

SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA LÈPRE PAR L'AGGLUTINO-SÉDIMENTATION DES GLOBULES DE MOUTON FORMOLÉS

(Travail du laboratoire du professeur Marchoux)

Extrait des *Annales de l'Institut Pasteur*. (Août 1931. — Tome XLVII, p. 147)

Quelques expérimentateurs ont obtenu certains résultats contradictoires concernant la réaction d'agglutino-sédimentation des globules de mouton formolés dans la lèpre; nous attribuons ces résultats à l'utilisation incertaine de la première technique publiée, encore insuffisante. Toutefois, devant ces faits, nous avons résolu de reprendre, dans des conditions particulièrement sévères, un nouvel ensemble d'expériences comportant de nombreuses réactions de contrôle sur des cas d'affections les plus diverses, en particulier la syphilis, la tuberculose et différentes maladies du sang d'origine tropicale où la réaction semblait avoir donné des résultats plus inconstants.

Nous tenons à remercier ici de tout cœur M. le professeur Marchoux de l'hospitalité qu'il nous a offerte et des conseils qu'il a bien voulu nous donner.

Nous adressons aussi à M. le D^r. H. Monier l'expression de notre vive gratitude pour l'intérêt qu'il a pris à nos expériences et pour la peine que lui a imposée la correction de notre texte français.

La première technique que nous avons publiée (1) comportait seulement l'utilisation d'une suspension de globules de mouton formolés, diluée au double du volume originel de sang et mélangée en parties égales avec les sérums à examiner. Peu après, nous avons décelé dans quelques sérums humains, non lépreux, un fort pouvoir agglutinant pour les suspensions de globules de mouton à l'état naturel (non formolés) et observé même dans quelques cas l'extension de ce pouvoir agglutinant aux globules formolés.

Dans un travail ultérieur, nous avons étudié les méthodes propres à différencier les sérums lépreux de ceux qui, n'appartenant pas à des lépreux, constituaient les exceptions précédentes et, de ce fait, agglutinaient et sédimentaient les globules formolés. Il fut ainsi établi que l'agglutino-sédimentation des globules formolés produite par les sérums lépreux était due à l'existence d'agglutinines agissant

(1) M. C. Rubino. "Societad de Dermatologia de Montevideo". Sezio de junio 8, 1926; "Revista médica del Uruguay", 24, f. 9, 1926.

électivement sur les globules formolés, et qu'en dehors des cas de lèpre, les phénomènes d'agglutination des globules de mouton étaient dûs à des hétéro-agglutinines non spécifiques parfois présentes dans des sérums divers, pathologiques ou normaux; elles agissent toujours plus fortement sur les globules naturels et elles n'atteignent les globules formolés que d'une manière moins intense (1).

Quelques mois après était publiée (2) notre technique plus perfectionnée; elle comportait l'utilisation de deux séries de trois tubes, en introduisant une série de trois tubes de globules naturels comme contrôle; elle comprenait enfin des doses décroissantes de sérum et des doses fixes de suspension globulaire.

En 1928, le professeur Marchoux et Caro (3) publièrent un travail confirmant ces faits fondamentaux et le caractère exclusif de leur présence dans la lèpre; mais ils trouvèrent un pourcentage inférieur à ceux précédemment notés par nous.

M. Peltier (4), avec la première technique, n'a trouvé que 22 p. 100 de cas positifs sur 18 sujets lépreux examinés, mais aucune réaction de contrôle positive.

Monacelli (5), sur 13 lépreux examinés, trouve 12 réactions positives et il accorde à la réaction une grande valeur pour le diagnostic des suspects.

Markianos (1), sur 104 examens de sérums divers, n'a trouvé qu'un cas positif chez un sujet originaire d'un pays où sévissait la lèpre et dont on ne put contrôler le diagnostic.

Nous-même (2), dans un dernier travail, avons trouvé sur 38 sérums lépreux examinés, 32 positif, 1 douteux et 5 négatifs, soit un pourcentage de 84 p. 100 de réactions positives; sur 2.000 réactions de contrôle faites, aucune ne fut trouvée positive.

Silva Araujo, au Brésil, et Borzone, en Argentine, ont présenté en octobre 1930, au Congrès médical du centenaire, à Montevideo, des travaux favorables.

Dernièrement, Pinto de Figueiredo (3), dans sa Thèse de Doctorat, a examiné 65 sérums lépreux et trouvé 74 p. 100 de résultats positifs dans les formes tuberculeuses et mixtes, 26,6 p. 100 dans les formes nerveuses et latentes; sur 43 sérums provenant de divers malades (tuberculose pulmonaire, lupus tuberculeux, blasto-

(1) *M. C. Rubino*. "Revista de la Sociedad argentina de Biología". Anno 2, octobre 1926; "C. R. S. Biol.", 96, f. 3, 1927.

(2) *M. C. Rubino*. "Sociedad de Derm. y Sifil. de Montevideo", Session Novembre 1926. Réaction sérologique dans la lèpre. "Revista médica del Uruguay", núms. 3-4, 1929.

(3) *Marchoux et Caro*. Ces "Annales", 42, mai 1928.

(4) *M. Peltier*. "De la valeur technique de la méthode de Rubino pour la recherche de la sédimentation globulaire chez les lépreux". "Bull. Soc. Path. Ex.", année 21, n.° 10, 1928.

(5) *Monacelli*. "Giorn. Ital. de Dermat.", 69, 1928.

(1) *Markianos*. Réaction de sédimentation des globules de mouton formolés dans la lèpre. "Bull. Soc. Path. Ex.", n.° 5, 1929.

(2) *M. C. Rubino*. "Revista médica del Uruguay", Nos. 3-4, 1929.

(3) *A. P. de Figueiredo*. O diagnostico serologico da lepra pela reacção de Rubino Thèse de Doctorat, Rio de Janeiro, 1931.

mycose, leishmaniose, épithéliomatose, granulomatose, fracture, grossesse, sujets traités par des sérums thérapeutiques), il n'a pas trouvé une réaction positive. Il en conclut que la *réaction de Rubino* est pathognomonique de la lèpre et qu'elle est un précieux auxiliaire pour le diagnostic.

Dans ce travail, après avoir décrit en détail la technique, nous verrons que la réaction s'est montrée plus sensible et *les résultats positifs seulement avec les sérums de lépreux*; nous étudierons enfin les caractères différentiels des agglutinines déterminées de façon plus précise par leur absorption relative en présence des antigènes globulaires naturels ou formolés.

I. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

Voici, minutieusement exposés, tous les détails du montage de la réaction; si certains peuvent paraître trop méticuleux, ils permettront en tout cas de reproduire sans confusion possible le protocole exact qui a servi pour toutes nos expériences.

A. — Préparation des globules.

On défibrine au moins 20 cent. cubes de sang de mouton que l'on répartit dans deux récipients stériles. Une partie est portée à la glacière où elle sera conservée à une température optima oscillant entre + 5° et + 9° jusqu'à son utilisation pour la préparation de la suspension de globules naturels. Le délai d'utilisation du sang de mouton ainsi conservé à la glacière ne doit pas dépasser trois jours.

La préparation des globules formolés se pratique de la façon suivante: après avoir fixé avec soin le volume du sang défibriné, on centrifuge, on retire le sérum, et on lave quatre fois à l'eau physiologique à 8,5 p. 1000. Après le dernier lavage, on ajoute une quantité d'eau physiologique telle que le volume primitif se trouve doublé. A cette dilution globulaire, on ajoute 10 p. 100 de son volume de formol (solution d'aldéhyde formique à 40 p. 100); on mélange *de suite intimement*, puis on laisse dix-huit à vingt-quatre heures à la température ordinaire. Dans ces conditions, les globules ainsi formolés sont fixés de telle sorte qu'ils ne sont plus hémolysables par l'eau distillée, ou même par un sérum hémolytique spécifique, et qu'ils donnent des suspensions très homogènes. Ils restent utilisables au moins pendant une dizaine de jours.

La préparation des suspensions globulaires utilisées pour chaque réaction doit être faite extemporanément de la façon suivante:

a) *Globules naturels*: Après quatre lavages successifs, on fait dans de l'eau physiologique à 8,5 p. 1.000 une dilution au double

du volume primitif du sang que l'on a conservé à la glacière depuis son prélèvement.

b) *Globules formolés*: Pour bien enlever l'excès de formol, on lave à nouveau les globules à quatre reprises, en prenant soin de bien désagréger à la baguette de verre le culot pâteux qui se forme après chaque centrifugation, de façon à obtenir par agitation une suspension parfaitement homogène.

Lorsque durant la formulation une hémolyse légère s'est produite, les débris globulaires ainsi formés surnagent le culot. En règle générale, on agitera très légèrement les tubes avant de décanter le liquide surnageant de façon à entraîner avec ce liquide les résidus globulaires s'il y en a. On réajustera alors la dilution en eau physiologique à un volume égal à celui qui précédait ces derniers lavages.

Il importe durant tous les lavages de ne pas prélever de globules dans les pipettages successifs pour éviter de modifier la concentration globulaire.

La concentration des suspensions globulaires est d'ailleurs un des facteurs les plus importants de la bonne marche de la réaction. Nous employons la dilution à parties égales pour les moutons de laboratoire dont les fréquentes saignées abaissent le taux globulaire; mais pour utiliser le sang des moutons d'abattoir, il convient le plus souvent de diluer une partie de sang normal dans deux parties d'eau physiologique. En tous les cas, ces dilutions doivent correspondre à un taux voisin de 3.500.000 à 4.000.000 de globules par millimètre cube.

Avant chaque répartition, il importe de plus de rendre homogènes les suspensions par agitation et pipettages successifs.

B. — Préparation des sérums à examiner.

Un prélèvement de 10 à 15 cent. cubes de sang veineux suffit pour la réaction complète. Le sérum recueilli doit être parfaitement limpide, aussi évitera-t-on les manœuvres brutales destinées à décoller le caillot et mettant en suspension des globules; quand cet accident se produit, on n'utilise les sérums qu'après les avoir centrifugés.

Dès que la rétraction du caillot paraît suffisante, on prélève les sérums le plus tôt possible; puis, on les inactive par chauffage une demi-heure à 52-53° pour éviter l'action des hémolysines souvent présentes dans les sérums et susceptibles de troubler la réaction de contrôle des globules naturels.

Il y a toujours intérêt à se servir des sérums dans le plus bref délai; en tous les cas, un maximum de dix jours doit être fixé pour l'utilisation de la majorité des sérums conservés en tubes scellés.

C. — *Distribution de la réaction.*

La réaction se fait en six tubes. On utilise des tubes à hémolyse identiques, de 9 à 10 millimètres de diamètre intérieur. Ces tubes seront au préalable soigneusement lavés, rincés à l'acide, bien séchés, ou mieux encore stérilisés au four à flamber.

On répartit en premier lieu les sérums; puis, on égalise les volumes avec de l'eau physiologique que l'on mélange soigneusement par agitation. On ajoute *seulement* alors les suspensions globulaires.

Dès que les globules sont répartis, on agite longuement le portoir de façon à obtenir dans tous les tubes des suspensions absolument homogènes qui seront alors portées à l'étuve à 37°.

Lorsque l'on a de très nombreux sérums à examiner, il convient de répartir les suspensions globulaires, portoir par portoir, de façon à éviter qu'un laps de temps trop considérable ne sépare les différents stades de la réaction.

	1	2	3	4	5	6
	cent. cube					
Sérum	0,50	0,25	0,1	0,50	0,25	0,1
Eau physiologique	0,30	0,55	0,7	0,30	0,55	0,70
Suspension globules formolés	0,20	0,20	0,20			
Suspension globules naturels				0,20	0,20	0,20

A ce schéma qui suffit d'une manière générale, on peut dans quelques cas douteux ajouter un élément d'appréciation en utilisant un premier tube où l'on distribuera 0 cc. 75 de sérum, 0 cc. 05 d'eau physiologique, et 0 cc. 20 de suspension globulaire, et où la lecture des réactions faibles apparaîtra plus nettement. Un tube de contrôle de globules naturels sera établi sur le même schéma. Si nous ne comprenons pas toujours ces deux premiers tubes dans notre schéma standard, c'est pour éviter les résultats douteux dûs aux hétéro-agglutinines qui apparaissent plus fréquemment à cette concentration, et en particulier dans les affections exotiques. Nous exposerons d'ailleurs plus loin un procédé d'absorption préalable des hétéro-agglutinines qui permet dans tous les cas de se débarrasser de ces éléments perturbateurs et de lire la réaction.

