

massive a suivi de près les doses « préparantes » de vaccin-tapioca.

Expérience n° 2. — Au cours d'une autre expérience, nous avons injecté à 11 jeunes cobayes de fortes doses de BCG-tapioca à 3 p. 100. Trois (n°s 1 à 3) reçoivent 3 - 1 et 0,75 cgr. de BCG en mai 1936; 5 (n°s 4 à 8) reçoivent 0,5 - 0,75 et 1,8 cgr. fin mai et juin; 3 (n°s 9 à 11) reçoivent 2 et 3 cgr. fin juin.

Le 7 juillet, 8 ont reçu en même temps que 2 témoins, une injection de 1/100^e de mgr. de bacilles de Koch; 3 autres (n°s 1, 6 et 7) ont été laissés en réserve jusqu'au 9 novembre où ils ont été injectés à leur tour de la même façon.

Or, les témoins et les 3 derniers injectés n'ont manifesté ni allergie ni immunité. Au contraire, les 8 premiers injectés ont tous présenté une réactivation plus ou moins intense et précoce de leurs injections de BCG, qui, chez plusieurs, a été jusqu'à l'abcès. La plupart ont fait un phénomène de Koch au niveau de leur injection virulente et au cours de notre observation, nous avons noté la date de son apparition. Tous ces 8 cobayes, sauf un, ont ensuite fait une adénite caractéristique et sont morts avec des lésions habituelles. Un seul (n° 3) a résisté et est encore indemne après 9 mois 1/2. Or, c'est précisément celui qui a le premier réagi au niveau de ses 2 injections de BCG et qui a expulsé en 8 jours son injection de bacilles de Koch.

Dans la première de ces expériences, l'allergie correspond à une sensibilisation, dans la seconde, elle ébauche une réaction de défense, mais étant donnée la dose infectante, cette réaction n'est efficace que dans un cas. D'ailleurs, elle a disparu après quelques mois chez les trois derniers.

Avec le mélange BCG-tapioca, l'allergie est exceptionnellement assez intense (1 cas sur 34) pour avoir raison d'une dose d'épreuve moyenne.

Au contraire, lorsque la vaccination est faite au mélange BCG-lanoline, comme nous le verrons plus tard, les cas de résistance sont nettement plus nombreux. Dans ces cas, suivant l'expression de Bordet, l'allergie vient au secours de l'immunité.

La confusion qui s'établit si souvent entre les deux phénomènes peut s'expliquer de diverses façons. L'allergie varie dans des limites extrêmes. Actuellement, on tend à considérer même la limite inférieure (chez l'homme) comme insuffisamment sensible. Or, de cette allergie infinitésimale à celle qui permet à l'animal préparé d'éliminer intégralement quelques milliers de germes virulents sans qu'aucun parvienne à se fixer dans l'organisme (phénomène de Koch total), il y a une marge considérable qui suffit à elle seule à expliquer bien des divergences d'interprétation.

Quant à une survie prolongée ou à la prémunition (qui n'existe

pas chez le cobaye) ce sont des situations qui n'ont avec l'immunité que des rapports aussi vagues et lointains qu'une cuti-réaction positive.

L'immunité est relative et cède à une épreuve trop forte. Or, les doses de bacilles tuberculeux sont très difficiles à mesurer malgré la fallacieuse précision des pesées.

En réalité, on ne peut appeler immunité que la survie sans lésion du sujet, après destruction ou élimination des germes pathogènes.

Nos procédés actuels de mesure ou même d'appréciation de l'allergie et de l'immunité antituberculeuse sont trop grossiers pour nous permettre de décider si cette dernière relève uniquement des mécanismes d'allergie. Cependant le cas cité plus haut, rapproché de ceux plus nombreux que nous observons avec la lanoline (et que nous publierons prochainement) nous pousse à l'admettre.

MISE AU POINT, POUR LES USAGES BIOLOGIQUES,
DE L'ULTRACENTRIFUGEUR A AIR COMPRIMÉ DE HENRIOT
ET HUGUENARD,

PAR ANDRÉ GRATIA.

