

Le test d'allergie et le diagnostic de la péripneumonie bovine

I. — Commentaires sur l'extraction de l'antigène protéique et étude expérimentale sur animaux de laboratoire.

par P. PERREAU

avec la collaboration technique de Melle P. GAYT
Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux
(Laboratoire de Maisons-Alfort)

RÉSUMÉ

L'antigène protéique destiné aux tests d'allergie et préparé selon la méthode de R. N. GOURLAY (lyse par les ultra-sons et précipitation par le sulfate d'ammonium) est toujours plus ou moins contaminé par l'antigène lipopolyosidique de *Mycoplasma mycoides*.

Les lapins et les cobayes sensibilisés artificiellement par l'injection du mélange : Mycoplasmes-adjuvant de Freund répondent aux injections intradermiques de l'antigène protéique par un phénomène d'Arthus, qui semble provoqué aussi bien par la fraction protéique vraie que par la fraction lipopolyosidique.

La nature de cette hypersensibilité est confirmée par l'action de l'héparine sur les réactions cutanées et par la possibilité du transfert passif de cette allergie à un animal neuf.

La mise en évidence chez les animaux de laboratoire d'une hypersensibilité de type retardée reste difficile ; elle exige la préparation d'un antigène protéique pur.

Le document de travail présenté par R. N. GOURLAY (5) à la seconde réunion du Comité d'Experts à Muguga en 1964 avait vivement intéressé les assistants puisqu'il semblait que la réaction d'allergie spécifique allait pouvoir servir, seule ou en conjonction avec les méthodes sérologiques, au diagnostic de la péripneumonie.

Cette première publication n'abordait pas le problème de la nature de cette allergie ; mais, dans un autre rapport présenté à cette même conférence, A. PROVOST, J. M. VILLEMOT et C. BORREDON (10) montraient que les extraits antigéniques de *M. mycoides* injectés par la voie intradermique provoquaient un phénomène d'Arthus net chez les lapins préparés

par l'injection massive préalable d'un sérum de bovin malade.

Les travaux entrepris par R. N. GOURLAY se sont depuis poursuivis et ont donné lieu à une série de publications (4, 5, 6, 7, 8 et 11) qui laissent à penser, en tout état de cause, que le diagnostic allergique de la péripneumonie n'est ni une chose simple ni même sans doute une chose possible pour autant que l'on recherche une réaction d'allergie retardée de type tuberculinique, tout au moins dans nos conditions techniques actuelles.

Aussi croyons-nous utile d'apporter ici les résultats de nos observations puisque, suivant en cela les recommandations de la dernière

réunion du groupe d'experts, l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux a poursuivi durant deux ans l'étude de la valeur de ce test.

Partant du principe qu'aucune méthode de ce genre ne peut passer dans l'application pratique avant que l'antigène de diagnostic ait été normalisé, nous avons donc essayé de préparer un antigène-type permettant à des opérateurs différents de pouvoir comparer leurs résultats ; la nature de l'allergie que cet antigène pouvait révéler fut aussi recherchée.

Puisqu'à l'origine c'était une fraction de nature protéique qui était mise en cause, nous avons conservé la méthode d'extraction de R. N. GOURLAY au moins dans ses deux temps essentiels, la lyse par les ultra-sons et la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Les différents extraits (7 lots successifs d'antigène) ont été éprouvés dans un premier temps sur les animaux de laboratoire, ensuite sur des bovins malades naturels ou expérimentaux, au Sénégal et au Tchad (laboratoire de Dakar-Hann et de Fort-Lamy-Farcha).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Préparation de l'antigène (*)

1^o Souches de *M. mycoides* :

Ce sont la souche virulente B₁₇ originaire du Tchad et les deux souches vaccinales V₅ et T_{8/33}.

2^o Cultures :

Les récoltes microbiennes proviennent de cultures non agitées effectuées dans le milieu suivant :

Bacto-Tryptone Difco (ou Tryptone Oxoïd)	200 g
Extrait de levure Difco	60 g
Glucose	20 g
Chlorure de sodium	50 g
Phosphate disodique anhydre	25 g
Glycérine	10 g
Eau Q. S. pour	10 l

(*) Le tableau n° 1 schématise les différentes phases de l'extraction de l'antigène pour allergie ; ce procédé, à quelques modifications mineures près, est celui que nous avons suivi dans tous nos essais.

Elles sont utilisées soit dès leur obtention, soit après lyophilisation et conservation au congélateur à — 30 °C.

Dans tous les cas, les germes sont lavés au moins trois fois en solution physiologique (sérum isotonique normal ou P. B. S. de Dulbecco) afin de débarrasser l'antigène des éléments du milieu et notamment du sérum de cheval ou de mouton ; quelquefois, cinq centrifugations de lavage sont effectuées.

Les suspensions de mycoplasmes qui doivent être traitées par les ultra-sons ont une densité ajustée soit par la méthode optique (tubes n° 50, 80 ou 100 de Brown), soit par la méthode pondérale lorsqu'il s'agit de germes secs (10 ou 20 mg par ml).

Elles sont faites avec les solutions physiologiques déjà citées à propos des lavages ou avec de l'eau distillée.

3^o Centrifugations :

L'ensemble des centrifugations est effectué dans une centrifugeuse réfrigérée Servall RC-2, rotor SS-34 ; les mycoplasmes sont d'abord isolés du milieu de culture avec le système Szent-Gyorgyi, à débit continu.

a) Centrifugation de lavage des germes : à 12.000 tours durant 20 minutes, à une température inférieure à 10 °C.

b) Centrifugation séparative (après les ultra-sons) : à 18.000 tours durant 20 minutes, à 4 °C.

c) Centrifugation des précipités au SO₄(NH₄)₂ : à 6.000 tours durant 15 minutes à 4 °C.

4^o Traitement aux ultra-sons :

Nous avons employé un appareil MSE Mullard, à fréquence d'utilisation de 20 kilocycles/seconde et d'une puissance de 60 watts.

