

Contribution à l'étude de l'hémosensitine de "Mycobacterium tuberculosis"

Autor(en): **Schenk, Cécile**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **12 (1958-1961)**

Heft 1

PDF erstellt am: **10.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-257910>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

**Contribution à l'étude de l'hémosensitine
de „Mycobacterium tuberculosis“**

PAR

CÉCILE SCHENK

AVANT-PROPOS

L'intérêt qu'a soulevé la tuberculose depuis la découverte de KOCH (1) est aujourd'hui encore loin de se relâcher. Nous n'en voulons pour preuve que la multitude des publications et le nombre imposant de réunions scientifiques ou symposiums qui lui sont consacrés. Le besoin d'approfondir les connaissances sur sa pathogénie et sur les facteurs déterminant l'immunité, de comprendre le mode d'action des substances chimiothérapeutiques et des antibiotiques, de synthétiser de nouvelles combinaisons médicamenteuses, a engagé les microbiologistes, les sérologistes et les biochimistes à orienter leurs travaux sur les structures chimiques et antigéniques des Mycobactéries.

L'hémagglutination conditionnée est la dernière en date des réactions sérologiques proposées pour le diagnostic de la tuberculose. Si elle s'est avérée sur le plan clinique dénuée d'intérêt, elle suscite sur le plan expérimental certains problèmes qui relèvent de la biologie générale des antigènes hémosensibilisants. La sensibilisation des érythrocytes par des extraits tuberculeux sérologiquement actifs n'étant pas un phénomène constant, nous nous sommes attachée à vérifier les extraits en fonction de l'âge des cultures, du mode d'extraction et de leur faculté de répondre à certains procédés d'activation.

Je tiens à exprimer au professeur A. Grumbach qui a assumé la direction de ce travail mes remerciements et ma gratitude pour les facilités et la bienveillance qu'il m'a accordées.

Mes remerciements tout particuliers vont à Mlle A. Rivkin, docteur en médecine, qui m'a conseillée, aidée et encouragée tout au long de ce travail.

INTRODUCTION

Il nous paraît important de rappeler ici le développement historique des différentes réactions sérologiques de la tuberculose avec leurs succès partiels et leurs échecs nombreux, ne serait-ce que pour démontrer l'intérêt d'une réaction qui serait douée d'une stricte spécificité. Les données les plus récentes sur la structure antigénique des Mycobactéries lui ouvrent peut-être la voie.

I. Réactions sérologiques de la tuberculose.

A. FIXATION DU COMPLÉMENT.

En 1901, BORDET et GENGOU (2) découvrent que la fixation du complément sur des bactéries sensibilisées par un antiserum homologue est décelable par l'intermédiaire d'un système hémolytique constitué par des globules rouges sensibilisés. En appliquant cette réaction au diagnostic de la tuberculose, WIDAL et LE SOURD (3) mettent en évidence des sensibilisatrices spécifiques dans le sérum des malades tuberculeux. Tandis qu'ils utilisent comme antigène une suspension de bacilles tuberculeux homogénéisés selon la méthode d'ARLOING et COURMONET (4), CAMUS et PAGNIEZ (5) aboutissent aux mêmes conclusions en se servant de tuberculine. Par la même méthode, BORDET et GENGOU (6) démontrent la présence d'anticorps antituberculeux dans le sérum des cobayes inoculés avec des Mycobactéries aviaires; ces anticorps qui réagissent avec tous les types de Mycobactéries sont dits polyvalents.

WASSERMANN et BRUCK (7) trouvent en 1906 des sensibilisatrices dans le sérum des sujets tuberculeux traités par de la tuberculine. Ces sensibilisatrices sont assimilées par les auteurs à des antituberculines; elles ne sont pas spécifiques. Ces antituberculines ne se rencontreraient pas chez les tuberculeux non traités. Les résultats que MORGENROTH et RABINOWITCH (8) fournissent en 1907 sont différents. Le sérum des tuberculeux traités par la tuberculine ne fixe pas le complément en présence d'un antigène mycobactérien, et ROLLY (9) constate bientôt que certains sérums de contrôle (syphilitiques, typhiques) donnent des réactions aussi positives que les sérums de tuberculeux. En 1909, HANNE (10) rassemble dans sa thèse les résultats des principaux travaux effectués jusqu'alors, et qui se résumant dans le tableau suivant.

Sujets	Sérums nombres examinés	Réactions	
		+	%
Tuberculeux	106	74	70
Sains	44	9	20
Tuberculeux traités à la tuberculine	33	23	70

Les divergences de résultats révélées par cette première série de travaux étaient loin d'être encourageantes. Il est vrai que les antigènes utilisés alors étaient des préparations d'activité variable et que la méthode d'expérimentation n'est jamais bien précisée. Ce n'est qu'avec les recherches de CALMETTE et MASSOL (11) que quelques années plus tard les réactions de fixation du complément entrent dans le cadre de l'application pratique. Ces auteurs proposent une technique rigoureuse, utilisée encore actuellement, qui consiste dans l'emploi d'une quantité constante de sérum et d'antigène en présence de doses croissantes de complément. Leur antigène est préparé à partir du filtrat d'une macération de bacilles tuberculeux dans une solution de peptone Witte à 10 %.

Les publications de CALMETTE et MASSOL (11) ont dirigé l'intérêt des expérimentateurs sur l'antigène que l'on cherche à rendre plus sensible et plus spécifique, et dès 1921 on tente d'isoler des fractions actives. La tuberculine brute est assez rapidement abandonnée, car elle fixe trop souvent le complément avec des sérums normaux. On recourt aux suspensions bacillaires soumises ou non à un traitement. CORPER (12), BESREDKA (13), PETROFF (14), WILSON (15), COOKE (16), WADSWORTH et MALTANER (17) abandonnent l'émulsion bacillaire simple et préconisent respectivement l'autolysat de suspensions bacillaires (12, 13, 14), des extraits glycerinés, des suspensions de bacilles traités par l'alcool (15), ou encore le dialysat d'extraits aqueux de corps microbiens (17). « L'antigène méthylique », utilisé en France aujourd'hui encore dans la réaction de fixation du complément, est proposé par BOQUET et NÈGRE (18) en 1920. Il résulte d'une extraction par l'alcool méthylique de bacilles tuberculeux autoclavés pendant 30 minutes à 120° et traités par l'acétone.

De nombreux procédés d'extraction du bacille tuberculeux sont présentés par la suite: ils aboutissent à l'obtention d'antigènes plus ou moins satisfaisants. C'est par exemple l'antigène de WASSERMANN (19) à la tétraline-lécithine. C'est aussi l'antigène de NEUBERG et KLOPSTOCK (20) consistant en une émulsion de bacilles tubercu-

leux desséchés finement pulvérisés et reprise dans une solution de benzoate de soude à 20 % (cette solution a été ultérieurement remplacée par de l'épichlorhydrine et de l'alcool). La préparation de WITEBSKY et coll. (21) encore actuellement utilisée en Allemagne est obtenue à partir de bacilles tuberculeux desséchés soumis à une extraction alcoolique à chaud pendant 2 à 3 heures. Le résidu est ensuite traité par de la pyridine à chaud jusqu'à épuisement. Cet extrait évaporé donne un résidu qui est redissous dans l'acétone. Le résidu à nouveau évaporé, pulvérisé puis dissous dans du benzène à 1 % constitue l'antigène. Il est encore additionné de lécitine avant l'emploi. Différents auteurs ont souligné la réelle valeur de cet antigène (22).

Malgré les améliorations apportées dans la fabrication de l'antigène, la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la tuberculose chez l'homme est indiscutablement dépourvue de valeur pratique. Il ressort cependant que la réaction est positive dans 85 % à 95 % des cas de tuberculose pulmonaire, mais qu'elle l'est aussi dans 10 % des cas d'individus sains (23).

B. PRÉCIPITATION.

En 1907, BONOME (24) observe que les extraits aqueux de bacilles tuberculeux séchés et broyés précipitent en présence de sérums de malades tuberculeux. Dans une communication à l'Académie des Sciences, CALMETTE et MASSOL (25) démontrent en 1909 que les sérums de bovidés immunisés contre le bacille de Koch contiennent des précipitines contre diverses tuberculines. Mais des recherches ultérieures n'ont pas tardé à démontrer que ces phénomènes de précipitation ne sont pas spécifiques. En 1910, CALMETTE et MASSOL (26) apportent des observations complémentaires : le sérum chauffé ou non-chauffé de sujets tuberculeux est exceptionnellement précipitant au contact de solution de tuberculine, tandis que le sérum d'un animal hyperimmunisé à l'aide de mycobactéries de type bovin précipite régulièrement toute une série de tuberculines d'origine et de fabrication différentes. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux auteurs. Néanmoins, cette réaction reste intéressante pour l'étude biologique et sérologique des Mycobactéries.

En 1923, ZINSSER et PARKER (27) réussissent à extraire du bacille de Koch un haptène polysidique, capable de précipiter en présence d'un immunsérum. Quelques mois plus tard, HEIDELBERGER et AVERY (28), en publiant les résultats de leur étude biochimique des Pneumocoques, mettent en lumière l'importance des polysaccharides dans la constitution antigénique des microorganismes et l'intérêt des chercheurs se concentre alors sur cette fraction du bacille de Koch. LAID-

LAW et DUDLEY (29) par saponification des corps microbiens extraient des polysaccharides qui sont précipitables par des immunosérums. HEIDELBERGER et MENZEL (30) isolent deux polysaccharides actifs qui, à une dilution de 1 : 50 000, sont précipités par un immunosérum de cheval. Ils obtiennent leurs polyosides par un fractionnement extrêmement poussé de l'extrait, tout en évitant l'emploi d'alcalis, de chaleur ainsi que d'acides minéraux. Depuis lors, leur méthode a été reprise par de nombreux auteurs pour la préparation de polysaccharides. KARJALA et HEIDELBERGER (31), HAWORTH et coll. (32), KENT et STACEY (33), ainsi que KENT (34) ont préparé de nombreuses fractions polyosidiques, étudié leur structure et testé leur activité sérologique par la méthode de précipitation. Un grand nombre de ces fractions polyosidiques sont précipitées, même à de fortes dilutions, par l'immunosérum de cheval ou de lapin. KENT et STACEY (33) se servent de l'action solubilisante de l'urée et de la β -hydroxypropionamide sur les parois cellulaires pour préparer un complexe lipo-polysaccharide, sérologiquement très actif.

Les propriétés précipitantes des tuberculo-protéines sont étudiées pour la première fois par SEIBERT (35). En injectant à des cobayes et à des lapins des protéines de *Mycobacterium tuberculosis*, elle obtient des précipitines contre les protéines qui ont servi à l'immunisation. Les protéines sont préparées par précipitation à l'aide de sulfate d'ammonium à partir de tuberculine. Elles contiennent encore des traces de polyosides. Les sérums de lapins tuberculeux présentent des titres précipitants très élevés contre ces tuberculo-protéines. Mais l'espoir de pouvoir utiliser ce test dans la tuberculose spontanée de l'homme ou des bovidés ne s'est pas réalisé. Sur 51 sérums tuberculeux testés par SEIBERT (35), six seulement contenaient des précipitines.

C. AGGLUTINATION.

Les premières recherches sur le pouvoir agglutinant du sérum de tuberculeux contre les mycobactéries sont dues à ARLOING (36), ainsi qu'à ARLOING et COURMONT (4). L'agglutination spontanée des Mycobactéries, qui rend l'exécution du test difficile et son interprétation délicate, est due à leur haute teneur en lipides (40 % du poids sec). Cette constitution confère à la surface des Mycobactéries des propriétés hydrophobes et empêche la dispersion homogène des microbes dans un milieu aqueux. Des méthodes devaient nécessairement être proposées pour parer aux inconvénients de l'agglutination spontanée. ARLOING (36) s'est servi de cultures dites homogènes, obtenues par agitation continue. FORNET (37) traite des bacilles de Koch à la vapeur d'éther sulfurique à 40° pour les débarrasser de leurs lipides. CALMETTE (33) se sert du pouvoir dispersant de la bile de bœuf.

