

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FIXATEURS DU SÉRUM NORMAL DE CHIEN

PAR E. MALVOZ.

Dans leur beau mémoire sur les sensibilisatrices ou fixateurs des sérums antimicrobiens¹, MM. Bordet et Gengou disent n'avoir pas décelé ces substances dans les sérums neufs des animaux témoins qui ont servi à leurs expériences. C'est ainsi que le sérum antipesteux, préparé chez le cheval, est très riche en sensibilisatrices spécifiques, alors que le sérum normal de cet animal ne révèle pas de fixateurs pour le bacille pesteux. Le cobaye injecté de vaccin du charbon fournit un sérum sensibilisateur pour ce microbe, mais le sérum neuf de cobaye se montre totalement dépourvu de cette propriété. Et de même pour le bacille typhique, le proteus, etc., vis-à-vis desquels les sérums normaux ne manifestent pas de propriété sensibilisatrice.

Cette question des fixateurs des sérums normaux présente un grand intérêt au point de vue des doctrines générales de l'immunité : en ce qui concerne particulièrement l'état réfractaire naturel de certains animaux, il est très important d'établir si la défense est due aux seules alexines ou si celles-ci ont besoin du concours des substances sensibilisatrices, comme chez les animaux immunisés. Les observations publiées, jusqu'à présent, de fixateurs dans les sérums neufs sont fort clairsemées.

Dans son mémoire sur l'agglutination et la dissolution des hématies², Bordet s'est déjà demandé si dans les sérums neufs, l'action de l'alexine n'était pas favorisée par celle d'autres matières. En combinant l'action de 2 sérums neufs, il put constater des faits qui ne s'expliquaient bien que par la présence de fixateurs. Ainsi, les vibrions cholériques, qui ne subissent de transformation granuleuse ni dans le sérum de cheval neuf ni dans celui du cobaye normal, se transforment facilement en granules lorsqu'on les met en contact du mélange des deux sérums. Mais

1. *Annales Pasteur*, mai 1901.

2. *Annales Pasteur*, 1899, p.

Bordet faisait toutes ses réserves quant à une généralisation hâtive de cette observation.

Tout récemment, Wechsberg¹, discutant certaines expériences de Wasserman, sur l'action des anticorps chez les cobayes injectés de bacilles typhiques et se livrant à un contrôle de celles-ci, découvre que le sérum neuf chauffé de lapin doit renfermer des ambocepteurs (sensibilisatrices) pour le bacille typhique, n'agissant bien qu'avec le concours de l'alexine, non de lapin, mais de cobaye. Pfeiffer², de son côté, a signalé des sensibilisatrices pour le vibrion cholérique dans le sérum normal de chèvre.

Nous venons, de notre côté, de découvrir que le sérum normal de chien renferme des fixateurs pour le bacille du charbon, ou tout au moins que si on soumet du sérum de cet animal à la série d'essais qui, dans les mains de Bordet et Gengou, ont permis la découverte de fixateurs dans les sérums antimicrobiens, le sérum de chien se comporte tout à fait comme celui d'un animal tel que le cobaye qui aurait été traité par des microbes du charbon.

Nous sommes arrivé à cette constatation d'une manière indirecte, au cours d'une étude que nous faisons sur les causes du pouvoir bactéricide du sérum de rat vis-à-vis du charbon. Ce pouvoir microbicide, on le sait, est tout particulier : il ne disparaît pas, notamment, à la suite d'un chauffage du sérum à 56°. Est-il dû à une alexine ? Non, d'après Bordet.

Pour élucider la question, nous voulions rechercher si l'injection de ce sérum chauffé, de rat à d'autres animaux serait suivie de l'apparition de substances antibactéricides (antialexines, antisensibilisatrices ?) dans leur sérum. Il fallait s'assurer d'abord que l'animal choisi pour ces injections ne présenterait pas lui-même dans son sérum des substances agissant comme antialexines ou antisensibilisatrices vis-à-vis du charbon. On sait que certains sérums *neufs* renferment des anticorps tels que les antitoxines diphtérique et tétanique (cheval), l'antistaphylotoxine (homme), l'anticrotine (porc), des antiferments (antiprésurs, antithrombase, anticynarase) ; le sérum de chèvre renferme une antisensibilisatrice contre l'hémolysine des hématies de chèvre

1. *Zeitschrift für Hygiene*, vol. 39, fasc. 1, p. 483 et s.

2. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 51, 1901, p. 892.

(Ehrlich), etc. Or, en soumettant le sérum neuf de chien aux divers essais préalables qu'il fallait instituer pour déterminer notre choix, nous avons vu que, bien loin de renfermer des substances antialexiques ou antisensibilisatrices par égard au microbe du charbon, ce sérum se comporte comme s'il contenait, en abondance, des fixateurs spécifiques pour cette espèce bacillaire.

Voici les essais variés qui nous paraissent établir ce fait :

C'est la méthode Bordet-Gengou qui a été appliquée dans ces expériences ; chaque série dont l'exposé suit a été faite sur les vaccins I et II de l'Institut Pasteur, sur le bacille du charbon virulent, et sur un bacille atténué par des cultures en phénol qui nous avait été très obligeamment fourni par le Dr Malfitano.

Au moyen de cultures fraîches sur gélose à 37°, on prépare d'abord des émulsions très concentrées du microbe en eau salée à 90/0 ; puis dans de tout petits tubes à essai on introduit les mélanges suivants :

1° Émulsion de microbes, 4 gouttes ; sérum normal de chien adulte chauffé à 56° une demi-heure, 12 gouttes ; alexine fraîche de lapin, 2 gouttes. On laisse 6 heures en contact à la température de la chambre, puis on ajoute 2 gouttes d'hématies de poule bien lavées et sensibilisées par du sérum chauffé à 56° provenant d'un lapin injecté à 3 reprises avec du sang défibriné de poule ;

2° Même mélange que 1°, mais dans lequel le sérum chauffé de chien est remplacé par du sérum normal chauffé de cobaye ;

3° Même mélange que 1°, mais avec sérum normal de bœuf chauffé ;

4° Même mélange que 1°, mais sans microbes ;

5° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de rat ;

6° Même mélange que 5°, mais où le sérum chauffé de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

7° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de cobaye ;

8° Même mélange que 7°, mais où le sérum de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

9° Même mélange que 1°, mais où le sérum normal de chien chauffé est remplacé par de l'eau physiologique ;

10° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mycoides*;

11° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mesentericus*;

12° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le bacille de Friedländer.

Tous ces mélanges sont placés pendant une heure à 37°, puis abandonnés jusqu'au lendemain à la température de la chambre.

Le résultat est frappant : il n'y a pas d'hémolyse dans les mélanges où le sérum normal de chien chauffé se trouve en présence d'une part, des microbes, d'autre part, de l'alexine de lapin, de cobaye ou de rat ; tous les autres mélanges présentent une forte hémolyse des hématies.

L'examen microscopique confirme le résultat macroscopique ; l'hémolyse, là où elle existe, se caractérise par la destruction des hématies dont on ne voit plus que les noyaux.

Le résultat est surtout très net quand il s'agit du vaccin et du charbon atténué par le phénol ; parfois dans les mélanges où se trouve le charbon virulent, on trouve quelques hématies détruites.

Dans les tubes où le sérum de chien était remplacé par du sérum chauffé de cobaye ou de bœuf, l'hémolyse s'est produite aussi rapidement que dans les témoins, renfermant seulement de l'alexine, de l'eau physiologique et des microbes. Tout se passe donc comme si le sérum normal de chien renfermait des fixateurs pour le bacille du charbon, n'agissant pas sur d'autres microbes.

On remarquera que les hématies employées étaient des globules de poule sensibilisés par du sérum chauffé lapin-poule ; nous avons pu nous assurer — comme Bordet l'avait fait déjà — que l'on peut hémolyser ces hématies sensibilisées aussi bien par l'alexine fraîche de cobaye de rat ou de chien que par celle du lapin. Pourquoi n'avons nous pas employé l'alexine de chien dans tous les mélanges précités ? C'est qu'il suffit d'ajouter, au mélange de 4 gouttes d'émulsion de charbon et de 12 gouttes d'eau physiologique, 2 gouttes de sérum frais de chien pour obtenir un liquide incapable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule : il est vraisemblable que les fixa-

teurs présents dans cette petite quantité de sérum frais de chien suffisent pour fixer l'alexine sur les bacilles.

Quand, au lieu de sérum normal chauffé de chien comme source des sensibilisatrices, on emploie le sérum de lapin chauffé, les résultats sont variables : certains lapins nous ont fourni un sérum dépourvu de fixateurs; dans d'autres cas, le sérum paraissait renfermer une certaine proportion de sensibilisatrices, mais le phénomène était toujours moins net qu'avec le sérum de chien.