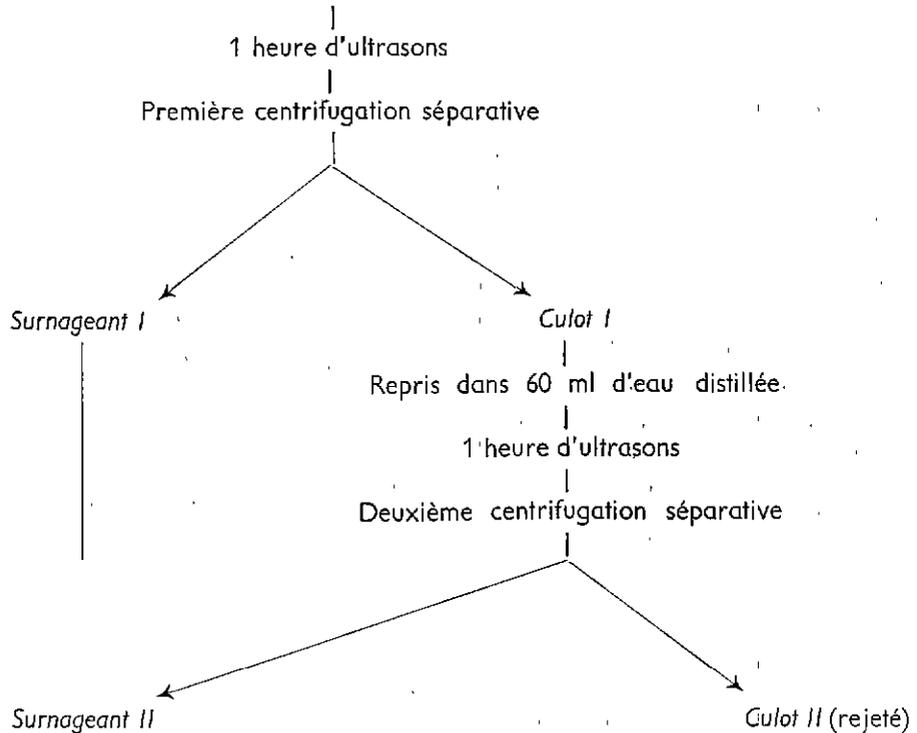
Les suspensions sont soumises à froid durant une heure aux ultra-sons ; une première centrifugation sépare un surnageant et un culot qui, repris dans un volume de diluant égal à la moitié du volume initial, est soumis à nouveau aux ultra-sons durant une heure. Une deuxième centrifugation sépare un second surnageant qui est ajouté au premier ; le culot final n'est pas utilisé pour l'extraction de l'antigène recherché. Nous n'employons donc pas le procédé de filtration pour séparer la phase « soluble » de la phase « insoluble ».

TABLEAU N° 1

Méthode d'extraction de la fraction protéique totale de *M. mycoïdes*

Exemple : préparation de notre lot d'antigène F₅ :

— Récolte de la souche B 17 (germes lavés 5 fois en P. B. S.), mise en suspension dans 160 ml d'eau distillée (l'opacité est celle du tube 100 de Brown).



Surnameant total (170 ml environ)

— 6 précipitations successives par le $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 50 p. 100,

— reprise du culot final dans 80 ml d'eau distillée et dialyse contre de l'eau physiologique à pH 7,

— concentration du dialysat à 80 ml par évaporation à froid,

— ajustement du pH à 7,2,

— addition de merthiolate à 1 p. 5.000,

— remise en solution « limpide » par un passage de quelques minutes aux ultra-sons,

— répartition en flacons et congélation.

N. B. Pour cet antigène, il n'a pas été utilisé d'urée et le pH n'a pas été maintenu en zone alcaline.

Nous avons, dans la moitié environ de nos essais, ajouté de l'urée (à concentration : 2,5 M) aux suspensions traitées, ainsi que le préconisait R. N. GOURLAY (5).

En ce qui concerne l'ajustement du pH, à une seule exception près, les diverses étapes de l'extraction ont été faites à des pH proches de la neutralité 7,2 pour le P. B. S. et 7,0 pour la solution de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

5° Précipitations par le sulfate d'ammonium

Dans tous les cas, elles ont été faites à demi-saturation (50 p. 100) en mélangeant à parties égales les surnageants et la solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ correctement neutralisée par l'ammoniaque.

6 précipitations successives, avec remise en solution dans le diluant initial, sont suivies d'une dialyse contre du P. B. S.

Celle-ci terminée, l'antigène obtenu est concentré par évaporation à froid à un volume égal au 1/2 ou au 1/3 du volume de la suspension originelle de mycoplasmes.

Il est conservé congelé à -30°C après avoir reçu du merthiolate à 1/5.000.

B. Extraction de galactane

Elle est faite simplement par le phénol à chaud, selon le protocole de Westphal et Luderitz, comme nous l'avons déjà décrit (9).

C. Animaux de laboratoire

Cobayes et lapins ont servi à éprouver les fractions antigéniques obtenues, mais surtout les lapins de race Blanc du Bouscat, pesant 2 kg environ, nous ont donné d'excellents résultats.

Ces animaux étaient sensibilisés par une injection unique sous-cutanée de 1 ou 2 ml du mélange à parties égales : adjuvant complet de Freund et suspension dense (tube n° 20 de Brown) de mycoplasmes entiers.

Pour les cobayes, le volume inoculé était de 0,5 ml.

Les épreuves d'allergie ne commençaient pas avant qu'un délai de 4 semaines se fût écoulé après l'injection sensibilisante.

D. Tests d'allergie

Le jour de l'épreuve, les animaux recevaient par la voie intradermique, au niveau de la peau du flanc et après rasage, des volumes uniformes (0,05 ou 0,1 ml) de chacun des antigènes choisis.

Non seulement les fractions protéiques étaient injectées mais aussi, à titre de témoins de comparaison, des antigènes totaux de lyse par ultrasons, du lipopolyoside extrait par la méthode de Westphal, des dilutions du sérum animal employé pour la culture des germes et aussi des fractions protéiques traitées par la trypsine.