Les nombreux auteurs qui se sont servis de ces suspensions dites stables, ont observé des agglutinines dans les sérums et les diverses humeurs des tuberculeux (crachats, épanchements pleurétiques et méningés). Mais le défaut de non-spécificité entache la séro-agglutination et met en question son intérêt pratique. D'une part, le sérum normal d'un grand nombre d'espèces animales agglutine le bacille de Koch (38), et, d'autre part, les sérums d'animaux vaccinés contre un germe acido-résistant réagissent non seulement avec le bacille homologue, mais également avec tout un groupe de bacilles acido-résistants (38). De plus, un sérum non-agglutinant peut le devenir, après l'injection sous-cutanée de certains produits, comme le gáiacol ou l'eucalyptol (38). Enfin, le sérum de malades atteints de pneumonie, de fièvre typhoïde, d'érysipèle, d'ictère, de grippe, peut devenir aussi agglutinant pour le bacille et cesser de l'être pendant ou après la convalescence.

Les auteurs qui ont méthodiquement étudié des sérums de sujets sains, rapportent jusqu'à 50 % de réactions positives, de sorte que la recherche d'agglutinines dans le sérum de malade perd toute valeur clinique (38). La séro-agglutination des Mycobactéries ne trouve donc pas sa place dans les examens de la tuberculose.

D. HÉMAGGLUTINATION ET HÉMOLYSE CONDITIONNÉES.

En 1947, KOEGH et coll. (39) observent que les hématies de différentes espèces d'animaux traitées par l'extrait salin d'une culture de *Haemophilus influenzae* sont agglutinées par l'immunsérum antibactérien homologue. Ils rapportent ultérieurement que des extraits salins de Méningocoques, de Staphylocoques et de Salmonelles sont aussi capables de sensibiliser des hématies à l'action agglutinante des immunsérums respectifs.

L'extraction saline quelque peu grossière a été par la suite abandonnée au profit de l'extraction de la substance « hémossensibilisante » effectuée selon la technique proposée par PALMER et GERLOUGH (40) pour la préparation des antigènes polysidiques des Salmonelles : à savoir par le traitement au phénol à 90 % ; à cette concentration, le phénol solubilise un grand nombre de protéines, tandis que la plupart des polysaccharides y sont insolubles.

En 1948, les travaux de MIDDLEBROOK et DUBOS (41) démontrent que les extraits aqueux obtenus à partir de bacilles tuberculeux traités par le phénol à 90 %, ainsi que certaines préparations de vieille tuberculine, contiennent des principes hémossensibilisants spécifiques : c'est-à-dire que des hématies sensibilisées par de tels extraits sont spécifiquement agglutinées par les sérums inactivés contenant des anticorps homologues. En présence de complément, l'hémagglutination

fait place à un phénomène d'hémolyse (42). Ils proposent pour la mise en évidence des anticorps spécifiques cette réaction d'hémagglutination, dont le titre permettrait d'affirmer ou d'infirmer l'existence de lésions tuberculeuses actives.

La technique de la réaction de MIDDLEBROOK-DUBOS est parfaitement mise au point et d'exécution facile. Cependant des modifications ont été proposées pour conférer au test une plus grande spécificité ; notamment : l'emploi de globules rouges humains du groupe 0 (43), l'absorption du sérum avant l'emploi par des Mycobactéries hétérologues (44), le traitement des globules rouges par la papaine (45), une technique sur lame (46), une méthode capillaire (47), une méthode de conglutination (48, 49).

Depuis 1948, des milliers de sérums de sujets tuberculeux, d'enfants et d'adultes sains, d'individus vaccinés avec le BCG, ont été étudiés à l'aide du test de MIDDLEBROOK-DUBOS (50, 51, 52). Les avis favorables émis par les premiers expérimentateurs sur la valeur du test pour la clinique (43, 50) ne se sont malheureusement pas confirmés. SCHIFF (53), analysant les nombreux travaux parus sur l'utilité clinique du test d'hémagglutination, prouve que les résultats sont aussi divergents et aussi contradictoires que l'étaient ceux de la fixation du complément.

Les résultats favorables se limitent à des cas dont le diagnostic clinique ne présente aucune difficulté. D'après GERNEZ-RIEUX et TACQUET (52), la réaction d'hémagglutination chez l'enfant paraît être plus spécifique que chez l'adulte : chez les sujets non tuberculeux, l'hémagglutination est négative dans 95,7 % des cas, chez les sujets tuberculeux elle est positive dans 96,9 % des cas. Le titre liminaire de positivité est de 1/8. Etudiant la valeur de la réaction en vue du pronostic, ces auteurs concluent que la réaction d'hémagglutination ne permet pas d'apprécier l'évolution d'une tuberculose, ni de formuler un pronostic. Très décevant est aussi le fait que, contrairement à ce qui est observé chez l'animal, la vaccination au BCG ne détermine chez l'homme que des modifications inconstantes du titre d'hémagglutination, quelle que soit la voie choisie pour la vaccination (52). L'application de la réaction d'hémagglutination au diagnostic de l'infection tuberculeuse se heurte donc à des risques d'erreur trop grands.

II. Données actuelles sur la structure antigénique de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'analyse chimique d'abord grossière puis servie par les méthodes d'examen les plus modernes, telles que l'électrophorèse et l'ultracentrifugation, a permis d'identifier un certain nombre de constituants protéiniques, polysaccharidiques, lipidiques ou complexes que la sérologie expérimentale et l'épreuve sur l'animal sain et l'animal infecté ont définis comme actifs ou inactifs.

Certains constituants des Mycobactéries injectés à l'animal incitent la formation d'anticorps qui se laissent révéler par les différentes méthodes déjà signalées. Leur fonction antigénique étant ainsi démontrée, un grand nombre de travaux ont pu être consacrés à leur comportement biologique et à leur structure chimique. Les substances isolées sont parfois pures, mais le plus souvent il s'agit de formations complexes difficiles à dissocier. Par souci de clarté, nous traiterons cependant séparément les divers types d'antigènes selon l'élément constitutif principal, en réservant arbitrairement une place spéciale aux hémosenes.

A. POLYSACCHARIDES.

Des polysaccharides ont été extraits des milieux de culture, des bacilles dégraissés et des fractions lipidiques ; mais le nombre de polysaccharides que le bacille tuberculeux est capable de synthétiser n'est pas déterminé (54). STACEY (55) a isolé à partir de germes et de filtrats de cultures huit polysaccharides de structures différentes, partiellement combinés avec des lipides, des acides nucléiques ou des protéines cellulaires (56, 57). BOYDEN et SORKIN (54) restreignent leur nombre à trois, mais n'excluent pas la possibilité que les Mycobactéries en puissent fabriquer un plus grand nombre. La diversité des monosaccharides, isolés autant du milieu de culture que des Mycobactéries elles-mêmes, laisse entrevoir plusieurs possibilités de synthèse de polysaccharides.

Les polysaccharides mycobactériens peuvent être classés en trois groupes :

- 1) Polysaccharides préparés à partir des filtrats de cultures.
- 2) Polysaccharides préparés à partir des lipides.
- 3) Polysaccharides préparés à partir des germes dégraissés.

1) *Polysaccharides préparés à partir des filtrats de cultures.*

Les travaux de SEIBERT et coll. (58, 59) ont révélé dans les filtrats de cultures l'existence de deux polysaccharides différents, soit le polysaccharide I et le polysaccharide II.

a) *Le polysaccharide I* a été isolé selon différentes méthodes, soit: par l'électrophorèse, par la méthode chimique de RENFREW (60), par l'ultrafiltration fractionnée ou par la chromatographie. Les fractions obtenues par ces divers procédés se ressemblent sensiblement autant par leur diagramme électrophorétique que par leur comportement sérologique.

Le polysaccharide I contient du mannose, du galactose et de l'arabinose. L'azote protéinique n'a pas pu en être complètement éliminé, même après huit purifications électrophorétiques (61). Le poids moléculaire déterminé au moyen de l'ultracentrifuge est de 9000 d'après SEIBERT et coll. (58), de 7000 d'après TENNENT et WATSON (62). Le polysaccharide I a les propriétés d'un haptène selon SEIBERT et coll. (58). Il précipite jusqu'à de hautes dilutions en présence d'un immunsérum de lapin ou de cheval. Injecté chez l'animal, il n'induit pas la formation d'anticorps.

b) *Le polysaccharide II* a été préparé par ultrafiltration ainsi que par fractionnement alcoolique. Les analyses effectuées par KENT (34) ont démontré que le glucose en est le principal constituant ; en outre de la glucosamine et des lipides (8 %) sont apparus après saponification. Le pouvoir rotatoire α_D est de +165. Le poids moléculaire déterminé par ultracentrifugation est très élevé ; il a été estimé à environ 500 000 (34).

Le polysaccharide II injecté au lapin et au cheval suscite la production d'anticorps spécifiques décelables par précipitation ; ces anticorps ne confèrent toutefois aucune immunité à l'animal. Le polysaccharide II précipite avec des sérums antituberculeux et anti-BCG (cheval et lapin).

2) *Polysaccharides préparés à partir des lipides.*

La présence de polysaccharides dans les complexes lipidiques est connue depuis les travaux d'ANDERSON (63, 64). Les polysaccharides se trouvent associés aux lipides par estérification. On les trouve liés aux quatre fractions de lipides différenciées par ANDERSON (voir p. 12, sous lipides).

Les polysaccharides obtenus après saponification d'un lipopolysaccharide extrait à l'aide de chloroforme (64), d'un lipide fortement lié (65) ainsi que du « lipid bound polysaccharide » de HAWORTH et coll. (66), sont apparentés par leur constitution monosaccharidique au polysaccharide I. Ils sont précipités par l'immunsérum de lapin, tandis que les polysides obtenus à partir des lipides solubles dans l'acétone et des phosphatides ne possèdent plus d'activité sérologique.

3) *Polysaccharides préparés à partir des germes dégraissés.*

La préparation des polysaccharides obtenus à partir des germes mêmes est rapportée dans la rubrique « précipitation » (p. 4). Les cellules dégraissées sont riches en polysides probablement dérivés des acides nucléiques. STACEY et KENT (56), dans leur exposé des propriétés physico-chimiques des polysaccharides d'origine somatique préparés par divers auteurs, signalent que la plupart de ces polysides sont caractérisés par un pouvoir rotatoire α_D relativement élevé.

Les discordances dans les résultats d'analyse des fractions polysidiques, obtenues par les différents auteurs, sont probablement dues au choix des méthodes, aux souches et aux milieux utilisés. Il est à remarquer, cependant, que les propriétés chimiques et sérologiques de ces fractions sont très proches de celles du polysaccharide I de SEIBERT.

HEIDELBERGER et MENZEL (30) admettent que les polysaccharides mycobactériens se différencient du point de vue antigénique en deux groupes : opinion contredite par ILAND et PEACOCK (67) qui leur trouvent lors des épreuves d'absorption une communauté antigénique totale.

Aucune des préparations polysidiques n'a montré une spécificité du type.

B. PROTÉINES.

Le phénomène de KOCH (68) a attiré très tôt l'attention des chercheurs sur les fractions protéiniques des filtrats de cultures, ainsi que sur les protéines extraites des germes dégraissés. L'activité biologique des protéines est testée, soit par la réaction de fixation du complément, soit par leur pouvoir de déclencher la réaction tuberculinique chez un sujet sensibilisé, soit encore par hémagglutination après tannage des érythrocytes.