D. — *Lecture et interprétation des résultats.*

La lecture doit se faire dans la première heure qui suit la mise à l'étuve. Il est utile toutefois de suivre la marche de la réaction de façon à remarquer les réactions fortement positives qui ap-

paraissent dès le premier quart d'heure. Nous conseillons donc de faire une première lecture quinze minutes après la mise à l'étuve, une deuxième à la fin de la première demi-heure, et la dernière au bout d'une heure. Toute lecture qui sera faite passé ce délai ne peut être considérée comme certaine.

Une réaction positive se caractérise par un éclaircissement de la masse, uniforme, progressif et d'autant plus rapide que la réaction

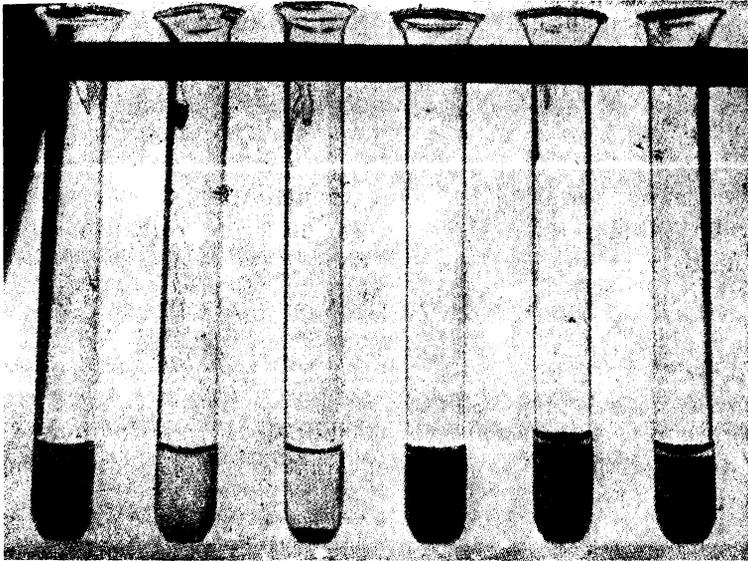


Fig. 1. — Réaction positive avec un sérum lépreux libre d'hétéro-agglutinines. Les trois tubes de gauche correspondent aux globules formolés; le tube 1 représente une agglutino-sédimentation avec culot très net et liquide surnageant un peu opaque; les tubes 2 et 3 agglutino-sédimentation complète. Les trois derniers tubes sont les témoins dans lesquels les globules formolés ont été remplacés par des globules naturels; en 5 et 6 on aperçoit un commencement de précipitation des globules par la pesanteur.

est plus forte, en même temps que se ramasse dans le fond du tube un important culot contrastant très nettement avec le reste du milieu plus ou moins éclairci.

Deux phénomènes principaux peuvent donner lieu à une mauvaise interprétation des résultats; ces causes d'erreur, d'ailleurs, disparaissent rapidement dès que l'on s'accoutume à la lecture de la réaction. Nous allons les envisager ici:

Tout d'abord, il importe de ne pas confondre le phénomène

de la sédimentation spontanée des globules formolés ou naturels qui se produit normalement dans toutes les suspensions globulaires, qui es dû à la pesanteur, et qui es d'autant plus marqué que la concentration globulaire est plus faible. Ce phénomène apparaît dans les réactions négatives au cours de la première heure, mais il ne laisse apercevoir au-dessus d'une masse uniformément opaque qu'une bande de sérum clair.

La pesanteur entraîne aussi, *en une heure*, la formation d'un petit culot, uniforme dans tous les tubes, et que l'on peut mettre en évidence dans certaines conditions d'éclairage, mais qui ne peut être confondu avec le culot d'une réaction positive.

L'ensemble du phénomène, en définitive, ne correspond en rien à l'impression visuelle que l'on a eue, suivant l'évolution d'une réaction positive.

D'autre part, une agglutination accélérée des globules naturels peut apparaître dans d'autres affections ou même dans quelques cas de lèpre. Le fait dû aux hétéro-agglutinines se présente sous deux aspects.

Dans certains cas, les plus habituels, l'agglutination se produit seulement dans les globules naturels, et la confusion paraît impossible.

Mais dans d'autres cas plus rares, l'agglutino-sédimentation se produit dans tous les tubes. Dans ces cas seulement, il y a lieu d'observer les taux d'agglutination respectifs des globules formolés et naturels et, en cas de doute, on doit recommencer la réaction après avoir réalisé l'absorption des hétéro-agglutinines dans les conditions que nous déterminerons plus loin.

En résumé, la réaction est positive lorsque l'agglutino-sédimentation qui caractérise le phénomène se produit seulement dans les globules formolés ou quand elle y est nettement plus intense que dans les globules naturels.

II. — DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS.

A. — Importance des suspensions globulaires.

a) *Choix de l'espèce.* — Dès nos premiers travaux sur la question, nous avons observé que les globules des différentes espèces animales ne se comportaient de la même manière à l'égard de la formulation et de la réaction.

Les globules de l'homme, du cobaye et du lapin son mal fixés par le formol; ceux du mouton, de la chèvre, du bœuf, du lama et du pigeon se fixent bien.

Certains globules humains se montrent très sensibles et spécifiques; avec d'autres les résultats sont moins heureux, particulière-

ment en ce qui concerne la spécificité de la réaction. Ce fait répond sûrement à la présence des iso-agglutinines qui dominent les rapports des groupements sanguins, et, pour avoir des globules toujours utilisables pour la réaction, il faudrait s'adresser exclusivement aux globules du groupement I (de Jansky, groupe IV de Moss) qui ne contiennent pas d'iso-agglutinogène.

Les globules du lama donnent d'assez bons résultats, mais vis-à-vis d'eux de nombreux sérums humains renferment des hétéro-agglutinines.

Les globules du bœuf sont peu sensibles, encore moins ceux de la chèvre avec lesquels aucune réaction positive n'a pu être obtenue; pour expliquer cette exception, nous pensons à l'influence que peut avoir la petitesse des globules rouges de cette espèce sur la stabilité de leurs suspensions.

Quant à ceux du cobaye, si, après formolation, ils sont agglutinés *seulement* par les sérums lépreux, il n'en est pas de même pour les globules à l'état naturel qui sont agglutinés par le plus grand nombre des sérums humains.

Les globules qui conviennent le mieux à la réaction sont les globules de mouton.

b) Choix de l'individu. — Le choix de chaque animal présente aussi une grande importance.

Tous les moutons ne fournissent pas du sang dont les globules se comportent d'une façon identique en face de nos différentes opérations. D'une part, la richesse globulaire influe sur la sensibilité de la réaction; d'autre part, la constitution biologique intime des globules peut, elle aussi, influencer sur la sensibilité de la réaction; ce phénomène se rapproche d'ailleurs de ce qui se passe avec tous les antigènes dans les réactions du même ordre, par exemple l'importance des souches différentes dans les agglutinations microbiennes.

