F), ne montrent aucune baisse de titre dans la réaction d'agglutination des particules de latex sensibilisées par le galactane ;

— des sérums de lapin anti-F qui ont un très fort pouvoir hémolytique sur les hématies de mouton, n'ont qu'un titre dérisoire en agglutination des particules de latex (tableau 6).

Il est remarquable, par ailleurs, de constater que l'activité hémolytique de ces sérums, n'est ni abolie ni même réduite par absorption avec des quantités, parfois énormes, de galactane (de 10 à 20 mg/ml. de sérum) ; ce fait contraste

avec les résultats partiels du tableau 1 où l'absorption était réussie avec les corps microbiens de *M. mycoïdes*.

Signalons enfin que des sérums de lapins hyperimmunisés contre *M. mycoïdes* (souches V5 et B17) ne se montrent pas toxiques pour le cobaye par inoculation intraveineuse alors que le sont les sérums anti-F.

* * *

TABEAU N° VI

Activités lytiques et agglutinantes des particules de latex sensibilisées d'un sérum de lapin anti-F.

Hémolyse des hématies de mouton										
Dilutions N°s des lapins	1/160	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12.800	1/25.600	1/51.200
12	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
17	4	4	4	4	4	4	4	4	3	1

Agglutination des particules de latex à 0,5 p.100 sensibilisées par l'antigène WC ₁ B ₁₇							
Dilutions N°s des lapins	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
12	4	3	2	2	1	-	-
17	4	4	1	-	-	-	-

DISCUSSION

L'ensemble de nos résultats laisse supposer que sur un ou plusieurs antigènes de *M. mycoïdes* existe une activité sérologique Forssman.

En effet, l'anticorps présent dans les sérums anti-péripneumoniques remplit les critères que l'on retrouve dans les sérums anti-F *anti-microbiens* : apparition d'hémolysine anti-mouton lors de l'immunisation microbienne, absorption de ces hémolysines par des extraits microbiens, en l'occurrence le galactane de *M. mycoïdes*. Inversement, l'hyperimmunisation anti-F fait apparaître des anticorps anti-*M. mycoïdes*.

Nous avons pensé que le galactane, polyside relativement pur ne contenant qu'une infime fraction lipidique, pouvait être le support de cette activité Forssman. Il semble toutefois que si le galactane est apte à capter les hémolysines Forssman d'un sérum anti-*M. mycoïdes* (tableau 5) et à abolir par là l'activité anti-Forssman de ce sérum, les anticorps anti-F ne soient pas spécialement dirigés contre lui (tableau 6). L'inhibition de l'hémolyse des sérums anti-*mycoïdes* est d'ailleurs obtenue bien plus aisément par les corps microbiens totaux que par le galactane. Le galactane ne jouirait donc par lui-même que d'une très faible activité Forssman ; ce ne serait que

copulé à un autre antigène du microbe qu'il aurait son activité Forssman complète.

Remarquons à ce propos que la fraction N-acétyl-galactosamine qui est caractéristique de l'antigène F semble ne pas exister sur le galactane (1).

Il semble qu'il ne faille établir aucune relation entre une activité sérologique Forssman de *M. mycoïdes* et les anticorps anti-*mycoïdes* que l'on peut mettre en évidence à de faibles titres dans les sérums des bovins « tout venant », originaires de France ou d'Afrique. Ces anticorps ne sont pas absorbables par l'antigène F (rein de cobaye bouilli) et leur genèse doit trouver une autre explication.

L'activité sérologique Forssman de *M. mycoïdes*

se trouve ainsi réduite comme celle de beaucoup d'autres microbes, à celle d'une simple curiosité de laboratoire.

Il convient néanmoins de retenir que l'âne, animal du groupe Forssman positif, répondra vraisemblablement de façon incomplète à la sollicitation antigénique qui lui est imposée lors d'une hyperimmunisation destinée à obtenir des sérums anti-*M. mycoïdes* ; malgré la richesse en anticorps précipitant que produit cette espèce animale, on est en droit de se demander si l'âne ne devrait pas être écarté lorsque l'on recherche la totalité de la réponse immunologique, comme c'est le cas par exemple pour des analyses antigéniques de *Mycoplasmataceae*.

SUMMARY

Possible presence of an antigen Forssman type in *M. Mycoïdes*.

The authors show clearly that the Forssman serological activity may be additional to and co-existent with an anti-C. B. P. P. activity in the sera samples tested. On the other hand hyperimmunisation of rabbits by the Forssman technique induces the appearance of antibodies specific for complement using C. B. P. P. antigen. The nature of the antigen is discussed.

Galactane *per se* shows a feeble activity (Forssman) but with another antigen, the activity will be complete.

It seems that there is no relation between the Forssman serological activity with *M. mycoïdes* and the normal anti-*mycoïdes* antibody of low titre demonstrated in cattle originating from (non enzootic) areas in France and Africa.

RESUMEN

Presencia de un antígeno con actividad antigenica Forssman en el *Mycoplasma mycoïdes*.

Los autores demuestran claramente que una actividad serológica de tipo Forssman puede anadirse o coexistir con una actividad serológica anti-*mycoplasma mycoïdes*. Por otra parte la hiperinmunización de los conejos segun el método Forssman provoca la aparición de anticuerpos fijando el complemento en presencia del antígeno peripneumónico. La naturaleza de este antígeno es muy discutida.

El galactan no tiene por si mismo una gran actividad Forssman, pero podría llegar a tenerla por acoplamiento con otro antígeno.

Parece ser que no existe ninguna relacion entre esta actividad Forssman y los anticuerpos anti-*Mycoplasma mycoïdes* que se encuentran normalmente, con titulo débil, en los sueros de bovinos viviendo en zonas indemnes (Francia, Africa).

BIBLIOGRAPHIE

1. BUTTERY (S. H.) et PLACKETT (P.). — « A specific polysaccharide from *Mycoplasma mycoides*. » *J. Gen. Mic.*, 1960, **23** : 357.
2. CAMPBELL (A. D.) et TURNER (A. W.). — « Studies on contagious pleuropneumonia of cattle : IV. an improved complement fixation test. » *Aust. Vet. J.*, 1953, **29** : 154.
3. KABAT (E. A.) et MAYER (M. M.). — « Experimental immunochemistry. » 2^e édition, C. C. Thomas, Springfield, Ill., U. S. A. 1961.
4. KOLMER (J. A.), SPAULDING (E. H.) et ROBINSON (H. W.). — « Approved laboratory Technic. » 5^e édition, Appleton Century Crofts, Inc. New-York, U. S. A. 1951.
5. PERREAU (P.) et BERGERON (D.). — « Emploi de particules de latex dans la sérologie de la péripneumonie des bovidés (réaction d'agglutination indirecte). » *Rev. Elev. Méd. vét. des Pays trop.*, 1963, **16** : 297.
6. PLACKETT (P.) et BUTTERY (S. H.). — « A galactan from *Mycoplasma mycoides*. » *Nature*, 1958, **182** : 1236.
7. QUEVAL (R.), PROVOST (A.) et VILLEMOT (J. M.). — « Comparaison de méthodes de déviation du complément utilisées dans l'étude de la péripneumonie bovine. » *Bull. Epiz. Dis. Africa*, 1964 (à paraître).
8. VILLEMOT (J. M.), PROVOST (A.) et QUEVAL (R.). — « An endotoxine from *M. mycoides*. » *Nature*, 1962, **193** : 906.