1) *Antigènes protéiniques isolés des filtrats de cultures.*

L'électrophorèse, la précipitation par le sulfate d'ammonium et l'alcool à basse température à des pH et des concentrations variés ont permis à SEIBERT et coll. (58) d'isoler d'un milieu de culture non chauffé 3 groupes de protéines, soit les protéines A, B, C.

a) *Les protéines A* constituent un groupe de protéines apparentées. Elles sont précipitées du pH 4 au pH 6 par l'alcool à 70 %. Leur poids moléculaire est compris entre 32 000 et 44 000. Elles migrent le plus lentement dans le champ électrophorétique (tampon phosphaté pH = 7,6 ; $\mu = 0,1$). Elles provoquent chez l'animal immunisé la plus forte activité tuberculinique et incitent la formation d'an-

ticorps chez l'animal sain. Il est extrêmement difficile d'en écarter les hydrates de carbone qui sont probablement responsables de la précipitation obtenue avec les sérums d'animaux préparés avec les protéines A.

b) *Les protéines B* sont précipitées au pH 4 par l'alcool à 30 %. Leur poids moléculaire est de 16 000. Leur vitesse électrophorétique (tampon phosphaté pH = 7,6 ; $\mu = 0,1$) est intermédiaire entre celles des protéines A et C. La réaction tuberculinique qu'elles provoquent est moins forte que celle des protéines A ou des préparations de tuberculine PPDs (Purified Protein Derivative SEIBERT).

c) *Les protéines C* précipitent spontanément au pH 4. Leur poids moléculaire est plus élevé que celui des protéines A. Dans le champ électrophorétique (tampon phosphaté pH = 7,6 ; $\mu = 0,1$) elles sont plus mobiles que les deux autres groupes de protéines. Les réactions allergiques dues aux protéines C sont les plus faibles, par contre, elles sont de bons antigènes pour la fixation du complément.

SEIBERT et coll. (69) sont parvenus par la suite à purifier leurs préparations jusqu'à un degré d'homogénéité électrophorétique presque complète. Cette purification a révélé de nouvelles fractions à mobilité électrophorétique très faible, constituées par des protéines liées à des polysaccharides, auxquelles les auteurs réservent la dénomination de « glyco-protéines ».

Travaillant également sur des milieux de culture non chauffés, BOYDEN et SORKIN (70) ont isolé par fractionnement alcoolique quatre fractions protéiniques actives, qu'ils ont étudiées sérologiquement à l'aide de l'hémagglutination conditionnée d'érythrocytes tannés. Deux de ces fractions semblent correspondre aux protéines A et B de SEIBERT, tandis que les deux autres ne sont pas encore identifiées.

2) *Antigènes protéiniques isolés des germes dégraissés.*

De nombreuses tentatives ont été effectuées pour préparer des antigènes protéiniques peu dégradés. HEIDELBERGER et MENZEL (71), HECKLY et WATSON (72) et STACEY et coll. (73) ont isolé des protéines capables d'inciter la réaction tuberculinique. Mais les préparations connues jusqu'ici sont des mélanges de protéines qui renferment en outre encore au moins 5 % de polysaccharides.

C. LIPIDES.

L'importance biologique des fractions lipidiques est révélée par les travaux de CHOUCROUN (74), BLOCH (75), RAFFEL (80), RAFFEL et coll. (81). Par contre, l'immunologie des lipides du bacille de Koch est encore vague. Leur activité sérologique a été généralement testée à l'aide de la fixation du complément.

La constitution des lipides varie quantitativement et qualitativement avec la composition du milieu et l'âge de la culture. En 1927, ANDERSON (76) met au point une méthode de séparation des lipides du bacille tuberculeux en quatre groupes distincts, soit :

- 1) les lipides solubles dans l'acétone,
- 2) les phosphatides,
- 3) les cires,
- 4) les lipides fortement liés.

1) *Les lipides solubles dans l'acétone.*

Ils constituent 2 à 11 % du poids sec des germes. Ce sont surtout des esters d'acides gras et de disaccharides non réducteurs. Ces lipides sont sérologiquement inactifs.

2) *Les phosphatides.*

Solubles dans la plupart des solvants organiques, ils sont insolubles dans l'acétone. Le traitement par l'acétone à chaud permet de séparer deux fractions, à savoir : les phosphatides vrais et les cires.

Les phosphatides qu'ANDERSON a préparés par précipitation avec de l'acétone à froid contiennent de l'azote et des polysaccharides. Ils sont doués d'activité antigénique. L'antigène méthylique de BOQUET et NÈGRE (18) doit probablement son activité antigénique à la présence de phosphatides. NÈGRE (77) ainsi que WEISS et DUBOS (78) lui attribuent même un certain pouvoir protecteur chez la souris contre l'infection tuberculeuse expérimentale. On ignore toutefois encore lesquels des groupes déterminants polysaccharidiques ou lipidiques sont responsables de l'activité antigénique. Il faut mentionner ici que SABIN et coll. (79) ont montré en 1930 que l'injection de phosphatides extraits de *Mycobacterium tuberculosis* incite la formation de tubercules chez l'animal.

3) *Les cires.*

Elles représentent environ 12 % du poids sec des bacilles. Les cires sont constituées par des mélanges d'esters d'acides gras dont le plus important est l'acide mycolique, de glycérol, de phtiocérol et de polysaccharides.

RAFFEL (80) et RAFFEL et coll. (81) ont mis en lumière le rôle que jouent les cires dans l'établissement de l'hypersensibilité retardée.

4) *Les lipides fortement liés.*

Ce sont des complexes lipopolysaccharidiques, de poids moléculaire élevé, qui ont spécialement été étudiés par HAWORTH et coll. (32). Ils leur accordent une activité sérologique (haptène) sans parvenir

à déterminer la part de cette activité qui pourrait revenir au groupe polysidique.

Le « cord factor » doit être mentionné dans ce chapitre. Cette fraction lipopolysaccharidique se retrouve dans les cires. BLOCH (75) l'a isolée pour la première fois par l'extraction à l'éther de pétrole de mycobactéries vivantes et jeunes. Elle est toxique pour la souris après la seconde injection et possède la propriété d'inhiber la migration de leucocytes.

D. HÉMOSENSITINES.

La propriété de certains antigènes de se fixer sur les hématies et de les rendre agglutinables par un antisérum homologue inactivé ou hémolysables lors de l'adjonction de complément, a permis de réaliser des progrès dans l'étude des anticorps antituberculeux, mais elle a aussi rendu plus apparente la complexité du système antigène-anticorps.

Un grand nombre d'extraits bactériens contiennent des produits capables de se fixer sur les érythrocytes et par là de les sensibiliser à l'action d'un sérum qui renferme des anticorps contre ces substances bactériennes. BOYDEN (82) a proposé de les appeler hémosensitines. Une hémosensitine mycobactérienne a été isolée pour la première fois par MIDDLEBROOK et DUBOS (41) à partir des corps microbiens des différents types de bacilles tuberculeux, puis à partir de diverses tuberculines.

On admet actuellement que la plupart des hémosensitines bactériennes sont des polyosides simples ou complexes. LANDY (83) parle de lipopolysaccharides pour *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *Pasteurella tularensis*, d'acides polymères (polysaccharides) pour *Diplococcus pneumoniae* et *Escherichia coli*.

La structure chimique exacte des antigènes intéressés dans la réaction de MIDDLEBROOK-DUBOS et le mécanisme précis de leur fixation sur les érythrocytes sont encore mal connus. On distingue cependant deux types d'hémosensitines tuberculeuses :

- 1) l'hémosensitine polysaccharidique,
- 2) l'hémosensitine protéinique.

L'affinité pour les globules rouges de la première est immédiate, celle de la seconde implique un traitement préalable des hématies par l'acide tannique.

1) L'hémosensitine polysaccharidique.

SORKIN (84) a isolé d'un milieu de culture de *Mycobacterium tuberculosis* un polysaccharide doué de propriétés hémosensibilisantes qui s'apparente par son poids moléculaire et par sa structure chi-

mique au polysaccharide I décrit par SEIBERT et WATSON (61). Toutefois le polysaccharide I de SEIBERT, de même qu'un grand nombre de préparations polyosidiques obtenues par différents auteurs (61, 63, 66, 85), ne sensibilisent pas les hématies. La tuberculine PPD (de WEYDBRIDGE et COPENHAGUE) est hémosensibilisante, celle de SEIBERT (PPDs), bien que contenant une quantité équivalente de polysaccharides, ne l'est pas.

Le mode de fixation de l'hémosensitine est étudié par BOYDEN et GRABAR (86) pour les mycobactéries, par NETER et coll. (87) pour *Escherichia coli*. Se basant sur les observations qu'un extrait lipidique neutralise le pouvoir de fixation d'une hémosensitine, ils supposent que les récepteurs érythrocytaires de l'hémosensitine sont de nature lipidique et que ce sont des lécithines et des céphalines. Selon SORKIN (88), l'hémosensitine contient de l'acide mycolique qui serait responsable de la fixation sur les récepteurs de l'hématie. Plusieurs antigènes bactériens peuvent se fixer simultanément sur les mêmes globules rouges, sans gêner pour autant l'hémagglutination conditionnée par les sérums homologues respectifs. Le virus de l'influenza et les hémagglutinines vaccinales agglutinent encore les érythrocytes chargés d'hémosensitines.

Il faut environ 1 γ d'hémosensitine très purifiée (ST Pasteur) pour rendre agglutinable par un sérum homologue à un titre hémagglutinant maximum 2 ml d'une suspension d'hématies à 1 %. STAUB (89) calcule qu'il faut 1000 molécules d'hémosensitine pour sensibiliser une hématie. HEIN (90) a tenté en vain d'observer à l'aide du microscope électronique une transformation éventuelle de la surface des hématies survenant lors de la sensibilisation. La fixation de cette hémosensitine sur les érythrocytes est favorisée par une température de 37°. Le pH est sans influence sur la réaction ; par contre les électrolytes lui sont indispensables. Le phénomène ne se produit pas dans une solution de glucose à 15 % ; l'adjonction ultérieure de NaCl ou de CaCl₂ le rétablit (91).

Les hémosensitines utilisées par la plupart des auteurs sont des préparations très grossières. L'hémosensitine la plus purifiée est préparée selon la technique de LAMENSANS et coll. (92) par l'Institut Pasteur de Paris. Cette hémosensitine « ST Pasteur » ne contient que 0,42 % d'azote.

La séparation de l'hémosensitine par électrophorèse n'a pas encore été possible, car le produit d'éluion des diagrammes a toujours provoqué une hémolyse (93). L'hémosensitine des mycobactéries est insoluble dans le phénol à 88 %, l'acétone, l'éthanol à 70 % au pH 5, et l'acide salicylique. Elle est soluble dans la formamide et l'éthanol à 47 %. Les températures très élevées ne l'altèrent pas, par contre

le traitement par NaOH n/33 pendant 1 heure à 56° supprime son pouvoir hémossensibilisant.

Le test de l'inhibition de l'hémagglutination par neutralisation des anticorps a permis de différencier deux produits antigéniquement identiques : l'un capable de sensibiliser les hématies et de fixer les anticorps, l'autre non sensibilisateur ne pouvant se lier qu'avec les anticorps correspondants. MIDDLEBROOK (94) observe qu'une tuberculine épuisée par des érythrocytes de sa fraction hémossensibilisante ne modifie pas le taux-limite inhibiteur. A la lumière de notre travail expérimental, nous essaierons de fournir une interprétation de ce phénomène.

Récemment, BOYDEN et SORKIN (70) ont isolé d'un milieu de culture non chauffé une seconde hémossensitine, qu'il ont dénommée hémossensitine β . Celle-ci se distinguerait de l'hémossensitine connue (hémossensitine α) par sa thermosensibilité et par la différence des anticorps induits ; ceux-ci ne se trouveraient d'ailleurs que chez le lapin. La nature de cette hémossensitine β est inconnue.

Les hémossensitines provenant de différentes souches de mycobactéries n'ont jamais présenté une spécificité du type.

2) L'hémossensitine protéinique.

BOYDEN (95), en 1951, constate que les hématies traitées par l'acide tannique et mises en présence d'une préparation de vieille tuberculine, en adsorbent une hémossensitine, que le test d'inhibition par neutralisation des anticorps révèle distincte de l'hémossensitine polysaccharidique. Les immunosérums tuberculeux, préalablement épuisés par l'hémossensitine polysaccharidique, ne perdent pas leur pouvoir agglutinant vis-à-vis d'érythrocytes tannés et sensibilisés à l'aide de la vieille tuberculine. L'adjonction de tuberculo-protéine à un sérum antituberculeux inhibe cette réaction. A la suite de ces résultats, BOYDEN suppose que cet antigène est de nature protéinique.