1.^o Pour éviter l'action des facteurs individuels, on doit toujours utiliser pour chaque réaction des suspensions globulaires, naturelles et formolées, de même origine;

2.^o Pour utiliser le sang des animaux d'abattoir, on doit préférer le mélange du sang de plusieurs animaux;

3.^o Dans les laboratoires où l'on dispose de plusieurs moutons, il est préférable de sélectionner au préalable les animaux dont les globules se comportent le mieux au point de vue de la sensibilité de la réaction.

B. — Importance du formol et du degré de formolation

Les sérums lépreux mis en présence de globules naturels de mouton et de quantités variables de formol ne donnent pas la réaction. La production de celle-ci est strictement liée à l'action préala-

ble du formol employé en solution d'autant plus concentrée ou maintenu en présence des globules de mouton d'autant plus longtemps que ceux-ci sont plus nombreux. Il est curieux de noter que de petites quantités d'aldéhyde formique libre, comme celles qui peuvent persister après des lavages insuffisants, peuvent gêner la réaction, action empêchante qui est bien liée à la fonction aldéhyde puisqu'on la voit disparaître si on la neutralise par l'ammoniaque par exemple.

Plus le degré de formolation est intense, plus la réaction est sensible; il convient de se tenir seulement dans les limites de concentration et de durée qui permettent, après la formolation, d'obtenir des suspensions globulaires homogènes.

Les proportions que nous avons adoptées nous ont paru optima; elles permettent d'utiliser les globules jusqu'au dixième jour après leur formolation.

C. — Action de la température.

a) *Sur les sérums.* — D'après les expériences de Marchoux et Caro, un chauffage à 56° pendant une heure débarrasserait les sérums de leurs propriétés particulières nécessaires à la réaction. Suivant des expériences antérieures, nous savons qu'un chauffage à 55°-56° pendant trente minutes seulement n'altère pas visiblement la réaction. Mais depuis que, par le travail de Hohn (1), Kadisch (2) et Rubino (3), on sait qu'un chauffage à 52° pendant trente minutes suffit pour enlever aux sérums humains leur activité alexique, nous avons adopté maintenant cette température pour l'inactivation des sérums en expérience.

b) *Sur les globules formolés.* — La suspension globulaire traitée par le formol acquiert la propriété remarquable de rester homogène et indifférente à la chaleur, que celle-ci agisse en présence du formol ou seulement sur les globules formolés et lavés, ou même qu'elle soit poussée à 100°.

Un chauffage de trente minutes à 66-70° en particulier, en présence du formol, rend les globules encore plus sensibles à la réaction, ce qui se manifeste par l'accélération de la sédimentation et une plus forte intensité dans les réactions faibles.

e) *Sur la marche de la réaction.* — Il semble bien que la température de 37° soit la plus favorable. La réaction marche à des températures plus basses, mais à 56° elle s'arrête pour reprendre quand on ramène les tubes d'expérience à 37°.

(1) Hohn. "Münc. Med. Wochenschrift", 1929.

(2) Kadisch, Klin. Wochenschrift, N.° 45, 1929.

(3) M. C. Rubino, Ueber die Antihämolytischen Eigenschaften des Menschenserums, f. Bakt.,

Nous avons démontré ailleurs qu'il reste de l'agglutinine libre quand on a mis les globules formolés en présence de sérum, soit à 9° soit à 56°.

D. — Influence des proportions relatives des éléments de la réaction.

L'agglutino-sédimentation des globules formolés de mouton produite par les sérums lépreux est strictement conditionnée d'une part par la proportion des agglutinines dans les sérums, d'autre part par la richesse en globules des suspensions en expérience.

Dans une expérience où à des quantités fixes de sérum, on ajoute des quantités décroissantes de globules, la réaction augmente de sensibilité à mesure que la quantité des globules diminue. Dans une expérience où à des quantités fixes de globules, on ajoute des doses croissantes de sérum, la réaction augmente de sensibilité à mesure que les doses de sérum augmentent.

Pourtant la combinaison optima mesurée par la précocité de l'apparition du phénomène ne correspond ni à la dose la plus petite de la première expérience, ni à la dose la plus forte de la deuxième expérience. Il y a donc toujours pour chaque sérum et chaque suspension globulaire un point de sensibilité critique qui correspond à une proportion fixe entre les quantités d'agglutinines et de globules mis en présence. Un excès d'agglutinines, de même qu'un excès de globules, présente un certain effet empêchant sur la bonne marche de la réaction.

Il ressort donc clairement que ce phénomène suit les lois qui régissent les réactions biologiques des antigènes et des anticorps.

Il n'est pas douteux que la première phase, l'absorption des agglutinines par les globules, s'accomplit toujours rapidement. Quant à la deuxième phase, celle de l'agglutination, elle détermine la chute plus ou moins rapide de la suspension globulaire et c'est elle qui se trouve gênée par l'excès d'agglutinines ou de globules.

De tous ces faits il résulte:

1.° *Que le phénomène de l'agglutino-sédimentation des globules formolés par les sérums de lépreux ne peut être défini comme une simple sédimentation globulaire accélérée;*

2.° *Que la réussite de la réaction, malgré son apparente simplicité, demande des conditions précises et en particulier le réglage des suspensions globulaires.*

III. — ÉTUDE DE QUELQUES QUESTIONS CONCERNANT LA NATURE DE LA RÉACTION.

Nous compléterons dans l'exposé suivant les données qui ont déjà été observées par nous (1).

A. — Propriétés antigéniques des globules formolés

Étant données les modifications profondes causées par le formol sur le stroma globulaire, indépendamment d'autres transformations comme la formation de méthémoglobine, nous avons pensé que les qualités antigéniques globulaires doivent être, elles aussi, influencées par la formolation. Et nous avons été ainsi amené à étudier les variations apportées par la formolation aux capacités relatives de production et d'absorption des immun-agglutinines et des immun-hémolysines.

En préparant un certain nombre de lapins dans les mêmes conditions d'origine, de doses et de temps, par injections souscutanées intraveineuses ou intrapéritonéales de globules formolés et lavés ou de globules naturels de mouton, les faits suivants ont déjà été observés (2).

Ils concernent:

a) *La production des agglutinines.*

Pouvoir agglutinant moyen trouvé sur 6 animaux préparés par les globules naturels: $1/232$.