En outre pour une même série d'antigènes, les lapins sensibilisés étaient employés par lot de trois ; l'un traité par le Phénergan (*) avant les injections intradermiques (1 ml de la solution à 2,5 p. 100 par la voie intraveineuse, puis 1 ml une heure après par la voie intra-musculaire), le second traité par l'héparine (**) (200 unités internationales par la voie intraveineuse) et le troisième servait de témoin sensibilisé normalement.

La lecture des réactions commençait dès les premières 15 minutes et se poursuivait d'heure en heure au cours de la 1^{re} journée. Le lendemain les animaux étaient vus deux fois ; puis une seule fois par jour pendant une semaine.

E. Tests sérologiques

1. Immunodiffusion en gélose :

Cette méthode nous a beaucoup servi pour l'analyse immunologique des divers antigènes.

Elle était effectuée très simplement dans des boîtes de Pétri contenant le gel suivant, de pH 7 :

Gélose Noble Difco	12 g
Merthiolate de sodium	0,20 g
P. B. S. (Dulbecco) q. s.	1.000 ml

Les sérums précipitants étaient des sérums de référence préparés sur des lapins immunisés toujours par la méthode de Freund.

2. Hémagglutination passive:

Exécutée selon une méthode déjà décrite (9).

(*) Phénergan Specia (prométhazine), soluté à 2,5 p. 100.

(**) Héparine pure, F. Hoffman. La Roche et Cie.

3. Déviation du complément :

Elle a servi, comme la réaction précédente, au titrage des sérums des lapins sensibilisés ; la technique utilisée était du type Kolmer.

RÉSULTATS

1. Extraction de la fraction protéique de *M. mycoïdes* :

La lyse par les ultrasons est efficace et la suspension opaque de mycoplasmes s'éclaircit assez vite pour se transformer en un liquide translucide, de couleur jaune verdâtre plus ou moins foncé.

Les antigènes libérés (sinon solubilisés) représentent, au bout d'une demi-heure de traitement aux ultra-sons, 62,2 p. 100 du poids initial de mycoplasmes mis en suspension ; au bout d'une heure, 66,1 p. 100.

Si l'on prolonge ce traitement, cette proportion ne s'accroît plus dans de notables proportions.

Les culots obtenus par centrifugation sont constitués de particules pouvant être considérées comme des débris ou des fragments de mycoplasmes encore qu'il ne soit pas certain que la totalité des germes ait été vraiment détruite ; on peut cependant montrer qu'il n'existe plus de mycoplasmes viables.

Le milieu de suspension ne semble pas avoir une bien grande influence sur l'efficacité de cette lyse et l'eau distillée ne provoque pas une libération d'antigènes meilleure que l'eau physiologique ou le P. B. S.

Par contre, il est certainement préférable d'utiliser des germes frais plutôt que des germes lyophilisés ; ceux-ci semblent, dans la majorité des cas, fournir des surnageants moins riches en antigènes libérés, ce qui peut s'expliquer par les transformations physiques quelquefois irréversibles que la dessiccation provoque sur les antigènes lipopolyosidiques de surface et qui se manifestent essentiellement par une grande diminution de leur solubilité.

Comme GOURLAY (5) l'a décrit, une filtration sur filtre Millipore HA retient sur le disque un dépôt très important plus ou moins visqueux ; mais le filtrat obtenu passe encore difficilement sur des Millipore GS ou VM, où il abandonne toujours des dépôts visqueux, ce qui entraîne

une perte non négligeable d'antigène doué d'activité.

Aussi avons-nous, par souci de simplification, abandonné les filtrations pour nous en tenir à une simple centrifugation à vitesse élevée, permettant de séparer un surnageant apparemment débarrassé de tout élément particulaire.

Il est vrai aussi que l'addition d'urée à 2,5 M ou l'ajustement du pH à une valeur élevée (≥ 9) semblent favoriser la solubilisation des antigènes libérés ; les surnageants sont plus translucides et les culots souvent plus petits.

Il est cependant encore très vrai que, même avec ces procédés, les filtrats ou les surnageants ne contiennent pas que des antigènes réellement solubles. En dehors du fait qu'ils ne sont jamais vraiment limpides, il suffit de les placer une nuit au réfrigérateur (ou même de les abandonner à la température du laboratoire) pour qu'y apparaissent spontanément des précipités granulaires ou floconneux, que l'on peut éliminer par centrifugation. Le lysat retrouve alors une limpidité temporaire, car ce phénomène de précipitation se poursuit avec le temps.

Cette observation vaut également pour la solution finale d'antigène, obtenue après les précipitations au sulfate d'ammonium et la dialyse ; il est pratiquement impossible d'avoir une solution vraie, à moins d'élever le pH à une valeur ≥ 11 , ce qui nous paraît incompatible avec l'usage que l'on prévoit pour cet antigène.

Les particules qui « naissent » dans cet extrait protéique peuvent se disperser et apparemment disparaître, lorsque celui-ci est soumis durant quelques minutes aux ultra-sons ; c'est le procédé que nous avons choisi. Dès la fin de ce traitement, l'antigène est immédiatement congelé et le restera jusqu'à son emploi.

2. Caractères des réactions allergiques chez les animaux de laboratoire et nature de cette allergie.

Nous décrivons essentiellement nos observations sur le lapin ; les expériences faites sur les cobayes seront brièvement citées.

Les lapins, au moment où ils reçoivent les injections intradermiques d'antigènes, ont un titre d'anticorps spécifiques allant du 1/160 au 1/640 pour la déviation du complément et du 1/320 au 1/1.280 pour l'hémagglutination pas-

sive ; ils ont tous des précipitines spécifiques, ainsi que le montre la précipitation interfaciale en tube.

Si l'immunisation des animaux a été effectuée avec l'adjuvant de Freund, c'est bien parce que cette méthode est réputée la meilleure pour conférer l'hypersensibilité vis-à-vis d'un antigène donné, qu'elle soit retardée ou immédiate.