On remarquera aussi que les mélanges où le sérum de chien chauffé se trouvait seul en présence de l'alexine, sans bacilles du charbon, détruisaient parfaitement les hématies sensibilisées de poule; on ne peut donc expliquer nos résultats par la présence, dans le sérum de chien, de l'une ou l'autre substance s'opposant à l'action de l'alexine : il faut la présence de microbes du charbon pour fixer la sensibilisatrice et après celle-ci l'alexine.

Des essais d'un autre genre viennent encore plaider en faveur de l'existence de sensibilisatrices du charbon dans le sérum du chien.

On prépare une émulsion, très concentrée en eau physiologique, de bacilles du charbon (variété atténuée par le phénol). On introduit dans 2 petits tubes, et dans chacun d'eux (A, A') 6 gouttes de cette émulsion qu'on additionne ensuite de 6 gouttes de sérum normal de chien chauffé. Tandis que le tube A' sert de témoin, le mélange A, après un repos de 6 heures, est soumis à l'action de la turbine pendant 1 heure, puis on enlève avec beaucoup de précaution, au moyen d'une fine pipette le liquide, qui surnage et on l'introduit dans un tube B. Nous ajoutons 2 gouttes d'alexine fraîche de lapin à la fois à B, et à A' (A' contient encore les bacilles du charbon; B n'en contient plus). On abandonne au repos pendant quelques heures, puis à B et à A' on ajoute des hématies de poule sensibilisées par du sérum chauffé lapin-poule (on fait en même temps des témoins avec alexine de lapin, eau salée et hématies sensibilisées). Après 2 heures à 37°, on constate que les hématies sont hémolysées dans le témoin et dans B, mais sont restées intactes dans A', où il ne se produit pas de destruction des globules.

L'interprétation de ces résultats est facile si l'on admet la

présence de fixateurs dans le sérum normal de chien. Ce sérum chauffé, dépouillé de ces substances par l'addition d'une grande quantité de bacilles du charbon et débarrassé ensuite des microbes sensibilisés, laisse l'alexine, ajoutée ensuite, parfaitement libre, tandis qu'en présence des bacilles impressionnés, l'alexine se fixe fortement sur ces derniers.

Dans toutes les expériences qui viennent d'être relatées, on a fait usage du sérum de grands chiens adultes. Si, par les mêmes méthodes, on recherche la présence de fixateurs dans le sérum de jeunes chiens, les résultats sont négatifs. Nous avons pris du sang d'un chien âgé de 15 jours : chauffé 1/2 heure à 56°, le sérum ne fixe sur les vaccins et sur le charbon virulent, ni l'alexine de chien ni celle de lapin ou de cobaye.

L'alexine de ce jeune chien était nettement hémolytique pour les hématies sensibilisées de poule.

Si, au lieu d'opérer sur le sérum de chien, on recherche par ces méthodes les fixateurs éventuels du sérum normal de rat, on obtient des résultats négatifs. Si on prend, par exemple, des microbes du charbon ou du vaccin charbonneux, mélangés à du sérum normal de rat préalablement chauffé à 56° et additionnés d'alexine de lapin, ou de cobaye dans les conditions habituelles de ces expériences, on n'observera pas de sensibilisation des bacilles : l'alexine reste libre et capable d'hémolyser, aussi fortement que les témoins où le sérum de rat est remplacé par de l'eau physiologique, les hématies sensibilisées de poule. Le résultat est le même si, au lieu d'alexine de lapin ou de cobaye, on se sert d'alexine de rat, qui elle aussi détruit parfaitement les globules de poule sensibilisés par le sérum lapin-poule.

Mais si nous ne constatons l'absence de sensibilisatrices des bacilles du charbon, en présence du sérum de rat chauffé, qu'en nous servant de l'alexine de rat le résultat resterait douteux. En effet, le sang de rat est tout différent de celui des autres animaux. Son pouvoir bactéricide ne disparaît pas après un chauffage à 56°, alors que le sérum de lapin, souvent bactéricide pour le charbon, n'est plus actif après avoir été soumis à cette température. Au contraire, l'alexine hémolytique de rat, ainsi que nous l'avons constaté, ne résiste pas à un chauffage à 56°, c'est-à-dire que le sérum