Pouvoir agglutinant moyen trouvé sur 7 animaux préparés par les globules formolés: $1/95$.

Les mesures de ces pouvoirs agglutinants ont été faites dans des conditions identiques en présence de globules naturels de mouton.

b) *L'agglutinabilité.*

L'agglutination des globules formolés aussi bien par les sérums d'animaux préparés avec les globules formolés que par les sérums d'animaux préparés avec les globules naturels, *a presque toujours été obtenue à des taux inférieurs, rarement égaux, en aucun cas supérieurs aux taux d'agglutination des globules naturels par les mêmes sérums.*

c) *Production des hémolysines.*

Sur ce point les globules formolés ou naturels ont présenté *des capacités égales*. En effet, le pouvoir hémolytique a atteint $1/960$ en moyenne sur 5 animaux préparés avec des globules naturels et $1/970$ chez 6 animaux préparés avec des globules formolés.

(1) M. C. Rubino. "Revista médica del Uruguay", Nos. 3-4, 1929.

(2) M. C. Rubino. Untersuchungen zur Verwendung formol-fixierter Hammelblutkörperchen in der Serodiagnostik. "Cent. f. Bakt.", 120, 1931.

d) *La capacité d'absorption* des hémolysines s'est révélée au contraire très différente, puisque avec les globules formolés elle apparaît *trois à quatre fois moins considérable*.

Somme toute, il est intéressant de constater que la capacité de production d'agglutinines et l'agglutinabilité sont les deux propriétés qui sont les plus modifiées par la formolation. Comme nous retrouverons à l'égard des hétéro-agglutinines des sérums humains des modifications analogues, l'observation de ces phénomènes nous permettra, en les caractérisant, de différencier ainsi facilement les hétéro-agglutinines non spécifiques des agglutinines spécifiques des sérums de lépreux.

B. — *Les agglutinines spécifiques des sérums lépreux et les hétéro-agglutinines de divers sérums.*

Dès l'origine de nos travaux sur la séro-réaction de la lèpre, nous avons remarqué que l'agglutino-sédimentation des globules formolés se produisait avec quelques sérums non lépreux. Mais ce phénomène était *toujours accompagné d'une semblable agglutino-sédimentation des globules naturels et d'une manière plus intense*.

La différence entre ce dernier phénomène et celui qui caractérise une réaction positive est suffisamment nette pour rendre évidente dans les sérums en question la présence d'un autre type d'anticorps; ce sont des hétéro-agglutinines.

Deicher(1), en 1926, a mis en évidence dès le septième ou huitième jour, chez les sujets ayant reçu des injections de sérum, des hétéro-agglutinines très actives sur les globules rouges de certaines espèces (mouton et cheval en particulier) et dont la quantité semble atteindre un maximum vers le douzième ou treizième jour.

Ces hétéro-agglutinines persistaient longtemps et la présence a pu en être rétrospectivement décelée chez des malades ayant reçu des injections antérieures de sérum.

Elles existent aussi en dehors de tous les cas précédents, mais bien qu'elles ne soient caractéristiques d'aucune affection particulière, elles sont plus fréquentes dans certaines maladies. Dans nos dernières expériences nous les avons rencontrées assez souvent dans les affections exotiques.

C. — *La coexistence des agglutinines spécifiques et des hétéro-agglutinines dans les sérums lépreux; leur absorption par les globules formolés ou naturels.*

Ces hétéro-agglutinines que nous venons de voir dans divers sérums peuvent parfois se rencontrer dans les sérums lépreux à côté des agglutinines spécifiques.

(1) H. Deicher. Ueber die Erzeugung heterospezifischer Hämagglutinine durch Injektion artfremden Serum. "Zeitschrift für Hygiene u. Inf. Krank.", 11 septembre 1926.

Si elles sont peu actives, ce qui est le cas général, elles ne troubleront pas la lecture de la réaction ou l'intensité d'agglutination des tubes de globules formolés sera beaucoup plus nette.

Dans certains cas plus rares, *et plus particulièrement remarquables chez les lépreux présentant une affection tropicale associée*, une forte action des hétéro-agglutinines peut gêner la lecture de la réaction au point de la rendre invisible.

Nous allons voir maintenant comment il est possible dans ces cas de se débarrasser des co-agglutinines non spécifiques et par conséquent d'utiliser la réaction en toutes circonstances.

Marchoux, Caro et nous, avons déjà prouvé que la réaction est due à une substance spécifique existant dans les sérums lépreux et à l'absorption de cette substance par les globules formolés.

Les expériences suivantes démontrent que les globules formolés ont *un pouvoir d'absorption électif pour cette substance qui ne peut pas se fixer sur les globules naturels dans les conditions de nos expériences*.

Nous verrons ainsi que les hétéro-agglutinines se comportent d'une façon très différente des agglutinines lépreuses. En effet, d'une part, elles sont aussi bien absorbées par les globules naturels que par les globules formolés, d'autre part, la température optima pour leur absorption oscille autour de 0°, alors que c'est la température de 37° qui s'est montrée la plus favorable pour l'absorption des agglutinines spécifiques des sérums lépreux.

EXPÉRIENCE I. — *Absorption élective des agglutinines spécifiques par les globules formolés.*

a) *Conditions d'expérience:*

1.° *Sérums lépreux inactivés à 52° pendant trente minutes.*

Sérum n° 217: faiblement positif.

Sérum n° 224: fortement positif.

2.° *Suspensions globulaires:*

a) *Suspension de globules naturels de mouton lavés comme pour le Wassermann, puis dilués au double du volume originel du sang avec la solution physiologique.*

b) *Suspension de globules de mouton formolés suivant la méthode indiquée au chapitre de la technique, lavés et dilués au double du volume originel du sang avec la solution physiologique.*

b) *Schéma d'absorption:*

	TUBE 1 (cent. cubes)	TUBE 2 (cent. cubes)
Sérum	1	1
Suspension globules formolés	1	
Suspension globules naturels		1

On mélange bien, puis on porte à l'étuve à 37° pendant une heure. Il est nécessaire d'agiter les suspensions deux ou trois fois pendant leur séjour à l'étuve.