D'une façon générale, les lapins sensibilisés répondent à l'injection intradermique de l'antigène protéique de *M. mycoïdes* par une réaction rapide (sinon immédiate) caractérisée par une grosse papule érythémateuse, à centre congestif ou même hémorragique (cf. photo n° 1).

Cette réaction déjà visible au bout de 20 à 30 minutes, devient très nette en quelques heures et passe par un maximum entre 16 et 24 heures, au moins pour ce qui est du diamètre de la papule et de l'épaisseur du plateau œdémateux. Si la réaction est intense le centre congestif devient rapidement violet et évolue vers la nécrose, si bien qu'au 4^e jour subsiste seulement une escarre en dépression, circulaire et comme taillée à l'emporte-pièce (voir photo n° 7). L'œdème proprement dit disparaît ou régresse fortement dès le 2^e jour. Le même phénomène s'observe sur les cobayes sensibilisés.

Cette nécrose n'est pas obligatoire, elle signe seulement une réaction marquée ; elle dépend aussi, nous y reviendrons, de la nature des antigènes injectés.

Il est à souligner :

a) Que le traitement préalable de l'animal par le Phénergan (une heure avant les injections intradermiques) modifie l'aspect de la réaction, mais ne la supprime pas. En effet, chez les lapins qui n'ont pas reçu d'antihistaminique, la lésion cutanée locale est très vite congestive, noyée dans une atmosphère œdémateuse et les vaisseaux superficiels périphériques sont très nettement dilatés, de telle sorte qu'il arrive que la papule centrale ne se repère bien que par le point d'injection. Au contraire, chez les lapins traités au Phénergan, ces phénomènes congestifs locaux sont supprimés et la réaction cutanée apparaît sous la forme d'une papule plate à bord très net et à centre nécrotique bien individualisé (voir les photos n° 2 et n° 3).

b) Que le traitement préalable par l'héparine de l'animal sensibilisé tempère très nettement

l'intensité de la réaction cutanée ; l'œdème initial local est plus réduit, il disparaît souvent en quelques heures et les phénomènes de nécrose centrale n'existent plus. Bref, l'héparine possède une action « abortive » sans équivoque sur ce phénomène d'hypersensibilité.

c) Que ces antigènes déclenchent les mêmes réactions cutanées chez les animaux neufs qui ont reçu immédiatement avant une quantité suffisante d'un sérum précipitant, qu'il soit celui d'un bœuf malade (10) ou celui d'un animal immunisé artificiellement.

La méthode de transfert la plus commode est d'ailleurs le phénomène d'Arthus inversé : un lapin neuf reçoit dans le derme 0,1 ml du sérum à éprouver, puis sans délai reçoit par la voie intra-veineuse 2 ml de l'antigène pour test d'allergie.

Les résultats sont très nets et sans équivoque.

Ces constatations indiquent que la réaction cutanée du lapin sensibilisé expérimentalement relève avant tout d'un mécanisme de type Arthus peut-être associé au départ à un phénomène d'anaphylaxie immédiate locale qu'on supprime facilement par l'emploi d'un antihistaminique. L'efficacité de ce dernier ne peut toutefois constituer la preuve d'une sensibilité d'ordre anaphylactique, puisque le Phénergan est actif aussi pour des réactions inflammatoires qui n'ont pas l'allergie pour origine.

Il est tout aussi difficile de nier que d'affirmer l'existence d'une allergie de type retardée, mais l'observation des animaux d'expérience laisse à penser que ses manifestations ne doivent être que fort discrètes, masquées par l'évolution du phénomène d'Arthus qui reste l'élément majeur de la réaction. En tempérant celui-ci, le traitement par l'héparine devrait la révéler, mais nous ne l'avons jamais identifiée de façon certaine.

Chez le cobaye, les observations sont identiques.

Il existe dans ces expériences, une source d'erreur qu'il ne faut en aucun cas sous-estimer ; les lapins immunisés, surtout avec les adjuvants de Freund, par des mycoplasmes cultivés dans un milieu au sérum de cheval, ont habituellement des anticorps anti-cheval à des titres non négligeables, même s'ils ont reçu des germes lavés plusieurs fois et par conséquent du sérum à l'état de traces infimes.



Photo n° 1. — Lapin 39/7 ; réactions de 8 heures
Réaction n° 1 : 0,05 ml de l'antigène originel de R. N. GOURLAY.
— 2 : 0,1 ml du lot d'antigène n° 4 (avec urée).
— 3 : 0,1 ml de l'antigène total de *M. mycoides* B 17.
— 4 : 0,1 ml de sérum de cheval au 1/100.

Ce lapin possédait une hypersensibilité vis-à-vis des protéines sériques de cheval, comme le montre l'inoculation de contrôle en 4 ; c'est la seule réaction qui n'ait pas un centre hémorragique et elle sera complètement disparue le lendemain, au contraire des 3 autres.

En 3, le phénomène d'Arthus est intense, avec l'antigène total (de lyse par ultra-sons) de la souche virulente B 17 cultivée sur milieu au sérum de mouton.



Photo n° 2. — Lapin n° 7 non traité par le Phénergan.

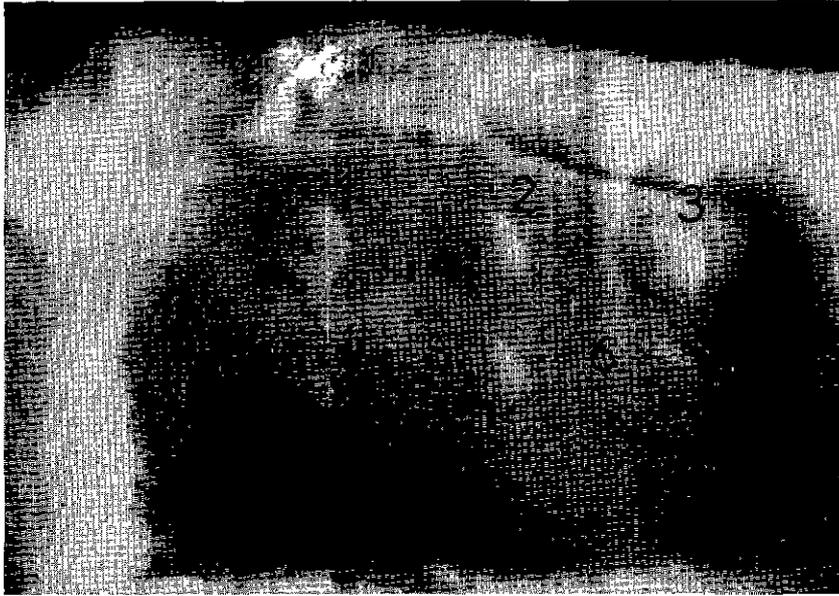


Photo n° 3. — Lapin n° 15 traité par le Phénergan. Les réactions sont photographiées au bout de 3 heures seulement ; elles doubleront encore de diamètre.