Déjà dans une note préliminaire présentée en novembre 1934 (1), puis au V^e Congrès de chimie biologique en octobre 1935 (2), j'ai rapporté mes premiers essais d'ultracentrifugation des bactériophages par le centrifugeur à très grandes vitesses de Henriot et Huguenard. Cet appareil m'a été prêté par le Fonds national de la recherche scientifique dès 1934, mais sa mise au point pour des usages biologiques précis, réalisée dans des conditions particulièrement difficiles, a été longue et délicate. Tout d'abord il fallut réaliser une source d'air comprimé suffisante pour faire tourner le rotor au maximum de vitesse compatible avec sa résistance. Cette vitesse atteint environ 100.000 t/m pour une pression de 5 kgr., avec un débit de 1.800 litres d'air ramené à la pression atmosphérique. Ces conditions ont pu être obtenues avec une marge de sécurité suffisante à l'aide d'un compresseur Ingersoll Rand de 15 Hp, mû par un moteur électrique Brown Boveri à enclenchement automatique et progressif centrifuge de 20 Hp. Grâce à cette force motrice puissante, on peut faire tourner le rotor pendant une durée indéfinie sur un véritable coussin

(1) C. R. de la Soc. de biol., 1934, t. 117, p. 1228.

(2) Bull. de la Soc. chim. biol., 1936, t. 18, n° 1.

d'air, c'est-à-dire sans usure et sans échauffement, malgré les vitesses que l'on peut faire varier à volonté entre 10.000 et 100.000 t/m. On peut même atteindre la vitesse de 120.000 t/m, mais avec un rotor plus petit.

Mais la plus grande difficulté à vaincre résidait dans un défaut assez grave résultant de la forme conique du récipient contenant le liquide pendant la centrifugation. Une description sommaire est ici nécessaire. Le rotor est une toupie en acier de 650 mm. de diamètre extérieur. Il est en acier de très haute résistance et creusé d'une cavité conique dans laquelle on emprisonne, à l'aide

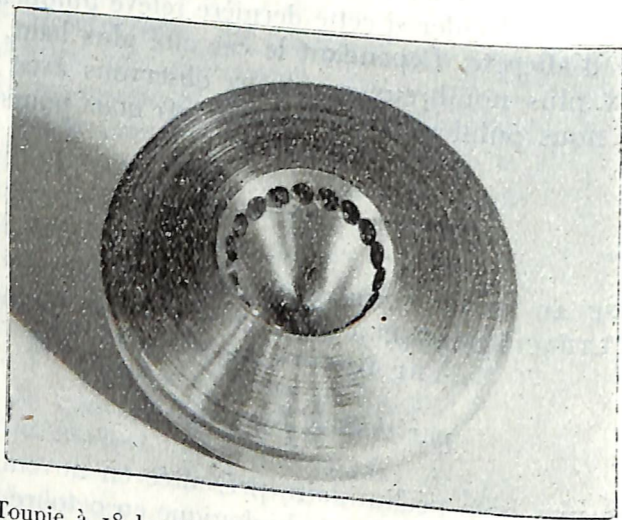


Fig. 1. — Toupie à 18 logettes cylindriques, radiales et légèrement inclinées, de 15 mm. de profondeur et 4 mm. de diamètre.

d'un couvercle soigneusement vissé, une coupelle en laiton également conique et pouvant contenir 25 c.c. de liquide à centrifuger. C'est dans la forme de ce bol que réside l'inconvénient de l'appareil. Au repos, en effet, le liquide épouse la forme d'un cône; pendant la rotation, il prend la forme annulaire d'un tore. Les particules vont donc se diriger vers la périphérie de l'anneau liquide où elles viendront finalement se collecter. Malheureusement à l'arrêt, le liquide abandonnant brusquement sa forme annulaire pour reprendre sa forme conique initiale, il se produit un violent tourbillon qui pourra remettre en suspension tout le sédiment, ou une partie plus ou moins importante. L'importance de ce grave inconvénient peut varier grandement selon la nature du sédiment et de ses propriétés d'adhésion et selon la nature du liquide dans lequel le sédiment était en suspension. Exemples: si nous centrifugeons des sucs de plantes pendant une dizaine de minutes à 75.000 t/m, nous obtenons malgré le tour-