A la sortie de l'étuve on centrifuge; ces centrifugations doivent être simultanées pour chaque sérum afin d'égaliser les temps d'absorption; après centrifugation, on prélève les sérums surnageant qui vont servir au montage de la réaction suivante:

c) Schéma de la réaction n.º 1

Tubes	SÉRUMS LÉPREUX			MÊMES SÉRUMS traités par globules formolés			MÊMES SÉRUMS traités par globules naturels		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sér. dilué de ½	c. c. 0,75	c. c. 0,5	c.c. 0,25	c.c. 0,75	c.c. 0,5	c.c. 0,25	c. c. 0,75 .	c. c. 0,50	c.c. 0,25
Eau physiol. . .		0,25	0,50		0,25	0,50		0,25	0,50
Susp. gl. form.	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Lecture des résultats après une heure d'étuve:</i>									
Sérum 217 ...	++	++	—	—	—	—	++	++	—
Sérum 224 ...	++++	++++	++	—	—	—	++++	++++	++

Nous voyons d'après cette expérience que les agglutinines spécifiques ont été absorbées par les globules formolés et que les globules naturels les ont laissées parfaitement intactes.

EXPÉRIENCE II. — Absorption indifférente des hétéro-agglutinines par les globules naturels ou formolés.

Les conditions de l'expérience, la méthode d'absorption étaient exactement les mêmes que pour la première expérience; mais nous opérons sur le sérum n.º 69 présentant des hétéro-agglutinines très actives et agissant sur es globules naturels et formolés.

L'absorption terminée, nous montons la réaction suivante:

Schéma de la réaction n.º 2

Tubes	SÉRUMS lépreux		SÉRUMS préalablement traités par globules formolés		SÉRUMS préalablement traités par globules naturels	
	1	2	3	4	5	6
Sérum dilué de ½	cent. cube 0,7	cent. cube 0,7	cent. cube 0,7	cent. cube 0,7	cent. cube 0,7	cent. cube 0,7
Susp. glob. formolés	0,25		0,25		0,25	
Susp. glob. naturels		0,25		0,25		0,25
Lecture du résultat après une heure d'étuve à 37°	+++	+++	—	—	—	—

Que le sérum ait été traité par les globules formolés (tubes 3 et 4) ou par les globules naturels (tubes 5 et 6) il a, dans les deux cas, perdu tout pouvoir agglutinant. Il ne s'agit donc pas ici de substance spécifique, mais d'hétéro-agglutinine.

EXPÉRIENCE III. — *Les hétéro-agglutinines d'un sérum fortement agglutinant peuvent ne pas être totalement fixées à 37°.*

Un sérum, n° 280, non lépreux, agglutine fortement, mais presque seulement les globules de mouton naturels. Nous profitâmes de cette circonstance pour étudier l'absorption relative de ces hétéro-agglutinines par les deux sortes de globules de mouton, formolés et naturels. Nous nous sommes maintenus dans des conditions de proportions, de temps et de température identiques à celles des expériences I et II.

Voir le résultat au tableau suivant.

Cette expérience prouve: 1.^o que le sérum 280 agglutine presque exclusivement les globules naturels et n'exerce sur les globules formolés qu'une action insignifiante; 2.^o qu'après une heure de contact à 37° avec des globules naturels ou formolés, on n'observe qu'une absorption des agglutinines partielle et égale pour les uns et les autres.

Tubes	TITRE AGGLUTINANT du sérum				TITRE AGGLUTINANT du même sérum après le traitement par			
					a) globules formolés	b) globules naturels		
	1	2	3	4	5	6	7	8
	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.
Sérum pur	0,5	0,25	0,5	0,25				
Sérum dilué de ½					0,75	0,5	0,75	0,5
Solution physiologique ..	0,25	0,5	0,25	0,5		0,25		0,25
Suspension glob. formolés	0,25	0,25						
Suspension glob. naturels			0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lecture des résultats après une heure d'étuve à 37°	+		++++	++++	+++	+++	+++	+++

Reste à voir comment les choses se passent à une autre température.

EXPÉRIENCE IV. — *Influence de la température sur l'absorption des hétéro-agglutinines.*

Toujours dans les mêmes conditions que pour les expériences I et II nous réalisons l'absorption des agglutinines à deux températures très différentes. Nous utilisons le sérum 280 qui est très fortement hétéro-agglutinant et nous opérons de la façon suivante:

Le Tube A (sérum: 0 c. c. 6 + suspension globules naturels: 0 c. c. 6) est placé une heure à l'étuve à 37°.

Le Tube B (sérum: 0 c.c. 6 + suspension globules naturels: 0 c.c. 6) est placé une heure à la glacière à 0°.

Pendant l'heure d'absorption les deux tubes sont agités 3 fois.

Avec les sérums ainsi traités nous montons la réaction suivante:

Schéma de la réaction n° 4

Tubes	SÉRUMS TRAITÉS par globules naturels à 0°		SÉRUMS TRAITÉS par globules naturels à 37°	
	1	2	3	4
Sérum dilué de 1/2	cent. cube 0,6	cent. cube 0,3	cent. cube 0,6	cent. cube 0,3
Solution physiologique	0,15	0,45	0,15	0,45
Suspension globules naturels	0,25	0,25	0,25	0,25
Lecture des résultats après une heure d'étuve à 37°	+++	++	—	—

Nous voyons que les hétéro-agglutinines n'ont été totalement absorbées que dans les tubes contenant du sérum traité à 0°, ce qui indique que cette température est plus favorable.

EXPÉRIENCE V. — Coexistence dans le même sérum des agglutinines lépreuses et des hétéro-agglutinines.

Nous utilisons le sérum n.° 250 qui donne une forte agglutino-sédimentation des globules formolés et qui agglutine aussi nettement, mais avec moins d'intensité, les globules naturels: c'est une réaction positive avec présence simultanée d'hétéro-agglutinines.

L'absorption étant réalisée exactement dans les conditions de la première expérience, on monte la réaction suivante:

Schéma de la réaction n.° 5

Tubes	SÉRUMS lépreux		SÉRUMS TRAITÉS par globules formolés		SÉRUMS TRAITÉS par globules naturels	
	1	2	3	4	5	6
Sérum dilué de 1/2	cent. cube 0,75	cent. cube 0,75	cent. cube 0,75	cent. cube 0,75	cent. cube 0,75	cent. cube 0,75
Susp. glob. formolés	0,25		0,25		0,25	
Susp. glob. naturels		0,25		0,25		0,25
Lecture des résultats après une heure d'étuve à 37°	++++	++++	—	—	++++	—

L'agglutination persistant dans le seul tube 5 à l'exclusion des tubes 3, 4 et 6 montre bien:

1^o L'absorption indifférente des agglutinines spécifiques et des hétéro-agglutinines par les globules formolés (sérum épuisés;

2^o La persistance des agglutinines spécifiques de la lèpre après absorption des hétéro-agglutinines par les globules naturels.