- 1 : 0,1 ml du lot F₅.
- 2 : 0,1 ml du lot F₅ dilué au 1/2.
- 3 : 0,1 ml du lot F₅ dilué au 1/5.
- 4 : 500 µg de galactane sous le volume de 0,1 ml.
- 5 : 250 µg — — —
- 6 : 125 µg — — —

L'influence du Phénergan est particulièrement nette et, sur le lapin 15, on voit que le galactane seul provoque une réaction qui est environ de moitié moindre que celle provoquée par l'antigène F₅.

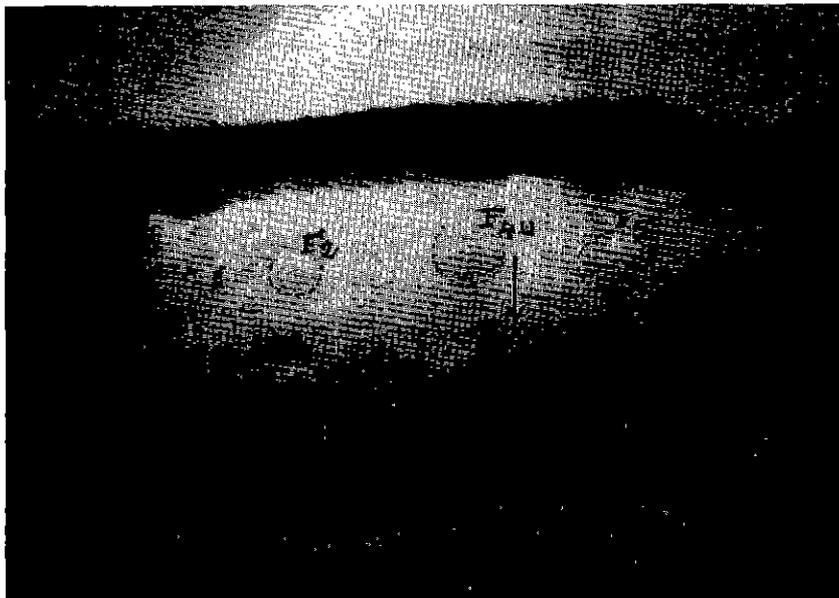


Photo n° 4. — Lapin n° 11 traité par le Phénergan.
En haut, 3 lots d'antigène protéique F₂, F_{4U} et F₅ (0,1 ml). En bas, le galactane et les antigènes F_{4U} et F₅ traités par la trypsine (0,1 ml)
Le lot F₂ semble peu actif, mais pour le reste les réactions sont sensiblement équivalentes.

L'expérience nous a montré qu'il fallait au minimum 6 lavages par centrifugation pour avoir des chances d'éliminer le sérum de la suspension antigénique.

Aussi avons-nous finalement choisi d'immuniser les animaux avec des mycoplasmes cultivés sur milieu au sérum de mouton, tandis que les antigènes d'allergie étaient extraits de cultures sur milieu au sérum de cheval (ou inversement).

3. Les antigènes « déchainants » sont-ils exclusivement protéiques ?

L'étude chimique et immunologique des différents lots d'antigène que nous avons préparés a montré qu'aucun d'entre eux n'était constitué exclusivement de protéines.

Le meilleur que nous ayons obtenu, le lot n° 5 contenait, par millilitre, 0,88 mg de matière sèche où la fraction protéique ne comptait que pour 65,9 p. 100 (0,58 mg) (*).

Un autre lot n° 4, très actif, ne contenait que 0,38 mg/ml de protéines pour un poids de matières sèches de 1,19 mg/ml (soit 31,9 p. 100).

Les épreuves immunologiques montrèrent alors qu'à côté de la fraction protéique existait constamment dans ces antigènes une fraction lipopolysidique (« galactane » ou éléments dérivés). En effet :

a) Tous nos extraits pouvaient servir à sensibiliser des hématies de mouton pour l'hémagglutination passive sans aucun traitement préalable de ceux-ci par l'acide tannique, propriété bien connue des lipopolysides ou polysides bactériens.

Il était d'ailleurs possible d'apprécier la richesse en galactane des antigènes en employant la méthode des dilutions ; c'est ainsi que le lot n° 5, considéré comme le plus pur en protéines, sensibilisait les hématies à l'état brut et à la dilution au 1/2 ; à la dilution du 1/5, cette propriété était perdue. En tenant compte de résultats précédemment acquis (9), on peut admettre que cet antigène contenait environ 50 µg de galactane par ml.

L'adsorption de l'antigène par les hématies constitue d'ailleurs un procédé de purification

puisque elles fixent sélectivement le lipopolyside (voir la photo n° 6) ; en répétant suffisamment l'opération, on arrive à éliminer complètement celui-ci.

Les antigènes plus concentrés, n° 4 et n° 6, sensibilisaient les hématies jusqu'à la dilution du 1/10 et du 1/25.

b) L'immuno-diffusion en gélose montrait sans équivoque que le « galactane » de *M. mycoïdes* était présent selon des proportions variables dans tous les lots d'antigènes protéiques.