billon final, un liquide remarquablement limpide et incolore car les débris végétaux, les grains de chlorophylle qui se sont sédimentés dans la rainure périphérique de la coupelle y restent solidement adhérents vraisemblablement à cause de l'action collante de la pectine. Je signale en passant que s'il s'agit de suc de tabac atteint de mosaïque, l'antigène spécifique de la mosaïque reste, dans les conditions ci-dessus, en suspension dans ce liquide sur-nageant limpide et que l'on obtient avec celui-ci de belles floculations par l'addition de sérum anti-mosaïque du tabac. Pour obtenir la sédimentation de l'antigène spécifique il faut sou-

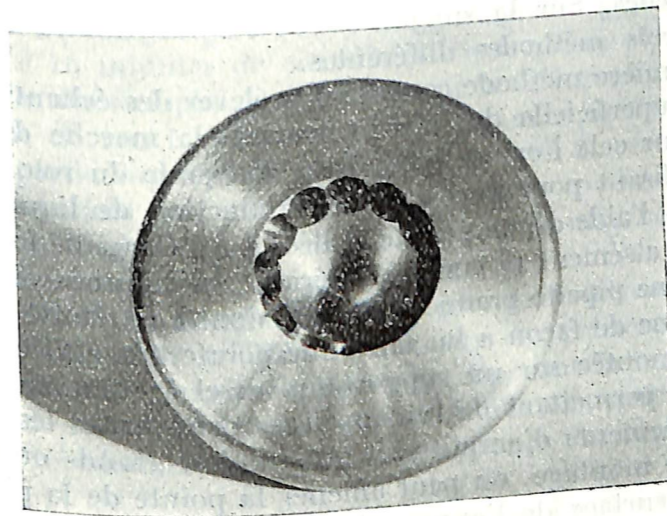


Fig. 2. — Toupie à 12 logettes de 15 mm. de profondeur et 7 mm. de diamètre.

mettre le suc à une centrifugation plus prolongée. Nous y reviendrons dans des communications ultérieures. Par contre, si l'on centrifuge dans les mêmes conditions du sang oxalaté, tous les globules sont remis en suspension lors du remous final et le résultat de la centrifugation est anéanti. Si c'est une émulsion microbienne qu'on centrifuge, le résultat sera totalement différent selon que les microbes sont en suspension dans de l'eau ou dans du bouillon: dans le premier cas, tout le sédiment microbien est remis en suspension par le tourbillon de l'arrêt; dans le second cas, au contraire, il reste adhérent dans la rainure de la coupelle. Cela tient à la présence, dans le bouillon, d'une espèce de gomme provenant probablement de l'hydrolyse de la mucine de la viande, et qui colle fortement le sédiment microbien à la périphérie de la coupelle. C'est exactement ce que nous avons observé également pour le bactériophage et qui explique les courbes de sédimentation différentes que nous avons signalées antérieurement selon le milieu dans lequel les bactériophages

étaient centrifugés. Il en résulte que l'on peut donc pallier, dans une certaine mesure, aux effets du tourbillon, en ajoutant au milieu, soit avant, soit pendant, soit à la fin de la centrifugation, en tous cas avant l'arrêt du rotor, une certaine quantité de substance collante capable de fixer le résultat acquis. Mais si ce procédé est un artifice qui peut être utilisé avec succès pour la séparation qualitative de certaines particules en suspension, il constitue par contre une cause d'erreur lorsqu'il s'agit de l'étude quantitative de la vitesse de sédimentation propre de particules dont on se propose précisément de déduire la grosseur sur la base de cette vitesse. C'est pourquoi nous avons recherché d'autres remèdes. Sur la suggestion de M. Huguenard nous avons réalisé trois méthodes différentes.