Nous avons réalisé toutes nos expériences dans les proportions exactes que nous venons d'indiquer. Ces proportions se sont montrées convenables, mais il est possible que pour d'autres sérums plus riches en agglutinines il soit nécessaire de les modifier pour obtenir des absorptions totales.

D. — Le phénomène d'agglutino-sédimentation propre au sérum lépreux est corrélatif du pouvoir agglutinant ou floculant de ces sérums par diverses autres suspensions.

Nous avons observé dans les sérums lépreux à réaction positive un pouvoir agglutinant ou floculant pour certains extraits d'organes ou certaines suspensions microbiennes. Les extraits de rate et de foie de cobaye, les extraits de globules de mouton et de cobaye ont été plus particulièrement sensibles.

Nous avons réalisé la préparation de ces extraits de la façon suivante: on place à 55° le mélange, organe frais ou culot de centrifugation globulaire, 1 p. 100 dans alcool à 95°, 10 cent. cubes. Au bout de quelques heures l'extraction est terminée; on évapore l'alcool et on reprend le résidu par l'eau physiologique.

Les suspensions de *Proteus X19*, qu'elles soient vivantes ou formolées et lavées, se sont montrées elles aussi particulièrement sensibles à l'agglutination par les sérums lépreux.

Voici quel a été le *schema général de ces réactions*:

	T. 1	T. 2
	—	—
Suspension de l'antigène choisi, en centimètres cubes.	1	1
Sérum en examen, en centimètres cubes	0,1	0,2

Résultats des expériences ainsi faites.

16 sérums lépreux examinés.

Sur 11 sérums positifs aux globules formolés, 10 agglutinent très fortement les diverses suspensions, 1 faiblement.

5 sérums qui sont négatifs aux globules formolés ne donnent aucune floculation ou agglutination des diverses suspensions essayées.

E. — Les globules formolés épuisent les substances actives des sérums lépreux et la réaction ne se produit qu'en présence des électrolytes.

Nous avons déjà vu en détail que les globules formolés épuisent les agglutinines spécifiques des sérums lépreux qui se fixent sur eux d'une manière élective. Après cette action les sérums ainsi traités perdent la capacité de produire la réaction (exp. 1 de ce chapitre). Au contraire les globules sédimentés acquièrent, eux, la propriété de reproduire la réaction, *mais seulement en présence d'électrolytes.*

En effet, après 3 ou 4 lavages à l'eau distillée, les globules d'un culot de centrifugation de réaction positive, mis en suspension dans plusieurs tubes contenant les uns de l'eau physiologique, les autres de l'eau distillée, reproduisirent le phénomène d'agglutino-sédimentation dans les seuls tubes d'eau physiologique.

F. — La sédimentation globulaire des réactions positives est essentiellement différente de la sédimentation spontanée.

Si nous disposons dans 3 éprouvettes de petit diamètre, ou mieux dans des sédimentimètres, les mélanges suivants à parties égales :

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Sérum lépreux positif | + globules formolés et lavés. |
| 2. Sérum lépreux épuisé | + globules formolés et lavés. |
| 3. Sérum normal | + globules formolés et lavés, |

après quelques heures, la sédimentation sera complète et nous pourrions voir que le culot de sédimentation le plus volumineux se trouve nettement dans le premier tube, c'est-à-dire celui du sérum lépreux non épuisé.

Enfin, si nous disposons les 3 combinaisons précédentes dans trois tubes à hémolyse ordinaire, nous voyons que par agitation modérée il est toujours facile d'émulsionner à nouveau le culot globulaire d'une réaction positive, alors que cette opération est beaucoup plus difficile pour les autres tubes.

G. — Nature de la réaction.

De l'ensemble des faits précédents il ressort, croyons-nous, que l'agglutino-sédimentation des globules formolés dans la lèpre est une réaction du même genre que les agglutinations microbiennes ou les séroflocculations. Elle est régie par les mêmes lois, répond aux mêmes exigences et nécessite la présence d'un élément spécifique produisant en premier lieu l'accolement des particules, suivi d'une

chute plus ou moins rapide des globules, entraînant la clarification plus ou moins complète des suspensions. C'est à la faculté d'agglutination du sérum à l'égard des globules formolés qu'est due la rapidité de la sédimentation comparée aux sédimentation spontanée.

IV. — RÉSULTATS OBTENUS AVEC QUELQUES SÉRUMS LÉPREUX OU NON LÉPREUX.

Voici les résultats que nous avons obtenus en examinant, avec la technique décrite plus haut, des sérums de différentes origines.

Nous avons fait la réaction sur 340 sérums parmi lesquels 36 appartenaient à des sujets porteurs cliniquement de lèpre, et 304 de diverses autres affections.

A. — *Examen des sérums des sujets cliniquement lépreux.*

Nous devons à l'obligeance de M. le professeur Gougerot et de MM. Delord de Valbonne, Markianos et Blanc, d'Athènes, d'avoir pu étudier un certain nombre de sérums lépreux (1), et nous tenons à les en remercier ici.

De ces sérums:

Ont été recueillis au laboratoire du professeur Marchoux	4
Sont venus de la clinique du professeur Gougerot	4
Proviennent du sanatorium de Valbonne (Gard)	10
Ont été envoyés par le docteur Markianos, d'Athènes	7
Ont été expédiés par le docteur Blanc, directeur de l'Institut Pasteur d'Athènes	11

Sur 18 cas de lèpre tubéreuse: 16 cas positifs et 2 douteux.

Sur 10 cas de lèpre mixte: 8 cas positifs et 2 négatifs.

Sur 8 cas de lèpre nerveuse: 3 cas positifs et 5 négatifs.

Au total, sur 36 cas de lèpre: 27 cas positifs, 2 douteux et 7 négatifs.

Il convient de remarquer que les deux réactions comptées comme douteuses dans les cas de lèpre tubéreuse portaient sur des sérums où les hétéro-agglutinines ne nous permirent pas la lecture et dont nous n'avons pu nous procurer de nouvel échantillon pour réaliser l'absorption préalable des hétéro-agglutinines.