Les photos n° 5 et n° 6 illustrent parfaitement ces observations : cette constatation nous rappelle que :

a) Le « galactane » de *M. mycoïdes* injecté par la voie intradermique à un lapin sensibilisé provoque un phénomène d'Arthus qui ne peut guère se distinguer de celui que déclenche l'antigène protéique. A des doses allant de 100 µg à 500 µg (voire 1 mg), il entraîne la formation rapide d'une papule dont le centre est souvent plus nettement hémorragique qu'avec l'extrait protéique et l'escarre qui s'ensuit plus sérieuse (cf. photo n° 7).

b) Le surnageant global des suspensions de *M. mycoïdes* traitées aux ultra-sons constitue aussi un bon antigène de réaction cutanée, et pour cause (voir photo n° 1) puisqu'il contient l'ensemble des précipitogènes.

Par ailleurs, les antigènes protéiques extraits selon la méthode de R. N. GOURLAY ne perdent pas leur activité, dans nos conditions expérimentales, lorsqu'ils sont traités par la trypsine ; du moins ne constate-t-on qu'un simple diminution de degré dans la réaction cutanée, ce qui laisse à penser qu'il y subsiste un antigène non protéique (voir la photo n° 4). La réaction de type d'Arthus qu'ils provoquent pourrait donc être « déclenchée » tout autant par leur fraction protéique que par leur fraction lipopolysidique ; au cours de la lecture de la réaction cutanée, la dissociation de la part qui revient à chacune d'entre elles est impossible.

DISCUSSION

Cette « contamination » des fractions protéiques microbiennes par les polysides des mêmes germes est chose courante en immuno-chimie ;

(*) Ces dosages ont été effectués par notre confrère J. P. PETIT que nous remercions très vivement pour son aide en ce domaine.

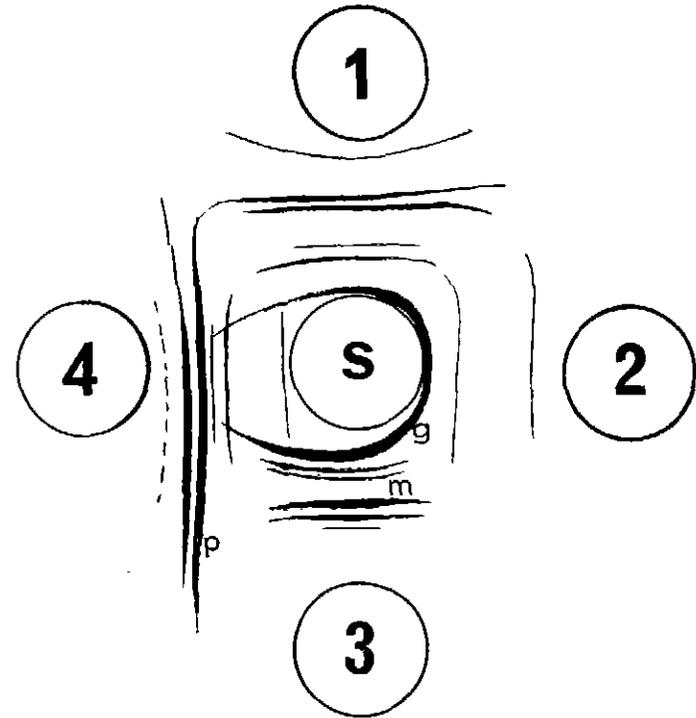
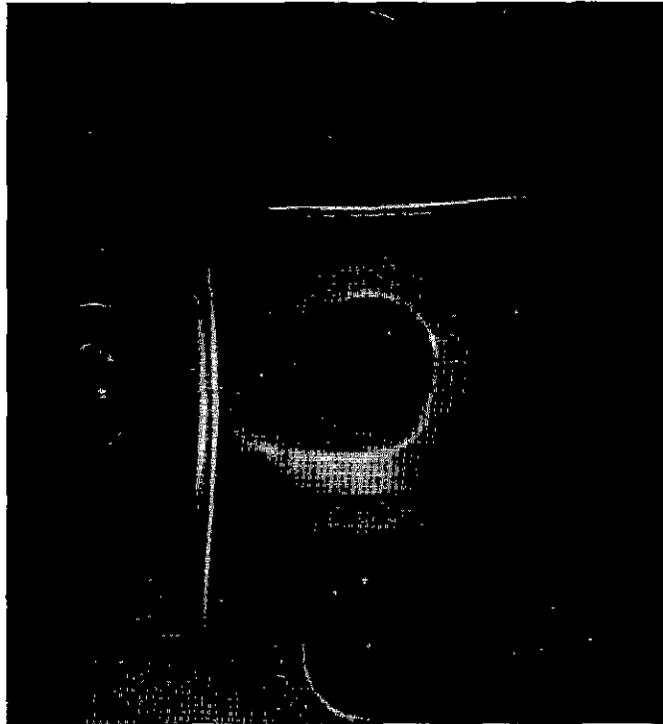


Photo n° 5 et Fig. n° 1. — Analyse antigénique de *Mycoplasma mycoides* et de l'antigène n° 5 par précipito-diffusion en gélose.

S : immunsérum précipitant de lapin (n° 68), en 1 : le produit total de lyse par les ultra-sons (surnageant pur) de *M. mycoides* (souche B 17), en 2 : le même antigène, mais les germes ont été traités dans la solution d'urée à 2,5 M, en 3 : le galactane de *M. mycoides*, en solution à 1 mg/ml, en 4 : l'antigène pour allergie n° 5.

On voit nettement : 1) que le galactane est un complexe antigénique se révélant par une ligne majeure (g) située au ras du réservoir de sérum et des lignes mineures plus éloignées (m) correspondant à des molécules à plus grande vitesse de diffusion.

2) que l'antigène total de lyse fournit au moins 6 lignes visibles de précipitation, dont la ligne majeure du galactane ; cet antigène est celui qui donne le phénomène d'Arthus très net de la photo n° 1,

3) que le même antigène issu d'une suspension de germes dans l'urée à 2,5 M se singularise par la perte d'au moins 2 lignes et la diminution de netteté des autres,

4) que l'antigène n° 5 ne se distingue essentiellement de l'antigène total que par son appauvrissement en lipopolyside, ce qui est conforme à ce que l'on attendait de la méthode d'extraction ; à cette réserve près qu'on espérait une élimination complète et non une diminution même très accentuée.