La structure chimique, le rôle biologique, ainsi que le mode de fixation de l'hémossensitine protéinique sont encore inconnus. On sait simplement que la fixation de l'hémossensitine protéinique sur les hématies tannées est immédiate, et que la température ne l'influence pas. Ces propriétés permettent une adsorption sélective des deux hémossensitines à partir d'une préparation de vieille tuberculine.

Plusieurs fractions protéiniques à propriétés hémossensibilisantes ont été isolées par BOYDEN et SORKIN (70) à partir de milieux de culture ; leur parenté avec les protéines A, B, C de SEIBERT n'a pas encore été étudiée.

Le tableau suivant résume les caractéristiques des hémossensitines polysaccharidiques et protéiniques.

Caractères distinctifs des hémosensitines de
Mycobacterium tuberculosis.

Constitution chimique	Temps nécessaire à la fixation	Température optimale de fixation	Inhibition de l'hémagglutination par	
			protéine	polysaccharide
Poly-saccharide	90 min.	37°	—	+
Protéine	très court	indifférente	+	—

+ = inhibition de l'hémagglutination.
— = pas d'inhibition de l'hémagglutination.

TRAVAUX PERSONNELS

Notre intention première fut l'élaboration d'une hémosensitine utilisable pour le diagnostic sérologique de la tuberculose, vu que les extraits préparés jusqu'ici ne pouvaient assumer cette fonction. Par le broyage mécanique des germes nous espérons pouvoir conserver l'intégrité des constituants mycobactériens. Comme nous nous sommes heurtée à l'irrégularité de l'apparition des hémosensitines, nous nous sommes arrêtée à définir les conditions exactes de leur préparation et la nature des fractions non sensibilisantes, mais inhibitrices.

I. Matériel et méthodes.

Souche : BCG, Paris 888, cultivé en ballons à fond plat (diam. 20 cm) dans 200 ml de milieu de Sautonensemencés à partir de cultures de 15 jours sur pomme de terre glycéinée. Après des laps de temps variés, les germes sont séparés du milieu par filtration sur gaze stérile. Le milieu et les germes sont conservés à 4°.

Milieu de Sauton :

Asparagine	4,00 g
Glycérine pure	60,00 ml
Acide citrique	2,00 ml
Phosphate de potassium secondaire	0,50 g
Sulfate de magnésium	0,50 g
Citrate de fer ammoniacal	0,05 g
Eau distillée	940,00 ml
pH	7,2

Solution tampon isotonique (pH 7,2) :

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	17,800 g
KH ₂ PO ₄	0,357 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

*Extraits hémossensibilisants :*1) *Méthode de MIDDLEBROOK-DUBOS (41) modifiée par FISHER (96).*

10 g (poids humide) de germes frais sont soumis à trois extractions lipidiques successives par l'acétone (agitation manuelle pendant 10 minutes). Les traces d'acétone sont éliminées par évaporation à 37°. 2,0 g de corps microbiens délipidés sont secoués dans 200 ml de phénol à 90 % (90 g phénol cristallisé + 10 ml H₂O) pendant 24 heures à 37° dans un agitateur. Cette extraction par le phénol est répétée à trois reprises sur le sédiment des germes centrifugés à 2800 t/min. pendant 15 minutes. La présence de protéines dans les extraits phénolés est chaque fois contrôlée par adjonction de 3 volumes d'alcool éthylique pour 1 volume de phénol. Le troisième extrait ne contient généralement pas de protéines précipitables par l'alcool. Le résidu bactérien délipidé et déprotéiné est lavé trois fois à l'acétone pour éliminer le phénol restant, puis l'acétone est évaporée à l'étuve (37°).

1 g de la préparation est suspendu dans 50 ml d'une solution isotonique contenant 0,55 % de NaCl, 0,5 % de Na₂HPO₄.2H₂O et 20 % de méthanol.

La suspension est agitée pendant 24 heures à 37°, puis clarifiée par filtration sur papier. La solution est opalescente, légèrement verdâtre. Elle est dialysée contre du chlorure de sodium en solution isotonique pendant 24 heures pour éliminer d'éventuelles traces de phénol.

2) *Méthode de FULLER (97).*

Délipidation de 5 g de germes frais (poids sec = 1 g) par l'acétone qui est ensuite écartée par centrifugation et évaporation à 37° pendant 24 heures. Les germes sont suspendus dans 10 ml de formamide et placés dans un bain d'huile de paraffine à 150° pendant une heure. La dissolution n'est jamais complète. Le sédiment est écarté par centrifugation (2800 t/min. pendant 15 minutes). Les protéines sont précipitées du surnageant par l'adjonction à parties égales d'alcool éthylique acidifié (95 vol. alcool 90 % + 5 vol. HCl n/10). Le surnageant, traité par 5 vol. d'acétone, fournit un précipité essentiellement polysaccharidique qui est redissous dans 3 ml d'eau distillé et reprécipité par 5 volumes d'acétone. Ce dernier précipité, séché, redissous dans 5 ml de solution isotonique (pH 7,2), contient l'hémossensitine et est utilisé pour sensibiliser les hématies.

3) *Méthode par autoclavage.*

100 mg, 500 mg, 1 g, 5 g, 10 g de germes frais sont suspendus dans de l'eau distillée à raison de 3 ml par 100 mg et autoclavés pendant 90 minutes (138°, + 2 atm.). Les fractions insolubles sont centrifugées. Le surnageant, traité par 5 vol. d'acétone, fournit un précipité qui contient l'hémossensitine. Le précipité se dépose après quelques heures à 4° ; il est récolté par centrifugation, séché à 37° pendant 24 heures et repris dans 5 ml de solution isotonique. Le matériel soluble est utilisé pour la sensibilisation des érythrocytes.

4) *Digestion enzymatique.*

Spécialement effectuée pour activer des extraits non-sensibilisants.

a) *Actinomycétine* : adjonction à 25 ml d'un extrait non-sensibilisant de 2,5 ml d'un extrait de *Streptomyces albus* préparé selon GHUYSEN (98) — pH amené à 8,0 avec NaOH n/10, indicateur = rouge de crésol — (2 heures à 50°), puis inactivation des enzymes par chauffage à 100° pendant 5 minutes.

b) *Trypsine* : adjonction à 25 ml d'un extrait non-sensibilisant de 2,5 ml de trypsine à 10 % — pH amené à 8,0 avec NaOH n/10, indicateur = rouge de crésol — (2 heures à 37°). Le ferment est ensuite inactivé par chauffage à 100° pendant 5 minutes.

5) *Extraction du milieu de culture.*

150 ml de milieu concentrés soit, 1) au bain-marie à 100° soit, 2) sous vide à 40°, dialysés deux fois pendant 30 minutes et une fois pendant 24 heures contre de l'eau physiologique. Seul le matériel en solution est utilisé et traité par 5 volumes d'acétone. Le précipité obtenu est séché pendant 24 heures à 37° et dissous dans 5 ml de solution isotonique. Les fractions insolubles sont éliminées par centrifugation.

6) *Méthode par broyage.*

Les Mycobactéries sont soumises à une désintégration mécanique dans l'appareil de MICKLE (99). Les germes à raison de 0,200 g (poids humide) sont placés dans les récipients à broyer (diam. = 2 cm, hauteur = 6 cm), contenant 1/5^e de perles (ballotini n° 12) et 2/5^e d'eau distillée. 10 heures de vibration sont généralement suffisantes pour éliminer la majeure partie des éléments acido-alcool-résistants (contrôle au Ziehl).

Le broyat ainsi que les eaux de lavage des perles sont conservés à 4°. 5 g de germes broyés fournissent environ 250 à 300 ml de suspension. La centrifugation durant deux heures à 4° à la vitesse de 3600 t/min. fait apparaître trois phases : a) une couche superficielle de lipides, b) un sédiment et c) une solution intermédiaire opalescente, qui seront traités indépendamment.

a) *La fraction lipidique* est lavée trois fois à l'eau distillée, suspendue dans de l'eau distillée et autoclavée (voir p. 17).

b) *Le sédiment* est suspendu dans de l'eau distillée, centrifugé pendant 10 minutes à 3800 t/min. pour éliminer les germes non désintégrés. Le surnageant est alors centrifugé pendant 2 heures à 3800 t/min. (100). Le nouveau sédiment formé de débris cellulaires est traité dans l'autoclave (voir p. 17).

c) *La solution opalescente* est délipidée successivement à l'éther de pétrole, à l'éther et au chloroforme, concentrée au 1/5^e sous vide à 40°, puis fractionnée par le méthanol. Le précipité obtenu après adjonction à la solution de 2 volumes de méthanol constitue notre *fraction I*. L'évaporation sous vide à 40° du surnageant fournit notre *fraction II*. 5 g de matériel humide donnent 140 à 150 mg de fraction I et 250 mg de fraction II. Chaque fraction est reprise dans 5 ml de solution tampon isotonique. Les résidus insolubles sont éliminés par centrifugation. La solubilité de la fraction I est médiocre, celle de la fraction II bonne.

Hématies de mouton :

100 ml de sang de mouton sont directement recueillis dans 125 ml de solution d'ALSEVER modifiée (52). La suspension peut être ainsi conservée 1 à 2 mois à 4°. Avant l'emploi, les érythrocytes sont centrifugés et lavés à 3 reprises dans une solution physiologique. Le culot d'hématies peut être conservé pendant 24 heures à 4°.

Solution d'Alsever modifiée :

NaCl	0,522 g
Glucose	2,332 g
Citrate de Na	1,000 g
H ₂ O bi-distillée	125,000 ml

Antisérum :

Obtenu par immunisation de lapin à l'aide de six séries de 2 injections i. v. hebdomadaires. Chaque injection est effectuée avec 1 ml de vaccin BCG, préparé à notre institut pour administration intracutanée et contenant 80 000 000 de germes par ml. Les animaux sont saignés une semaine après la dernière injection ; le sérum inactivé (30 min. à 56°) est préservé avec du mertniolate à 1/10 000. Les agglutinines naturelles anti-mouton sont absorbées à 37° à raison de 0,1 ml de culot d'hématies de mouton pour 1 ml de sérum de lapin.

Le titre hémagglutinant de l'antisérum est déterminé selon la méthode de MIDDLEBROOK-DUBOS vis-à-vis d'érythrocytes de mouton sensibilisés avec l'antigène ST de l'Institut Pasteur préparé pour la réaction d'hémagglutination conditionnée. Nos antisérums ont atteint un titre hémagglutinant de 1:1024 ; ils ont précipité l'hémosensitine « ST Pasteur » diluée 1:10.

Détermination du pouvoir hémosensibilisant des extraits :

La sensibilisation des hématies est réalisée selon la technique de MIDDLEBROOK-DUBOS. 0,1 ml de culot d'érythrocytes sont mis au bain-marie à 37° pendant deux heures en présence des extraits à tester selon les données suivantes qui correspondent à des poids de germes identiques :

Middlebrook, modifié selon Fisher	25,0 ml
Fuller	2,5 ml
Autoclave	2,5 ml
Digestion enzymatique	25,0 ml
Extraction du milieu de culture	2,5 ml
Fraction I	2,5 ml
Fraction II	2,5 ml

Les hématies ainsi modifiées sont lavées à trois reprises avec la solution tampon isotonique et suspendues dans 20 ml d'eau physiologique.

Pour la réaction d'hémagglutination conditionnée, 0,4 ml de la suspension d'hématies sensibilisées sont mélangés avec 0,4 ml des dilutions successives de sérum. Lecture après 2 heures au bain-marie à 37° et 24 heures à la température du laboratoire, effectuée, après légère agitation des tubes, par estimation de l'intensité des agglutinats érythrocytaires.

Test du pouvoir inhibiteur des extraits :

a) *Inhibition des anticorps selon la technique de MIDDLEBROOK-DUBOS.* L'extrait (0,2 ml) en dilutions successives de raison 2 est additionné de 0,2 ml de sérum dilué 1:32. Après incubation du mélange pendant 45 minutes à 37°, 0,4 ml de suspension d'hématies sensibilisées avec « l'antigène ST » sont ajoutés. La lecture se fait dans les mêmes conditions que celles du pouvoir hémossensibilisant des extraits. Le titre inhibiteur de l'hémossensitine « ST Pasteur » est de 1/32.

b) *Inhibition des érythrocytes :* Les hématies mises en contact avec l'extrait à tester sont ensuite sensibilisées par « ST Pasteur ». La sensibilisation et le test sont exécutés selon la technique de MIDDLEBROOK-DUBOS (voir p. 17).