frais de rat ainsi chauffé n'est plus capable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule. Bordet¹ avait déjà signalé que le sérum de rat chauffé à 56° perd l'alexine capable de provoquer le phénomène de Pfeiffer sur les vibrions sensibilisés par le choléra-sérum. Il y a donc dans le sérum de rat deux substances actives très différentes : une alexine, semblable à l'alexine des deux autres sérums neufs, et une autre substance, qui n'est peut-être pas une alexine, douée de propriétés bactéricides et résistant à 56°. Même si une hémolyse se produisait dans les mélanges de bacilles du charbon, de sérum de rat chauffé et de sérum frais de rat, additionnés d'hématies sensibilisées de poule, on ne pourrait donc pas en conclure que le sang de rat ne renferme pas de fixateurs pour le charbon, l'alexine hémolytique étant différente de la substance bactéricide. Mais l'expérience faite avec l'alexine de lapin ou de cobaye permet de conclure à l'absence de sensibilisatrices, tout au moins à la quantité incomparablement inférieure de celles-ci par rapport au sérum de chien, dans le sérum de rat chauffé à 56°.

*
* *

Il est impossible de ne pas être frappé de ce fait qu'il existe une relation entre l'existence ou l'absence de fixateurs pour le bacille du charbon dans les divers sérums que nous avons étudiés et la sensibilité des animaux correspondants à l'infection charbonneuse.

Le chien adulte est considéré comme l'animal le plus réfractaire au charbon ; or, son sérum paraît contenir des fixateurs spécifiques en abondance. Le chien nouveau-né est beaucoup plus sensible au charbon que l'adulte : son sérum est dépourvu de sensibilisatrices spécifiques.

Le cobaye, le bœuf, animaux sensibles, ont un sang dépourvu de ces sensibilisatrices. Le lapin, qui présente parfois une certaine résistance au charbon virulent et en tout cas ne succombe pas au premier vaccin, manifeste dans certains cas des propriétés sensibilisatrices de sérum vis-à-vis de la bactérie.

Reste le cas du rat : bien que son sang *in vitro* soit très bactéricide pour le charbon, il est admis aujourd'hui que cet

1. *Annales Pasteur*, 1899, page 291.

animal n'est nullement réfractaire au charbon; que, bien au contraire, si au moment de l'injection de bacilles, on sait éviter l'action bactéricide du sang extravasé, le long de la piqure, le rat devient très sensible à l'infection. Or, son sérum ne paraît pas renfermer de sensibilisatrices spécifiques pour le microbe du charbon.

C'est à se demander si ce pouvoir bactéricide *in vitro* des sérums normaux vis-à-vis du charbon n'est pas une propriété accidentelle n'ayant rien à faire avec la défense de l'organisme vivant. En effet, le sérum de chien n'est pas bactéricide *in vitro* pour le charbon, et cet animal est beaucoup plus réfractaire que le rat! Et cette absence de pouvoir bactéricide dans le sérum de chien n'a pas laissé d'embarrasser beaucoup ceux qui ont fait de ce phénomène la base de leur explication de l'état réfractaire. Mais la présence de fixateurs spécifiques vient jeter une nouvelle lumière sur les causes de l'immunité naturelle du chien vis-à-vis du charbon. Ces fixateurs ne suffisent pas, même avec l'aide de l'alexine normale du chien, pour tuer les bacilles du charbon en dehors du corps dans le sang extravasé!

Mais dans l'organisme vivant où les conditions sont toutes différentes, ces fixateurs doivent favoriser énergiquement l'action des alexines contenues dans les phagocytes et qui sont autrement puissantes que celles qui s'échappent des globules blancs pendant la coagulation du sang *in vitro*.

Nous avons essayé, mais sans avoir réussi jusqu'à présent, de détruire les bacilles du charbon *in vitro* au moyen de sérum chauffé de chien réactivé par des alexines autres que celles du chien (cobaye, par exemple). Il ne faut pas perdre de vue que les sérums d'animaux les plus fortement immunisés contre les microbes pathogènes, contenant de grandes quantités de sensibilisatrices spécifiques, ne sont guère bactéricides *in vitro*, sauf pour le cas de microbes très fragiles tels que le vibrion cholériques.

Les espèces microbiennes résistantes, même sensibilisées par les fixateurs spécifiques, ne semblent pouvoir être bien détruites qu'à l'intérieur des phagocytes vivants grâce aux alexines élaborées par ceux-ci.