467

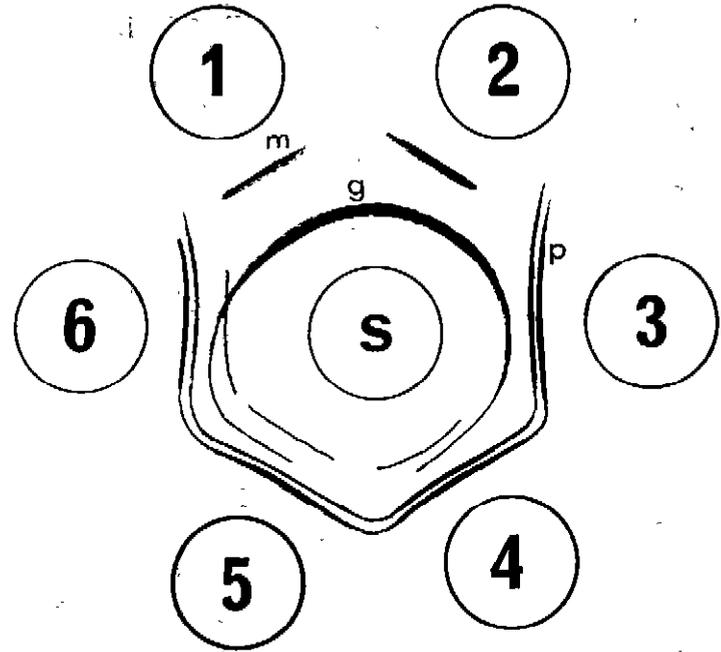
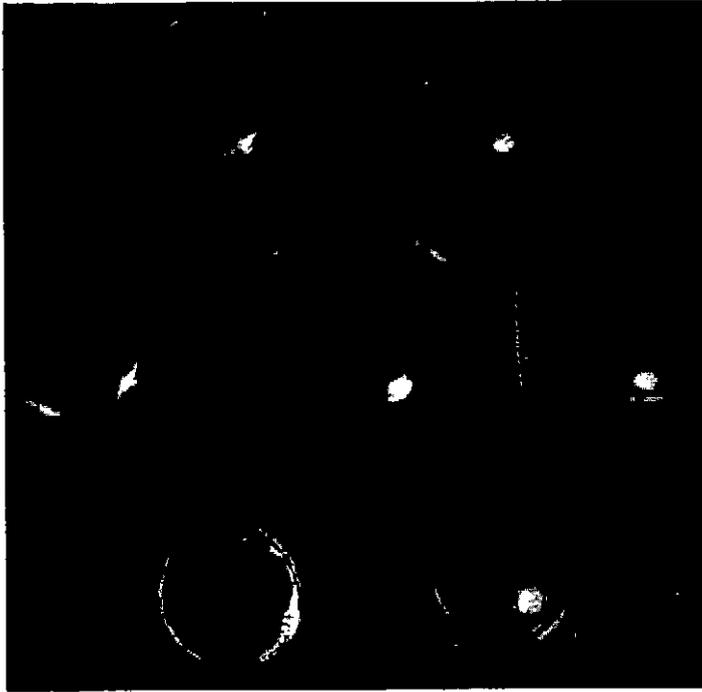


Photo n° 6 et Fig. n° 2. — Analyse antigénique de l'antigène n° 5 par précipito-diffusion en gélose

S : immunsérum précipitant de lapin N° 68, en 1 et 2 : solution de galactane à 500 µg/ml, en 3 antigène n° 5 pur, en 4 : antigène n° 5 dilué au 1/2 en 5 : antigène n° 5 absorbé 2 fois par des hématies de mouton, en 6 : antigène n° 5 absorbé 3 fois par des hématies de mouton.

L'antigène n° 5 est surtout caractérisé par ses 2 lignes majeures de précipitation (p) ; les 4 autres sont ici peu visibles. L'adsorption par les hématies de mouton n'entraîne pas leur suppression et elles correspondent vraisemblablement à des antigènes protéiques authentiques.

La ligne majeure du galactane s'estompe et s'éloigne du réservoir de sérum, en face de l'antigène n° 5 ; elle disparaît pratiquement lorsque celui-ci est dilué au 1/2 et plus encore lorsqu'il est absorbé par les globules rouges.

Cette image de précipitation est en parfaite concordance avec les résultats de l'hémagglutination passive.

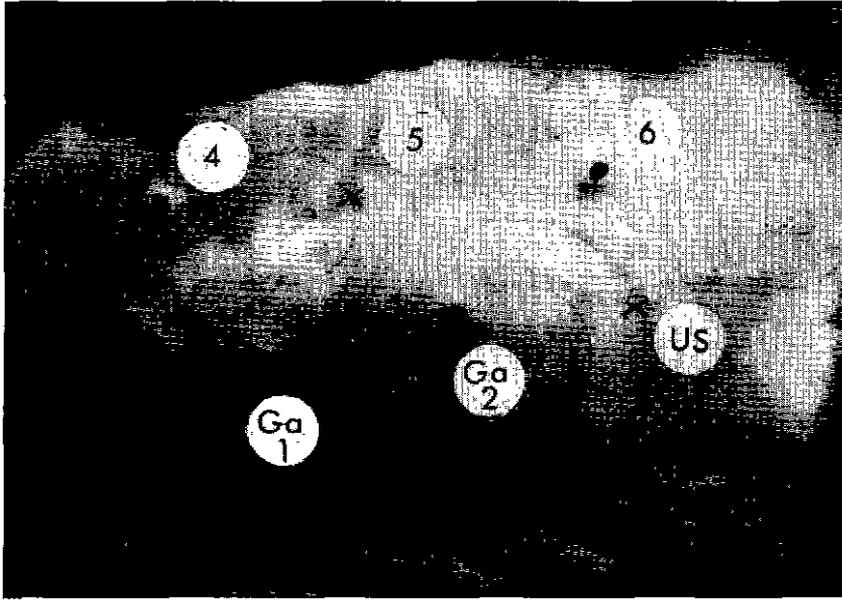


Photo n° 7. Lapin n° 13 : 4 jours après les épreuves intradermiques
Le phénomène nécrotique est particulièrement net avec la solution de galactane Ga 1 (0,05 ml) et Ga 2 (0,1 ml) et les antigènes n° 4 et n° 6 qui sont concentrés et contiennent donc un taux notable de lipopolyoside. Il n'y a pas d'escarre avec l'antigène n° 5 très pauvre en galactane et l'antigène total dilué (U. S.).