Le terme d'inhibition est dans l'usage courant réservé aux épreuves d'absorption des anticorps et c'est dans ce sens que nous l'avons généralement employé. Lorsque l'inhibition intéresse les surfaces érythrocytaires, il en est fait mention spéciale dans le texte.

II. Résultats.

Ayant constaté que notre sérum agglutinait les érythrocytes sensibilisés avec l'antigène « ST Pasteur » jusqu'au titre de 1:1024, nous nous sommes proposé d'abord de vérifier, si notre souche de BCG était porteuse de l'hémossensitine habituelle qu'elle libérerait éventuellement dans le milieu. En nous conformant à la technique d'extraction de MIDDLEBROOK-DUBOS, nous avons pu la mettre en évidence dans les germes et observer que, toutes conditions étant égales, sa présence et son activité dépendent de l'âge de la culture (tableau 1).

TABLEAU 1.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec des extraits préparés selon MIDDLEBROOK-DUBOS à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions du sérum									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

Ce n'est donc qu'à partir de la sixième semaine que nous obtenons un antigène hémosensibilisant actif décelable avec notre sérum jusqu'au titre de 1:512. Cependant les extraits préparés à partir des cultures « jeunes » (2 à 5 semaines) ne sont pas totalement dépourvus d'activité, puisqu'ils sont capables d'absorber les anticorps correspondants et d'inhiber ainsi la réaction d'hémagglutination ST. L'activité de la fraction déterminant l'inhibition est également fonction de l'âge de la culture ; la dernière dilution inhibitrice de l'extrait étant plus élevée pour les vieilles cultures (tableau 2).

TABLEAU 2.

Inhibition de l'hémagglutination ST par des extraits préparés selon MIDDLEBROOK-DUBOS en fonction de l'âge de la culture.

Age des cultures en semaines	Titre d'hémagglutination respective	Dilutions des extraits									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
3	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
5	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
8	1:512	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+

Dilution de l'antisérum 1/32.

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

Dans la réaction de précipitation ces extraits d'emblée inhibiteurs et ne sensibilisant qu'à partir de la sixième semaine, présentent tous le même degré d'activité (voir tableau 3).

TABLEAU 3.

Fonction antigénique déterminée par précipitation d'extraits préparés selon MIDDLEBROOK-DUBOS à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions des extraits		
	1:1	1:10	1:100
2	+/+	-/+	-/-
3	+/+	-/+	-/-
8	+/+	+/+	-/-

précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.

2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits + sérum normal = pas de précipitation.

Au vu des résultats fournis par les extraits BCG d'âges différents nous avons étudié le comportement hémossensibilisant des milieux respectifs. Le liquide obtenu après filtration de la culture sur gaze a été concentré au 1/10 soit par évaporation à 40°, soit par un chauffage prolongé à 100°. L'activité hémossensibilisante des deux préparations s'est révélée très différente (tableaux 4 et 5).

TABLEAU 4.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec des milieux de cultures d'âges différents, privés de bacilles et concentrés par évaporation à 40°.

Age des milieux de cultures en semaines	Dilutions du sérum									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

TABLEAU 5.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec des milieux de cultures d'âges différents privés de bacilles et concentrés par évaporation à 100°.

Age des milieux de cultures en semaines	Dilutions du sérum									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	+	+	+	+	+	+	++	—	—
4	+	+	+	+	+	+	+	++	—	—
8	+	+	+	+	+	+	+	++	—	—

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

La comparaison des tableaux 4 et 5 fait ressortir l'importance qu'a la température dans l'apparition des facteurs responsables de l'hémagglutination. L'hémosensitine, présente dans un milieu ayant servi à la culture, peut être révélée par le chauffage à 100° dès la troisième semaine, tandis qu'elle ne se laissait extraire des germes par le procédé de MIDDLEBROOK-DUBOS à froid qu'à partir de la sixième semaine (tableau 1). Les expériences d'inhibition et de précipitation représentées dans les tableaux 6 et 7 (milieux concentrés à 37°) et les tableaux 8 et 9 (milieux concentrés à 100°) démontrent, comme c'était déjà le cas pour les extraits de MIDDLEBROOK-DUBOS, que les déterminants immuno-chimiques sont presque d'emblée présents et que leur quantité s'accroît avec le vieillissement des cultures.

TABLEAU 6.

Inhibition de l'hémagglutination ST par les milieux concentrés *in vacuo*.

Age des milieux de cultures en semaines	Titre d'hémag- glutination respective	Dilutions des extraits													
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048			
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dilution de l'antisérum 1:32.

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

TABLEAU 7.

Précipitation par un antisérum des milieux concentrés *in vacuo*.

Age des milieux de cultures en semaines	Dilutions des extraits		
	1:1	1:10	1:100
2	+/+	-/-	-/-
3	+/+	±/±	-/+
6	+/+	+/+	±/±
8	+/+	+/+	±/±

Précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits + sérum normal = pas de précipitation.

TABLEAU 8.

Inhibition de l'hémagglutination ST par les milieux concentrés à 100°.

Age des milieux de cultures en semaines	Titre d'hémag- glutination respective	Dilutions des extraits									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
3	1:128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	1:128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	1:128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

Dilution de l'antisérum 1/32.

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

TABLEAU 9.

Précipitation par un antisérum des milieux concentrés à 100°.

Age des milieux de cultures en semaines	Dilutions des extraits			
	1:1	1:10	1:100	1:1000
2	+/+	+/+	±/±	
3	+/+	+/±	±/±	
4	+/+	+/+	+/+	-/-
8	+/+	+/+	+/+	-/-

Précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.

2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits + sérum normal = pas de précipitation.

Il est vrai que les fractions qui sont précipitées peuvent être différentes des polysaccharides hémossensibilisants. Mais il est admis par un grand nombre d'auteurs que les germes entiers ne se prêtent guère à la production de sérums antiprotéiniques et nous avons pu nous assurer que le sérum absorbé par des tuberculopolysaccharides (extraits selon la méthode de FULLER) ne précipite plus les extraits dérivés du milieu.

Ayant démontré que notre souche BCG fournit une hémossensitine, nous l'avons alors recherchée dans les deux fractions solubles obtenues par le broyage des germes, soit dans la fraction I résultant de la précipitation avec 66 % de méthanol et dans la fraction II résultant de l'évaporation du surnageant.

TABLEAU 10.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec les fractions I et II issues du broyage.

Age des cultures en semaines	Fraction	Dilutions du sérum									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

Quel que soit l'âge de la culture, aucune de ces fractions n'est hémosensibilisante (tableau 10).

Pour contrôler un effet éventuel du pH dans la fixation de l'hémosen-sitine, nous avons amené les solutions des fractions I et II aux pH 6, pH 7, pH 8 et pH 9. Le résultat est resté négatif. Par contre les deux fractions, notamment la fraction I, se sont trouvées inhibitrices et cela en fonction de l'âge de la culture (tableau 11).

TABLEAU 11.

Inhibition de l'hémagglutination ST par les fractions I et II issues du broyage.

Age des cultures en semaines	Fraction	Dilutions du sérum											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
2	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	II	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dilution de l'antisérum 1/32.

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

Parallèlement au pouvoir inhibiteur élevé de la fraction I, son pouvoir précipitant est encore décelable après dilution au 1/1000.

TABLEAU 12.

Précipitation par un antisérum des fractions I et II issues du broyage.
Dilutions des extraits

Age des cultures en semaines	Fraction	Dilutions des extraits					
		1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
2	I	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
3	I	-/-	+/+	+/+	-/±	-/-	-/-
4	I	-/-	+/+	+/+	+/+	±/-	-/-
8	I	-/-	+/+	+/+	+/+	±/+	-/-
2	II	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
3	II	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	II	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
8	II	+/+	-/±	-/-	-/-	-/-	-/-

Précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.

2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits | - sérum normal ≠ pas de précipitation.

Théoriquement, l'hémossensitine se conçoit comme un porteur d'éléments sérophiles et d'éléments érythrocytophiles ; ceux-ci se fixant sur les récepteurs des hématies, ceux-là déterminant l'hémagglutination. Des expériences d'inhibition effectuées on pourrait conclure que les deux fonctions sont indépendantes l'une de l'autre, et que les groupes sérophiles apparaissent avant les groupes érythrocytophiles. S'agit-il d'une synthèse plus tardive, d'un résultat inhérent au mode d'extraction ou de la présence d'éléments inhibiteurs que POUND (101) a cru reconnaître dans certains lipides ? Cette conception l'a amené à préconiser une délipidation poussée, procédé qui n'a pas modifié nos résultats.

Sachant que toute substance bactérienne qui se fixe sur les érythrocytes sans traitement préalable de ceux-ci est de nature polysaccharidique (102), nous avons cherché la substance à la fois sensibilisante et inhibitrice par d'autres méthodes d'extraction. En premier lieu, nous avons recouru à la technique recommandée par FULLER (97) pour l'extraction des polysaccharides responsables de la spécificité de groupe des streptocoques, c'est-à-dire à la dissolution des germes par la formamide à chaud. Les tableaux 13, 14 et 15 donnent les résultats des expériences d'hémagglutination, d'inhibition et de précipitation pratiquées avec ces extraits. Les tableaux 13 et 14 montrent l'apparition simultanée des deux groupements et l'augmentation des titres en fonction de l'âge des cultures.

TABLEAU 13.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec des extraits préparés selon FULLER à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions du sérum											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
2	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ = hémagglutination positive.

- = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

TABLEAU 14.

Inhibition de l'hémagglutination ST par des extraits préparés selon FULLER en fonction de l'âge de la culture.

Age des cultures en semaines	Titre d'hémagglutination respective	Dilutions des extraits									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2	1:32	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	1:32	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	1:256	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Dilution de l'antisérum 1/32.

± = hémagglutination positive.

- = hémagglutination négative.

TABLEAU 15.

Fonction antigénique déterminée par précipitation d'extraits préparés selon FULLER à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions des extraits			
	1:1	1:10	1:100	1:1000
2	+/+	+/+	-/±	-/-
3	+/+	+/+	-/±	-/-
4	+/+	+/+	-/±	-/-
6	+/+	+/+	-/±	-/-
8	+/+	+/+	-/±	-/-

Précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.

2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits + sérum normal = pas de précipitation.

L'hémosensitine obtenue par la formamide à température élevée nous a engagée à contrôler l'influence de la chaleur seule. Nous avons soumis une suspension de BCG pendant 1 1/2 h. à une température de 138° (+ 2 atmosphères). Ce traitement fait aussi apparaître simultanément les groupes sérophiles et érythrocytophiles de l'hémosensitine (tableaux 16, 17, 18).

TABLEAU 16.

Réactions d'hémagglutination effectuées avec des extraits préparés par autoclavage à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions du sérum											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = hémagglutination positive.

- = hémagglutination négative.

Contrôles : G. R. sensibilisés + sérum normal = pas d'agglutination.

TABLEAU 17.

Inhibition de l'hémagglutination ST par des extraits autoclavés.

Age des cultures en semaines	Titre d'hémagglutination respective	Dilutions des extraits												
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
2	1:512													
4	1:512										+			
6	1:2048											+	+	+
8	1:4096											+	+	+

ution de l'antisérum 1/32.

= hémagglutination positive.

= hémagglutination négative.

TABLEAU 18.

Fonction antigénique déterminée par précipitation d'extraits préparés par autoclavage à partir de cultures d'âges différents.

Age des cultures en semaines	Dilutions des extraits			
	1 : 1	1 : 10	1 : 100	1 : 1000
2	±/—	+/+	+/+	—/—
4	±/—	+/+	+/+	±/±
6	+/—	+/+	+/+	—/±
8	+/—	+/+	+/+	—/+

Précipitation effectuée en capillaires.