B. — *Examen des sérums de controle d'origines diverses.*

Sur 304 sérums examinés, nous avons:

33 sérums pris sur des malades venus à la consultation du pro-

(1) M. C. Rubino. "Bull. Acad. Médecine", n.° 21, séance du 24 juin 1931.

fesseur Marchoux et chez lesquels les diagnostics suivants ont été faits:

Paludisme	26 fois.
Filariose	1 —
Maladie du sommeil	3 —
Leucémie myéloïde	1 —
Gastro-entérite	1 —

Chez ces malades, paludisme, maladie du sommeil, filariose, sont parfois associés; dans un cas nous avons eu ces trois affections réunies.

45 sérums de l'Institut prophylactique Vernes, parmi lesquels: 27 sérums de syphilitiques à degrés photométriques élevés, oscillant entre 35 et 143.

18 sérums de tuberculeux à degré photométrique à la résorcine de 27 à 137.

226 sérums pris au service sérologique de l'Institut Pasteur et comprenant indifféremment des sérums positifs et négatifs au Bordet-Wassermann.

Sur ces 304 sérums examinés, un seulement fut trouvé positif (n.º 250). L'examen de ce malade décela une hypertrophie nette des nerfs cubitiaux, plus marquée à droite, et, en plus, une sensation de fourmillement dans les deux derniers doigts de chaque main. Le malade nous déclara qu'au cours de trois séjours coloniaux précédemment faits sur la côte occidentale d'Afrique, il avait vécu, du fait de son travail, dans une certaine promiscuité avec les indigènes parmi lesquels il y avait des lépreux.

V. — ANALYSE DES RÉSULTATS.

Quels sont les enseignements que nous pouvons retirer de nos dernier résultats qui sont d'accord avec ceux déjà exposés par nous et avec la plupart de ceux publiés par d'autres expérimentateurs?

Tout d'abord nous croyons que les résultats discordants qui ont pu être trouvés sont dûs à une technique insuffisante.

La sensibilité de la réaction nous apparaît nettement.

Elle ne se montre jamais dans une autre affection que la lèpre.

Ce sont déjà là deux propriétés que l'on ne trouve guère aussi nettement dans la plupart des réactions sérologiques, surtout si on leur demande de répondre à toutes les formes cliniques de la maladie.

Nous avons remarqué que l'intensité des réactions positives n'est pas liée à l'ancienneté de la maladie.

Dans certains cas de lèpre tubéreuse très ancienne, nous n'avons

trouvé qu'une réaction faible, dans d'autres cas, frustes et récents, des réactions fortement positives.

Il nous semble que l'intensité de la réaction est plutôt en relation avec la forme clinique et le caractère évolutif de l'affection qu'avec l'ancienneté de l'infection. Il ne nous paraît pas impossible que le traitement modifie aussi les caractères humoraux des lépreux et leurs propriétés agglutinantes spécifiques. Enfin, dans la lèpre comme dans les autres affections expérimentales ou spontanées, il y a des sujets qui réagissent sérologiquement de façon toute différente, et nous croyons que ce facteur individuel vient s'ajouter à ceux que nous venons d'énumérer et qui sont susceptibles d'influencer l'intensité de la réaction.

La lèpre, d'autre part, est une maladie dont l'incubation peut être très longue; souvent des années s'écoulent entre le moment de la contagion et l'apparition des premiers symptômes cliniques. Nous ignorons si, au cours de cette longue incubation il ne se trouve pas un moment où les réactions sérologiques sont fortes. Dans cet ordre d'idées nous avons déjà quelques faits intéressants. Marchoux et Caro ont mentionné un cas de réaction positive chez un sujet non porteur de bacilles, mais présentant une hypertrophie du nerf cubital et des taches achromiques; un autre cas chez un malade provenant de régions tropicales où la lèpre est fréquente et qui présentait un ganglion épitrochléen volumineux.

Le D^r. Silva Araújo a relaté, au Congrès médical du centenaire de Montevideo, en 1930, le cas d'un sujet à réaction positive sans signe clinique mais qui, quelque temps après, présenta des symptômes caractéristiques de lèpre.

Enfin, nous-mêmes venons de noter un cas positif chez un malade dont l'origine et l'hypertrophie des cubitiaux permettent de se poser anxieusement la question suivante.

Quelle valeur devons-nous donc accorder à une réaction positive dans le cas où la recherche du bacille, parfois si difficile, est négative, où les signes cliniques sont nuls ou même insuffisants, mais où la contagion a été fort possible?

Nous ne pensons pas pouvoir affirmer la valeur diagnostique absolue de la réaction; mais nous croyons à une forte présomption et à la nécessité de surveiller le malade et de renouveler les examens.

Nous pensons aussi qu'il y aurait un intérêt considérable à entreprendre une grande expérimentation de la réaction dans un milieu où l'infection lépreuse est profonde; cela permettrait, croyons-nous, de répondre nettement à notre question par la confirmation de la valeur de la réaction dans le diagnostic de la lèpre et cela mettrait en évidence le profit qu'il est permis d'espérer de l'examen sérologique des sujets exposés à la contagion.

VI. — CONCLUSIONS.

1.^o Il existe dans les sérums lépreux une substance spécifique qui se fixe électivement sur les globules de mouton formolés et en amène l'agglutination et la sédimentation rapides:

2.^o Certains sérums humains, normaux ou pathologiques, possèdent aussi la propriété d'agglutiner et d'amener la sédimentation des globules de mouton;

3.^o Ces hétéro-agglutinines peuvent s'attacher indifféremment sur les globules de mouton naturels ou formolés;

4.^o On peut utiliser cette propriété pour les écarter en les fixant sur les globules de mouton naturels avant de faire agir les sérums lépreux sur les globules formolés;

5.^o La réaction doit toujours se faire en présence des globules de mouton, formolés et naturels;

6.^o La réaction doit être considérée comme positive quand elle se produit en moins d'une heure et que la sédimentation des globules formolés existe seule ou qu'elle est notablement plus marquée pour ceux-ci que pour les globules naturels;

7.^o Elle est négative quand il n'y a pas d'agglutino-sédimentation ou quand la sédimentation est à peu près au même taux dans les deux séries de globules (naturels et formolés);

8.^o Sur 36 cas de diverses formes de lèpre, la réaction a été positive 27 fois, négative 7 fois et 2 fois douteuse;

9.^o Dans 304 sérums provenant de diverses maladies la réaction est restée négative, sauf dans un cas, chez un sujet qui ayant fait plusieurs séjours aux colonies, a été reconnu porteur de deux nerfs cubitiaux volumineux et de fourmillement dans les doigts intéressés. Des examens ultérieurs éclaireront sur la réalité d'une contamination lépreuse dans ce cas.