pour ne citer que les exemples les plus connus les tuberculines P. P. D. (de Seibert) et IP.48 (de Bretey et Lamensans) contiennent des polyosides et les filtrats de culture du B. C. G. contiennent une fraction protéique et une fraction polyosidique (1, 3), toutes deux douées d'activité tuberculinique et provoquant des réactions fortement positives chez les cobayes sensibilisés. Il en est de même avec les extraits de *Pasteurella pestis*, en particulier avec un complexe polyoside-polypeptide provoquant une réaction allergique spécifique chez les cobayes infectés ou immunisés (2).

Cette présence simultanée des deux composants dans les extraits protéiques de *M. mycoides* n'a donc rien d'exceptionnel et peut s'expliquer de deux façons : ou bien la floculation du complexe protéines-sulfate d'ammonium entraîne mécaniquement des molécules de polyosides et cela d'autant plus facilement que ces dernières sont constituées de longues chaînes et que ces polyosides sont de solubilité très précaire ; ou bien l'extraction isole un complexe plus ou moins solide protéine-lipopolyoside, tous les stades de la dissociation pouvant exister dans le produit final.

L'existence de molécules de polyosides, hap-
tènes de précipitation par excellence, nous

laisse à penser qu'un phénomène d'Arthus sera toujours associé à la réaction d'hypersensibilité retardée que pourrait déclencher éventuellement la fraction protéique vraie (en dehors de son propre rôle de précipitogène), lorsque les animaux éprouvés auront un taux suffisant de précipitines sériques.

Par ailleurs, le galactane seul injecté par la voie intradermique possède une action irritante propre comme de nombreux autres polyosides qui, pour cette propriété, sont justement employés comme adjuvants de l'immunité ; il s'ensuit qu'un épaissement de la peau sans aucune signification d'ordre allergique s'observe chez les lapins et les cobayes neufs dans les heures qui suivent l'injection. Il est vrai que cette « réaction » ne tient pas et qu'au bout de 24 heures elle a disparu, mais elle s'ajoute à la réaction d'hypersensibilité et il est nécessaire de la connaître.

La mise en évidence et l'utilisation d'une réaction d'hypersensibilité retardée exige donc la préparation préalable d'un antigène protéique pur, par une méthode qui reste à mettre au point.

CONCLUSIONS

L'extraction, par la lyse aux ultrasons et les précipitations au sulfate d'ammonium à demi-saturation, de la fraction protéique de *M. mycoides*, aboutit à l'obtention d'un antigène toujours contaminé, à un degré variable et quelquefois très important, par le lipopolysaccharide spécifique (galactane).

Chez les animaux de laboratoire sensibilisés artificiellement aux antigènes de *M. mycoides* à l'aide des adjuvants de Freund, l'hypersensibilité que l'on peut révéler par les tests cutanés, en employant cet antigène, est pour l'essentiel une

allergie de type Arthus, associée probablement à une allergie locale immédiate de type anaphylactique.

Ce phénomène d'Arthus est provoqué aussi bien par la fraction protéique que la fraction polysaccharidique ; il semble d'autant plus intense que la concentration d'antigène en galactane est plus élevée.

L'existence d'une réaction d'hypersensibilité retardée apparaît difficile à mettre en évidence étant donné que la réaction d'hypersensibilité rapide se prolonge dans le temps et peut donc masquer l'apparition de la première.

SUMMARY

The allergy test and the diagnosis of bovine pleuropneumonia.

I. Comments on the extraction of the antigen and experimental study on laboratory animals

The protein antigen, used in the allergic tests and prepared according the technique of R. N. GOURLAY (lysis by ultrasonic treatment and precipitation by ammonium sulphate) is all the time more and less contaminated by the specific lipopolysaccharide of *Mycoplasma mycoides*.

Rabbits and guinea-pigs artificially sensitized by injection of the mixture : Mycoplasma + Freund adjuvant showed an Arthus phenomenon after they had been inoculated intradermally with the protein antigen ; this response seemed to be caused by the genuine protein fraction as well as by the lipopolysaccharide fraction.

The nature of this hypersensitivity has been confirmed by the action of heparine on the cutaneous reactions and by the possibility of passive transfer of this allergy to an unsensitized animal.

The evidence of a delayed hypersensitivity in laboratory animals still remains difficult ; for that purpose the preparation of a pure protein antigen is needed.

RESUMEN

La prueba de alergia y el diagnóstico de la perineumonía bovina.

I. Comentarios sobre la extracción del antígeno y estudio experimental con animales de laboratorio

El antígeno proteico utilizado para las pruebas de alergia y preparado mediante el método de R. N. GOURLAY (lisis por los ultrason y precipitación por el sulfato de amonio) es siempre más o menos infectado por el antígeno lipopoliosídico de *Mycoplasma mycoides*.

En los conejos y los cobayos sensibilizados artificialmente por la inyección de la mezcla : micoplasmas-adyuvante de Freund se encuentra un fenómeno de Arthus. Luego de las inyecciones intradérmicas del antígeno proteico.

A lo que parece, la fracción proteica verdadera tan como la fracción lipopoliosídica es causa de este fenómeno.

La acción de la heparina sobre las reacciones cutáneas y la posibilidad de la transmisión pasiva de esta alergia a un animal indemne confirma la origen de esta hipersensibilidad. La demostración de una hipersensibilidad de tipo retardada en los animales de laboratorio queda difícil. Necesita la preparación de un antígeno proteico puro.