1^{er} signe = lecture après 2 heures à 37°.

2^e signe = lecture après 24 heures à 4°.

Contrôles : extraits + sérum normal = pas de précipitation.

Etant donné que le titre hémagglutinant d'un extrait est fonction de l'âge de la culture, nous avons étudié le rendement en partant de quantités variées de germes humides, âgés de six semaines et soumis à l'autoclave. 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 mg furent suspendus dans de l'eau distillée dans un rapport de 100 mg par 3 ml (extraction voir p. 17). La totalité de chaque extrait reprise dans 5 ml d'eau physiologique a servi à la sensibilisation de 0,1 ml d'érythrocytes. L'influence du poids initial des germes sur la capacité sensibilisante révélée par l'hémagglutination est mise en évidence dans le tableau 19.

TABLEAU 19.

Influence du poids des germes sur les réactions d'hémagglutination effectuées avec des extraits autoclavés.

Poids des germes en mg*	Dilutions du sérum											
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
100	+	+	+	+	+	+						
500	+	+	+	+	+	+	+	+				
1 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

* Culture âgée de 6 semaines.

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

Puisque le titre agglutinant d'un sérum donné augmente en fonction du poids des germes extraits, on peut avancer que les différen-

ces de titre enregistrées en fonction de l'âge des cultures (cf. tableaux 1, 12, 16) sont dues à la différence des quantités de facteurs hémossensibilisants se laissant extraire. Ceux-ci apparaissent en dose optimale à partir de 5000 mg. L'extraction de 10 000 mg n'augmente plus le titre hémagglutinant ; il est probable que la fixation de l'hémossensitine atteint son point de saturation avec 5000 mg.

On pouvait admettre qu'une température élevée favorisait l'apparition des propriétés hémossensibilisantes d'un extrait. Partant de cette hypothèse nous avons essayé d'activer tous les extraits qui avaient manifesté des propriétés inhibitrices et qui semblaient privés de propriétés hémossensibilisantes en les traitant à l'autoclave.

Le tableau 20 montre que nous avons réussi par ce procédé à activer trois des quatre préparations étudiées. Seule la fraction II, issue du broyage des germes, s'est montrée résistante (voir p. 25).

TABLEAU 20.

Activation, par autoclavage d'extraits inhibiteurs non sensibilisants, démontrée par la réaction d'hémagglutination.

Extraits *	Age (semaines)	Dilutions du sérum									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
MIDDLEBROOK- DUBOS 1) **	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milieux concentrés <i>in vacuo</i> à 37° (4) **	2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	3	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fraction I germes broyés (10) **	4	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	5	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	6	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fraction II germes broyés (10) **	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

* = Aucun des extraits n'hémagglutinait avant l'activation.

** = Les chiffres arabes se rapportent aux tableaux respectifs à consulter.

Un autre procédé d'activation examiné fut l'action de certaines enzymes.

CASTERMANS (103) a pu transformer une préparation inactive de salmonelles en une hémossensitine au moyen d'un extrait de *Streptomyces albus*, l'actinomycétine. Le même procédé appliqué à nos extraits mycobactériens nous a fourni les résultats rapportés dans le tableau 21.

TABLEAU 21.

Activation par l'actinomycétine d'extraits inhibiteurs non sensibilisants.

Extraits *	Age (semaines)	Dilutions du sérum									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
MIDDLEBROOK- DUBOS (1) **	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milieux concentrés <i>in vacuo</i> à 37° (4) **	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fraction II germes broyés (10) **	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

| = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

* = Aucun des extraits n'hémagglutinait avant l'activation.

** = Les chiffres arabes se rapportent aux tableaux respectifs à consulter.

L'actinomycétine représente un complexe d'enzymes à potentialités diverses et, entre autres, des enzymes protéolytiques et une enzyme qui scinde les molécules glucidoprotidiques au point de jonction des deux constituants (104). Il était donc indiqué d'éprouver l'action d'une enzyme protéolytique simple tel que la trypsine sur des extraits inactifs. A cette fin nous avons laissé agir une solution de trypsine sur les milieux concentrés *in vacuo* et sur la fraction II. La trypsine s'est révélée tout aussi active que l'actinomycétine en ce qui concerne les milieux concentrés *in vacuo* ; la fraction II est restée inactivable.

TABLEAU 22.

Activation par la trypsine des milieux concentrés *in vacuo* et de la fraction II.

Extraits *	Age (semaines)	Dilutions du sérum									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Milieux concentrés <i>in vacuo</i> à 37° (4) **	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Fraction II germes broyés (10) **	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = hémagglutination positive.

— = hémagglutination négative.

* = Aucun des extraits n'hémagglutinait avant l'activation.

** = Les chiffres arabes se rapportent aux tableaux respectifs à consulter.

Ayant à notre disposition une méthode simple d'extraction de l'hémosensitine, celle de l'autoclave, plus efficace que les méthodes proposées jusqu'ici, nous l'avons appliquée aux fractions lipidiques et aux sédiments récupérés après broyage des germes. La possibilité d'activer la fraction I avait prouvé que l'hémosensitine était un constituant cytoplasmique soluble. Il nous semblait indiqué de voir si cette fraction apparaissait aussi dans les éléments lipidiques et dans les sédiments.

Les fractions lipidiques, résultant du broyage des germes, lavées quatre fois à l'eau distillée, puis autoclavées, n'ont pas fourni de matériel polysaccharidique précipitable par l'acétone.

Les sédiments, issus du broyage des germes, traités à l'autoclave, n'ont pas libéré d'hémosensitine non plus.

Nous avons vu que la fraction II, obtenue après broyage, ne se laisse activer ni par l'autoclave, ni par l'actinomycétine, ni par la trypsine (voir tableaux 20, 21, 22), tandis qu'elle précipite par l'action de l'antisérum et inhibe l'hémagglutination à un titre cependant inférieur à celui de la fraction I (tableaux 11 et 12). Cette fraction se comporte donc comme si elle renfermait des éléments porteurs de groupements sérphiles, mais était privée de groupements érythrocytophiles. Ceci ne l'empêcherait pas de renfermer en outre des éléments porteurs de groupements érythrocytophiles libres et privés de groupements sérphiles. Nous avons essayé de vérifier cette dernière

hypothèse par une épreuve de blocage des érythrocytes. Après les avoir soumis à l'action de la fraction II, nous les avons traités avec l'antigène «ST Pasteur» et mis en contact avec l'antisérum.

TABLEAU 23.

Recherche du groupe érythrocytophile dans la fraction II au moyen d'une sensibilisation secondaire avec l'antigène «ST Pasteur».

Sensibilisation	Dilutions du sérum										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
par ST Pasteur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
par Fraction II, puis ST Pasteur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

+ = hémagglutination positive.
— = hémagglutination négative.

Le fait que l'hémagglutination a eu lieu et au titre équivalent des témoins, nous permet de dire que les groupements érythrocytophiles de la fraction II n'existent pas ou sont pour le moins dégradés à un point qui les rend inactifs.

DISCUSSION

Pour que se produise la réaction d'hémagglutination conditionnée, l'hémosensitine doit satisfaire à deux exigences : elle doit être porteuse de groupements libres permettant la fixation sur les globules rouges et de groupements libres accessibles aux anticorps correspondants. Nous avons proposé de dénommer les premiers *groupements érythrocytophiles*, et les seconds *groupements sérophiles*. Si les uns ou les autres de ces groupements sont inactifs, c'est qu'ils sont absents, masqués ou dégradés. Dans ces conditions l'hémagglutination ne peut pas s'effectuer.

En l'absence de fixation de l'hémosensitine, pour démontrer la présence des groupements que nous avons appelés «sérophiles», MIDDLEBROOK et DUBOS (41) ont utilisé le test de l'inhibition de l'hémagglutination. Cette expérience en deux temps consiste en fait en une absorption des anticorps par les groupements sérophiles libres de l'hémosensitine. On parle d'une inhibition positive quand un sérum absorbé par une hémosensitine porteuse de groupes sérophiles n'est pas capable d'agglutiner des érythrocytes sensibilisés avec une hémosensitine active.

Par analogie, nous avons recherché un test d'inhibition pour mettre en évidence des groupements érythrocytophiles de l'hémosensitine par blocage des récepteurs érythrocytaires. On parle d'une inhibition positive lorsque la sensibilisation par une hémosensitine active ne se fait pas.

La variabilité des différents extraits de *Mycobacterium tuberculosis* révélée par l'inconstance des résultats de l'hémagglutination observée par des auteurs (101, 105) serait donc explicable par la présence ou l'absence des groupements fonctionnels.

Nous avons exposé sous forme de tableau théorique l'influence de l'état des groupements érythrocytophiles et sérophiles de l'hémosensitine sur les réactions d'hémagglutination et d'inhibition (tableau 24).

TABLEAU 24.

Influence de l'état des groupements érythrocytophiles et sérophiles de l'hémosensitine sur les réactions d'hémagglutination et d'inhibition.

Combi- naisons	Gr. érythro- cytophiles	Gr. sérophiles	Hémagglu- tination	Inhibition
I	libres	libres	+	+ * **
II	absents masqués ou dégradés	libres	—	+ *
III	libres	absents masqués ou dégradés	—	+ **
IV	absents masqués ou dégradés	absents masqués ou dégradés	—	—

* = inhibition par neutralisation des anticorps.

** = inhibition par blocage des récepteurs érythrocytaires.

I.

La première combinaison représente le cas de l'hémosensitine complète. La meilleure préparation correspondant au titre maximum du sérum hémagglutinant fut obtenue à partir de cultures âgées de 8 semaines et à l'aide de la chaleur sous pression.

Ce résultat souligne que l'activité de l'hémosensitine extraite d'un poids égal de culture et, exprimée par le titre hémagglutinant du sérum, dépend de l'âge de la culture et de la méthode d'extraction. Les facteurs responsables sont le nombre des groupements érythrocytophiles et le nombre des groupements sérophiles. LANDY (83)

et STAUB (89) ont montré que le nombre de molécules d'hémosensitine se fixant sur les érythrocytes est fonction du nombre de molécules présentes tant qu'un certain point de saturation, déterminé par le nombre des récepteurs des globules rouges, n'est pas atteint. D'autre part le titre agglutinant d'un sérum dépend tout aussi bien de sa teneur en anticorps que de la présence des antigènes accessibles. Notre sérum agglutine les érythrocytes sensibilisés avec «ST Pasteur» jusqu'au titre de 1:1024, tandis que son titre après sensibilisation avec l'hémosensitine «8 semaines-autoclave» s'élève à 1:4096. En se basant sur les données de LAMENSANS et coll. (92) on est en droit d'admettre que l'hémosensitine «ST Pasteur» utilisée en excès sature les récepteurs érythrocytaires accessibles. Le fait que la sensibilisation avec la moitié de la quantité usuelle a fourni le même titre agglutinant de 1:4096 prouve que notre hémosensitine «8 semaines-autoclave» est également utilisée en excès.

Au vu de la différence des titres d'agglutination nous sommes enclins à admettre que l'extrait autoclavé contient un plus grand nombre de groupes sérophiles que l'extrait «ST Pasteur». Le fait que nous avons toujours travaillé avec des excès d'hémosensitine et que nous étions donc toujours en présence de récepteurs érythrocytaires saturés nous amène à supposer qu'une partie de l'hémosensitine «ST Pasteur» est incomplète en ce sens que des groupes sérophiles manquent, sont masqués ou dégradés. Cette hypothèse est étayée par les résultats des épreuves de neutralisation des anticorps et des épreuves de précipitation mentionnées dans le chapitre «Matériel et Méthodes». Nous avons signalé que les dernières dilutions actives de l'hémosensitine «ST Pasteur» sont respectivement 1:32 et 1:10. Les valeurs correspondantes de 1:4096 et 1:1000 pour l'hémosensitine autoclavée démontrent bien la présence dans cette dernière d'un plus grand nombre de groupes sérophiles libres capables de se combiner avec les anticorps. Si les extraits préparés selon FULLER ont fourni des titres d'inhibition et de précipitation inférieurs aux extraits autoclavés, c'est que cette méthode libère moins de groupes sérophiles, ou qu'elle les dégrade partiellement.