La première méthode consiste à prélever des échantillons de la couche superficielle du liquide pendant la marche du centrifugeur. Pour cela l'orifice central du couvercle du rotor, qui était juste suffisant pour permettre l'introduction de liquide dans la coupelle à l'aide d'une pipette effilée, a été élargi de façon à pouvoir voir aisément la surface intérieure de l'anneau liquide qui tourne. Une pipette graduée de 1 c.c. dont l'extrémité a été étirée à la flamme de façon à lui faire une pointe très effilée, mais traquée, est montée sur un support universel à crémaillères micro-métriques permettant de lui imprimer dans toutes les directions des déplacements d'amplitudes mesurables, grands ou minimes. Grâce à ce montage, on peut amener la pointe de la pipette tout contre la surface de l'anneau liquide, puis, par un tour de vis micrométrique, la faire entrer dans la couche superficielle du liquide qui monte alors de lui-même dans la pipette. Bien que l'opération soit délicate, on peut ainsi prélever la quantité de liquide superficiel que l'on désire et la soumettre au titrage. On peut ainsi suivre la marche de l'appauvrissement de la couche superficielle en particules actives à différents moments de la centrifugation.

La deuxième méthode consiste à tenter de soustraire le liquide centrifugé au remous final. Je ne puis ici décrire toutes nos tentatives depuis un simple anneau de caoutchouc placé dans la rainure de la coupelle et présentant une série d'encoches jointives creusées dans son épaisseur et destinées à piéger les particules sédimentées, en passant par tous les perfectionnements successifs jusqu'à la solution actuelle que voici. La coupelle a finalement été remplacée par une masse pleine de même forme, c'est-à-dire une toupie en laiton ou en duralumin dans laquelle ont été forées dix-huit logettes cylindriques jointives de 15 mm. de profondeur sur 4 mm. de diamètre. Ces logettes ont leur axe dirigé suivant le rayon du rotor, mais légèrement incliné de haut en bas vers

la périphérie de façon à éviter l'écoulement spontané du liquide à l'arrêt. Le liquide ainsi emprisonné dans ces logettes est entièrement soustrait à tout remous. La capacité totale de l'appareil est réduite à 3,25 c.c. (fig. 1). D'autres appareils ont été tournés sur le même principe, mais avec des logettes de plus grand diamètre, 7 mm. par exemple, mais alors en nombre moindre forcément, soit douze au lieu de dix-huit (capacité totale 5 c.c.) (fig. 2). Les résultats ainsi obtenus sont tout à fait satisfaisants. Exemples : du plasma oxalaté centrifugé 10 minutes à 75.000 t/m, puis recalciifié, coagule respectivement en 15 min., 90 min., et plus de 180 selon qu'il s'agit d'échantillons prélevés dans le fond des godets, dans la partie moyenne ou dans la partie superficielle. Après 10 minutes de centrifugation à 75.000 t/m, une suspension de bactériophage, qui donnait avant centrifugation une moyenne de 200 taches au c.c., n'en donne plus — prélevée dans la partie superficielle des godets — que 3, résultat qui concorde exactement avec celui obtenu avec la même suspension, mais par la méthode de prélèvement pendant la marche et qui, dans les mêmes conditions, donne 4 taches.

Lorsque l'on désire étudier avec une grande précision le gradient de sédimentation à différents niveaux des petites colonnes liquides, il suffit de congeler celles-ci en déposant la toupie métallique sur de la neige carbonique. Les différentes couches peuvent alors être débitées sans qu'aucun mélange ou remous soit possible.

Enfin, une troisième méthode, qui permet l'utilisation d'au moins 25 c.c. de liquide consiste à employer comme récipient la cavité du rotor lui-même sans coupelle ou autre pièce, sinon un joint en matière plastique ou en caoutchouc, pour éviter la fuite du liquide par le pas de vis du couvercle ; d'introduire le liquide lorsque le rotor est lancé, puis de maintenir la forme annulaire du liquide à la fin de l'opération en le congelant. Mais cette méthode exige une mise au point spéciale sur laquelle nous reviendrons ultérieurement en même temps que nous commencerons la publication des résultats que nous avons obtenus dans divers domaines biologiques.

(Institut de bactériologie de l'Université de Liège.)