II.

Si les groupes érythrocytophiles sont absents, masqués ou dégradés et les groupes sérophiles libres, seule la réaction d'inhibition par neutralisation des anticorps est positive.

a) Dans le cas où les groupes érythrocytophiles sont masqués, nous pouvons parler d'une hémosensitine potentielle qui peut être activée. Cette forme a été décrite pour l'hémosensitine de *Salmonella typhi* par NETER et coll. (87). Ces auteurs ont observé qu'une cul-

ture jeune de *Salmonella typhi* non hémosensibilisante peut le devenir sous l'influence du vieillissement, du chauffage à 100° pendant une heure ou du traitement par la soude caustique et le toluène. CASTERMANS (103) est parvenu à des résultats semblables et a pu en outre, à l'aide de l'actinomycétine, libérer d'un milieu de culture inactif de salmonelles une substance hémosensibilisante hautement active.

A notre connaissance, on n'a pas cherché jusqu'ici pour les Mycobactéries à transformer une préparation uniquement inhibitrice en forme hémosensibilisante. C'est ce que nous avons réalisé dans notre travail.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé nous avons toujours pu mettre en évidence, aussi bien dans des cultures jeunes que dans des cultures âgées, la présence de groupements sérophiles libres par les épreuves d'inhibition et de précipitation. Nous avons constaté que la méthode MIDDLEBROOK-DUBOS appliquée à un poids identique de mycobactéries d'âges différents libère une hémosensitine potentielle à partir des jeunes cultures et une hémosensitine immédiatement active à partir des vieilles cultures. Ceci confirme l'effet du vieillissement sur la libération des groupes érythrocytophiles.

L'hémosensitine n'est jamais libérée dans le milieu à l'état immédiatement actif, du moins pas au cours des premières semaines, puisque la simple concentration *in vacuo* s'est révélée insuffisante. Nous avons pourtant réussi à démontrer sa présence d'emblée sous une forme potentielle en l'activant par des procédés de chauffage et de digestion enzymatique.

b) L'hémosensitine à groupements érythrocytophiles dégradés et à groupements sérophiles libres est certainement courante. Les causes de cette dégradation ne sont que très peu connues. MIDDLEBROOK (106) et ILAND et PEACOCK (85) l'ont observée à la suite d'un traitement par de la soude caustique n/33. STAUB (89) signale que les antigènes polyosidiques des Salmonelles obtenus par hydrolyse alcaline se fixent sur les hématies, alors que ceux obtenus par hydrolyse acide ne le font pas.

Il existe une série de préparations dont il est difficile de dire si le groupe érythrocytophile est bloqué ou dégradé. Le polysaccharide de SORKIN se fixe sur les érythrocytes, celui de SEIBERT ne le fait pas (84). Les deux préparations sont douées du même pouvoir inhibiteur. On ne peut pas dire si les groupes érythrocytophiles du polysaccharide I de SEIBERT sont bloqués, dégradés ou d'emblée absents.

MIDDLEBROOK (94) signale qu'il est parvenu à adsorber d'une préparation hémosensibilisante la fraction érythrocytophile représentée par le 40 % des polysaccharides de la préparation ; le 60 % restant

conservait toutefois le pouvoir de neutraliser les anticorps. Le matériel hémosensibilisant de MIDDLEBROOK consiste-t-il en un mélange d'hémosensitine active et potentielle ? Ou bien le 60 % du polysaccharide a-t-il perdu ses groupes érythrocytophiles soit par action physiologique soit par suite de l'extraction, ou bien n'en a-t-il jamais possédé ?

ILAND et PEACOCK (85) constatent que les polysaccharides purifiés des Mycobactéries neutralisent les anticorps, mais ne se fixent pas sur les érythrocytes. Comme SORKIN (88) a émis l'hypothèse que les acides mycoliques qui restent attachés aux polysaccharides pourvoient à la fixation, il serait intéressant d'autoclaver toutes ces préparations afin d'exclure le simple blocage des groupes érythrocytophiles.

BERBLINGER et BRODHAGE (50) et GERNEZ-RIEUX et TACQUET (52) ont constaté l'extrême variabilité de l'activité hémosensibilisante de diverses tuberculines du commerce. Nous supposons en nous basant sur nos résultats expérimentaux que l'âge des cultures, la durée de chauffage et la température appliquées à la préparation des tuberculines commerciales sont à l'origine de ces différences. Notre fraction II dérivée du broyage des germes est porteuse de groupes sérophiles, mais manque de groupes érythrocytophiles. Les épreuves d'inhibition et de précipitation sont positives, mais aucun des procédés d'activation n'a pu la rendre hémosensibilisante. Rappelons ici que la fraction II représente le matériel soluble des Mycobactéries, non précipitable par le méthanol, et que la fraction I, hémosensitine potentielle, inhibitrice et précipitante à titres élevés, représente le matériel soluble précipitable par le méthanol. L'ensemble de ces deux fractions correspond peut-être à la préparation de MIDDLEBROOK que nous venons de mentionner.

III.

Un matériel dont les groupes érythrocytophiles seraient libres tandis que les groupes sérophiles seraient bloqués ou dégradés est théoriquement possible. Il n'inciterait ni hémagglutination, ni précipitation, ni neutralisation des anticorps. Aucun des travaux consacrés jusqu'ici aux hémosensitines ne fait mention de la recherche ou de l'obtention de tels extraits qui pourraient être mis en évidence par un test de blocage des récepteurs érythrocytaires. Ce test effectué avec notre fraction II est resté négatif.

IV.

La quatrième combinaison que nous avons indiquée dans notre tableau 24 envisage le cas purement hypothétique des deux groupes fonctionnels absents, masqués ou dégradés.

Nous avons rapporté dans l'introduction les théories actuelles sur la nature du groupe érythrocytophile, que de nombreux auteurs signalent comme particulièrement labile (101, 105), et mentionné le rôle de certains lipides (cholestérol, lécithine, céphaline) comme agents inhibiteurs de la fixation (101, 86, 87). Les lipides n'ont pas gêné la préparation de notre hémossensitine. La préparation que nous avons obtenue provient de germes non délipidés autoclavés.

Comme la chaleur dont on connaît l'action dénaturante sur les protéines, s'est révélée être un excellent agent activateur, nous avons émis l'hypothèse que le blocage résulterait de la présence de fractions protéiniques. Les résultats de l'activation par digestion enzymatique sont en faveur de cette hypothèse.

L'extrait de *Streptomyces albus* (l'actinomycétine) contient différentes enzymes protéolytiques et un ferment qui a la propriété, ainsi que l'a montré McCARTY (104), d'attaquer les complexes glucidoprotéiniques au point de conjugaison de la protéine et du glucide. Cet extrait nous a permis d'activer nos diverses préparations d'hémossensitine potentielle de Mycobactéries, et nous fait rejoindre l'observation de CASTERMANS (103) sur l'activation d'une hémossensitine de Salmonelles par l'actinomycétine. Nous avons pu exclure l'action isolée de la gluco-protéinase de l'actinomycétine par le fait que la trypsine, qui ne fait qu'hydrolyser les liaisons peptiques, est à elle seule activatrice.

CONCLUSION

Les différentes méthodes proposées jusqu'ici pour l'extraction d'une hémossensitine mycobactérienne présentent des inconvénients plus ou moins importants. La méthode de MIDDLEBROOK au phénol est lente et ne fournit que de faibles quantités d'hémossensitine. La préparation à partir de tuberculine à l'aide de phénol (ST Pasteur) est bonne, mais impose l'emploi de grandes quantités de phénol, ce qui rend le travail onéreux et compliqué.

L'extraction aqueuse suivant la désintégration mécanique des bacilles ne revêt qu'un intérêt théorique puisqu'elle ne donne qu'une hémossensitine potentielle, qui doit être activée par l'autoclavage, ce qui élimine l'avantage de la préparation douce de l'extrait aqueux.

La méthode que nous proposons, soit l'extraction à l'autoclave, possède de nombreux avantages : elle est rapide ; elle fournit une hémossensitine active quel que soit l'âge des cultures et sans danger, même lorsqu'elle est appliquée à de grandes quantités de matériel virulent.

RÉSUMÉ

L'hémosensitine de la souche BCG, Paris 888, cultivée sur milieu de Sauton, a été étudiée en fonction de l'âge des cultures et du mode d'extraction.

En sus des méthodes classiques d'extraction selon MIDDLEBROOK et à partir du milieu de culture, il a été fait appel à des méthodes partiellement ou totalement originales, telle que l'extraction des polysaccharides selon FULLER, l'extraction par autoclave, et l'extraction douce à partir de germes broyés.

Les méthodes de FULLER et de l'autoclave fournissent des hémosensitines d'emblée actives quel que soit l'âge des cultures. Les extractions du milieu selon MIDDLEBROOK ne fournissent une hémosensitine active qu'à partir respectivement de la 3^e et de la 6^e semaines. Les cultures plus jeunes ne libèrent qu'une hémosensitine potentielle, c'est-à-dire porteuse des groupements sérophiles libres — démontrables par absorption et précipitation — et de groupements érythrocytophiles bloqués — activables par la chaleur ou par digestion enzymatique. Le matériel soluble libéré par broyage des germes ne fournit également qu'une hémosensitine potentielle et cela indépendamment de l'âge des germes. Elle aussi est toujours décelable par activation. Une des fractions, non précipitable par le méthanol, isolée de ce matériel soluble contient des substances uniquement inhibitrices et résistantes aux procédés d'activation.

La labilité ou l'inconstance de l'hémosensitine, souvent signalées dans la littérature, se laissent expliquer par la présence de fractions qui bloquent les groupements érythrocytophiles et qui sont écartées par l'activation.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Abhängigkeit des Hämosensitivorkommens vom Alter der Kulturen und von den Extraktionsmethoden wurde mit dem auf Sauton gezüchteten Stamm BCG, Paris 888, untersucht.

Benutzt wurden 1) die klassische Technik nach MIDDLEBROOK, 2) Kulturfiltrate, 3) vom Autor abgeänderte Polysaccharid-Extraktionstechnik nach FULLER, 4) eine Originalmethode mittels der Autoklave, sowie 5) eine sanfte Extraktionstechnik aus zertrümmerten Bakterien.

Die Fuller- und Autoklavmethode ergeben sofort ein aktives Hämosensitin unabhängig vom Alter der benutzten Kultur.

Die Kulturfiltrate und die Extraktionsmethode nach MIDDLEBROOK zeitigen ein aktives Hämosensitin nach der dritten, beziehungsweise, nach der sechsten Woche. Die jüngeren Kulturen liefern nur ein potentielles Hämosensitin, d. h. ein Hämosensitin mit freien Sero-philengruppen, die man durch Absorption und Präzipitation nachweisen kann, und blockierten Erythrocytophilengruppen, die durch Hitze und enzymatische Verdauung aktiviert werden können. Das durch Bakterienzertrümmerung wasserlösliche Material ergibt auch nur ein potentielles, vom Alter der Kulturen unabhängiges, Hämosensitin. Auch es kann immer aktiviert werden. Eine aus diesem

wasserlöslichen Material durch Methanol nicht ausfällbare Fraktion enthält nur inhibierende Substanzen, die auf Aktivierung nicht ansprechen.

Der mit den Aktivierungsversuchen erhaltene Erfolg kann die in der Literatur beschriebene Labilität und Unbeständigkeit des Hämo-sensitins erklären.

BIBLIOGRAPHIE

1. KOCH R. — *Klin. Wschr.*, Berlin, 19, 221, 1882.
2. BORDET J. et GENGOU O. — *Ann. Inst. Pasteur* 15, 289, 1901.
3. WIDAL F. et LE SOURD L. — *Soc. Méd. Hôpitaux*, Paris, p. 787, 1901.
4. ARLOING S. et COURMONT P. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 127, 312, 1898.
5. CAMUS J. et PAGNIEZ P. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 53, 743, 1901.
6. BORDET J. et GENGOU O. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 137, 351, 1903.
7. WASSERMANN A. et BRUCK C. — *Deutsch. Med. Wschr.* 32, 449, 1906.
8. MORGENROTH J. et RABINOWITCH L. — *Deutsch. Med. Wschr.* 33, 705, 1907.
9. ROLLY F. — *Münch. Med. Wschr.* 56, 62, 1909.
10. HANNE. — Thèse médicale, Nancy, 1909.
11. CALMETTE A. et MASSOL L. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 67, 528, 1909.
12. CORPER H.-J. — *J. Inf. Dis.* 19, 315, 1916.
13. BESREDKA A. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 118, 225, 1935.
14. PETROFF S.-A. — *Am. Rev. Tuberc.* 1, 33, 1917.
15. WILSON M.-A. — *J. Immunol.* 3, 345, 1918.
16. COOKE J.-V. — *J. Ind. Dis.* 25, 493, 1919.
17. WADSWORTH A. et MALTANER B. — *J. Exp. Med.* 33, 119, 1921.
18. BOQUET A. et NÈGRE L. — *Rev. de la tuberc.* 1, 257, 1920.
19. WASSERMANN A. — *Deutsch. Med. Wschr.* 49, 303, 1923.
20. NEUBERG C. et KLOPSTOCK F. — *Klin. Wschr.* 5, 1078, 1926.
21. WITEBSKY E., KLINGENSTEIN R. et KUHN H. — *Klin. Wschr.* 10, 1068, 1931.
22. SCHIFF W. — *Z. Immunitätsforsch.* 112, 57, 1955.
23. PFANNENSTIEL W. — *Erg. Hyg.* 6, 103, 1923.
24. BONOME A. — *Zbl. Bakt.* I/Orig. 43, 391, 1907.
25. CALMETTE A. et MASSOL L. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 149, 760, 1909.
26. CALMETTE A. et MASSOL L. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 151, 285, 1910.
27. ZINSSER H. et PARKER J. — *J. Exp. Med.* 37, 275, 1923.
28. HEIDELBERGER M. et AVERY O.-T. — *J. Exp. Med.* 38, 73, 1923.
29. LAIDLAW P. et DUDLEY H.-W. — *Brit. J. Exp. Path.* 6, 197, 1925.
30. HEIDELBERGER M. et MENZEL A.-E.-O. — *J. Biol. Chem.* 118, 79, 1937.
31. KARJALA S.-A. et HEIDELBERGER M. — *J. Biol. Chem.* 137, 189, 1941.
32. HAWORTH N., KENT P.-W. et STACEY M. — *J. Chem. Soc.*, p. 1211, 1948.
33. KENT P.-W. et STACEY M. — *Bioch. Biophys. Acta* 3, 641, 1949.
34. KENT P.-W. — *J. Chem. Soc.*, p. 364, 1951.
35. SEIBERT F.-B. — *Am. Rev. Tuberc.* 21, 370, 1930.

36. ARLOING S. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 126, 1319, 1398 et 1550, 1898.
37. FORNET W. — *Ann. Inst. Pasteur* 35, 797, 1921.
38. CALMETTE A. — L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Masson & Cie, Paris, p. 465, 1928.
39. KOEGH E.-V., NORTH E.-A. et WARBURTON M.-F. — *Nature* 161, 687, 1948.
40. PALMER I.-W. et GERLOUGH T.-I.-D. — *Science* 92, 155, 1940.
41. MIDDLEBROOK G. et DUBOS R.-J. — *J. Exp. Med.* 88, 521, 1948.
42. MIDDLEBROOK G. et DUBOS R.-J. — *J. Clin. Invest.* 29, 1480, 1950.
43. SMITH D.-T. et SCOTT N.-B. — *J. Lab. Clin. Med.* 35, 303, 1950.
44. GABY W.-L., BLACK J. et BONDI A. — *Am. Rev. Tuberc.* 65, 272, 1952.
45. HEIN H. et SROKA W. — *Ann. Tuberc.* 107, 3, 1952.
46. THALHIMER W. et ROWE CH. — *Am. Rev. Tuberc.* 63, 667, 1951.
47. HILSON E. et ELEK S. — *J. Clin. Path.* 4, 158, 1951.
48. HALL W.-H. et MANNION R.-E. — *J. Clin. Invest.* 30, 1542, 1951.
49. MEYNELL G.-G. — *J. Path. Bact.* 64, 647, 1952.
50. BERBLINGER W. et BRODHAGE H. — *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 9, 235, 1953.
51. ROTHBARD S., DOONEIEFF A.-S. et HITE K.-E. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74, 72, 1950.
52. GERNEZ-RIEUX CH. et TACQUET A. — *Fortschr. Tuberkuloseforsch.* 5, 66, 1952.
53. SCHIFF W. — *Z. Immunitätsforsch.* 110, 185, 1953.
54. BOYDEN S.-V. et SORKIN E. — *Fortschr. Tuberkuloseforsch.* 7, 17, 1956.
55. STACEY M. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 55. J. & A. Churchill, London, 1955.
56. STACEY M. et KENT P.-W. — *Advances Carbohydr. Chem.* 3, 311, 1948.
57. STACEY M. — *Fortschr. Tuberkuloseforsch.* 6, 7, 1955.
58. SEIBERT F.-B., PEDERSEN K.-O. et TISELIUS A. — *J. Exp. Med.* 68, 413, 1938.
59. SEIBERT F.-B., STACEY M. et KENT P.-W. — *Bioch. Biophys. Acta* 3, 632, 1949.
60. RENFREW A. G. — *J. Biol. Chem.* 89, 619, 1930.
61. SEIBERT F.-B. et WATSON D.-W. — *J. Biol. Chem.* 140, 55, 1941.
62. TENNENT D.-M. et WATSON D.-W. — *J. Immunol.* 45, 179, 1942.
63. ANDERSON R.-J. — *Chem. Rev.* 29, 225, 1941.
64. ANDERSON R.-J. — *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* 3, 145, 1939.
65. ASSELINEAU J., CHOUCROUN N. et LEDERER E. — *Bioch. Biophys. Acta* 5, 197, 1950.
66. HAWORTH N., KENT P.-W. et STACEY M. — *J. Chem. Soc.*, p. 1120, 1948.
67. ILAND C.-N. et PEACOCK D.-B. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 163. J. & A. Churchill, London, 1955.
68. KOCH R. — *Deutsch. Med. Wschr.* 17, 1189, 1891.
69. SEIBERT F.-B., FIGUEROA E.-S. et DUFOUR E.-H. — *Am. Rev. Tuberc.* 71, 704, 1955.
70. BOYDEN S.-V. et SORKIN E. — *J. Immunol.* 75, 15, 1955.
71. HEIDELBERGER M. et MENZEL A.-E.-O. — *J. Biol. Chem.* 104, 655, 1934.

72. HECKLY R.-J. et WATSON D.-W. — *Am. Rev. Tuberc.* 61, 798, 1950.
73. STACEY M., KENT P.-W. et NASSAU E. — *Bioch. Biophys. Acta* 7, 146, 1951.
74. CHOUCROUN N. — *Am. Rev. Tuberc.* 56, 710, 1949.
75. BLOCH H. — *J. Exp. Med.* 91, 197, 1950.
76. ANDERSON R.-J. — *J. Biol. Chem.* 74, 525, 1927.
77. NÈGRE L. — *Bull. Acad. Nat. Méd.*, Paris, 134, 445, 1950.
78. WEISS D.-W. et DUBOS R. — *J. Exp. Med.* 103, 73, 1956.
79. SABIN F.-R., DOAN C.-A. et FORKNER C.-E. — *J. Exp. Méd.* 52, Suppl. 3, 1930.
80. RAFFEL S. — *Experientia* 6, 410, 1950.
81. RAFFEL S., ASSELINEAU J. et LEDERER E. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 174. J. & A. Churchill, London, 1955.
82. BOYDEN S.-V. — *Atti del VI Congr. Internaz. di Microbiol.*, Roma, 2, Sezione VI-VII, 159, 1953.
83. LANDY M. — *Am. J. Publ. Hlth* 44, 1059, 1954.
84. SORKIN E. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 66. J. & A. Churchill, London, 1955.
85. ILAND C.-N. et PEACOCK D.-B. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 163. J. & A. Churchill, London, 1955.
86. BOYDEN S.-V. et GRABAR P. — *Ann. Inst. Pasteur* 87, 257, 1954.
87. NETER E., ZALEWSKI N.-J. et ZAK D.-A. — *J. Immunol.* 71, 145, 1953.
88. SORKIN E. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 172. J. & A. Churchill, London, 1955.
89. STAUB A.-M. — *Ann. Inst. Pasteur* 80, 21, 1951.
90. HEIN H. — *Z. Hyg.* 10, 153, 1954.
91. NETER E. et ZALEWSKI N.-J. — *J. Bact.* 66, 424, 1953.
92. LAMENSANS A., GRABAR E. et BRETEY J. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 232, 1967, 1951.
93. RHODES J.-M. et SORKIN E. — *Experientia* 10, 427, 1954.
94. MIDDLEBROOK G. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 171. J. & A. Churchill, London, 1955.
95. BOYDEN S.-V. — *J. Exp. Med.* 93, 107, 1951.
96. FISCHER ST. — *Austr. J. Exp. Biol.* 28, 613, 1950.
97. FULLER A.-T. — *Brit. J. Exp. Path.* 19, 130, 1938.
98. GHUYSEN J.-M. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 147, 1502, 1953.
99. MICKLE H. — *J. Royal Microscop. Soc.* 68, 10, 1948.
100. SALTON M.-R. et HORNE R.-W. — *Bioch. Biophys. Acta* 7, 177, 1951.
101. POUND A.-W. — *J. Path. Bact.* 64, 131, 1952.
102. NETER E. — *Bact. Reviews* 20, 166, 1956.
103. CASTERMANS A. — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 147, 720, 1953.
104. McCARTY M. — *J. Exp. Med.* 96, 555, 1952.
105. FISCHER ST. — Communication personnelle, 1955.
106. MIDDLEBROOK G. — CIBA Found. Symposium on Experimental Tuberculosis. Bacillus and Host, p. 66. J. & A. Churchill, London, 1955.

TABLE DES MATIERES

	Pages
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	2
I. <i>Réactions sérologiques de la tuberculose</i>	2
A. Fixation du complément	2
B. Précipitation	4
C. Agglutination	5
D. Hémagglutination et hémolyse conditionnées	6
II. <i>Données actuelles sur la structure antigénique de « Mycobacterium tuberculosis »</i>	8
A. Polysaccharides	8
1) Polysaccharides préparées à partir des filtrats de cultures	8
2) Polysaccharides préparés à partir des lipides	9
3) Polysaccharides préparés à partir des germes dégraissés	10
B. Protéines	10
1) Antigènes protéiniques isolés des filtrats de cultures	10
2) Antigènes protéiniques isolés des germes dégraissés	11
C. Lipides	11
1) Les lipides solubles dans l'acétone	12
2) Les phosphatides	12
3) Les cires	12
4) Les lipides fortement liés	12
D. Hémosensitines	13
1) L'hémosensitine polysaccharidique	13
2) L'hémosensitine protéinique	15
TRAVAUX PERSONNELS	16
I. <i>Matériel et méthodes</i>	16
Souche	16
Milieu de Sauton	16
Solution tampon isotonique (pH 7,2)	16
Extraits hémosensibilisants	17
1) Méthode de MIDDLEBROOK-DUBOS, modifiée par FISHER	17
2) Méthode de FULLER	17
3) Méthode par autoclavage	17
4) Digestion enzymatique	18
5) Extraction du milieu de culture	18
6) Méthode par broyage	18
Hématies de mouton	19
Antisérums	19
Détermination du pouvoir hémosensibilisant des extraits	19
Test du pouvoir inhibiteur des extraits	20
II. <i>Résultats</i>	20
DISCUSSION	33
CONCLUSION	38
RÉSUMÉ. — ZUSAMMENFASSUNG	39
BIBLIOGRAPHIE	40

Rédaction : Mlle Suzanne Meylan, professeur, Treyblanc 6, Lausanne.
Publicité : M. P.-A. Mercier, D^r ès sc., géologue, Palais de Rumine, Lausanne.
Imprimerie Baud, av. de l'Université 5, Lausanne.