

COMMUNICATIONS

Recherches expérimentales sur les agglutinines sériques antileptospires chez le chien

par P. R. ILLARTEIN* et M. MAILLOUX**
(avec la collaboration technique de M. VALLÉE)

Depuis longtemps déjà, il est classique de considérer que les anticorps en général sont localisés dans la fraction globulinique du sérum et que les globulines γ représentent en particulier la fraction la plus active du point de vue immunitaire.

Au cours de recherches sur la leptospirose dans les effectifs militaires de chiens (1), nos observations nous avaient amenés à penser qu'il existait une relation entre les agglutinines sériques antileptospires et la fraction β -globulines du sérum.

Cette hypothèse nous a conduits à effectuer les essais rapportés ci-après et qui concordent, en partie au moins, avec les travaux contemporains de HARTMANN et coll. (2) et de LATASTE-DOROLLE et alii (3).

Dans ce travail, nous avons cherché à localiser les agglutinines antileptospires par rapport à chaque fraction protéinique de sérums positifs à l'égard du sérogroupe *Icterohaemorrhagiae* et à apprécier par comparaison l'activité de chaque fraction extériorisant un pouvoir agglutinogène. Pour cela les réactions d'agglutination-lyse ont été effectuées : — d'une part avec les sérums entiers, — d'autre part avec chacune des fractions protéiniques de ces mêmes sérums,

* La Barre de l'Ange — 45 — La Chapelle-St-Mesmin.

** Institut Pasteur — Tanger — Maroc.

(1) ILLARTEIN (P. R.) et KOLOCHINE-ERBER (B.), en cours de publication (1968).

(2) HARTMANN (L.), FILOTTI-WURMSER (S.), JACQUOT-ARMAND (Y.), MAILLOUX (M.) HUREZ (D.) et FAUVERT (R.) (1964), *Bioch. Biophys. Acta*, **82**, 249-259.

(3) LATASTE-DOROLLE (C.), EYQUEM (A.) et BURI (J. F.), 1964, *Ann. Inst. Past.*, **106**, 646-650.

après les avoir obtenues séparément par *électrophorèse continue* et les avoir ramenées à leur concentration initiale dans le sérum entier.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1^o *Séparation des protéines* : Nous avons utilisé, pour la séparation des protéines, l'appareil « Elphor V » à 22 tubes de Grassmann et Hannig, pour l'*électrophorèse continue* sur papier (1).

- Papier de séparation : Schleicher et Schull n^o 2040 bm.
- Courant : 250 volts — 10 mA.
- Durée : 50 heures.
- Volume de sérum traité : 2,50 ml.

Le principe de cet appareil est schématiquement le suivant : Une feuille de papier filtre « ad hoc », de 25 × 30 cm, est placée verticalement dans une cuve où est entretenue une atmosphère humide à saturation. La partie *inférieure* de la feuille est découpée en 22 languettes qui s'insèrent chacune dans un tube à essais évasé de 13 × 130. Le bord *supérieur* du papier séparateur est en relation avec une gouttière constamment alimentée en solution-tampon de manière à assurer par capillarité un ruissellement régulier à vitesse convenable, sur toute la largeur de la feuille. *Les marges verticales* du papier sont pincées entre deux électrodes linéaires en platine, reliées à un générateur de courant continu.

Le sérum à étudier arrive en permanence à la partie supérieure de la feuille par un tube capillaire. Un dispositif automatique, à vitesse réglable, et une seringue permettent d'assurer une alimentation continue et régulière en sérum, suivant un débit déterminé. Dès son arrivée sur le papier, le sérum est soumis à deux influences : l'une, *horizontale*, provenant du champ électrique développé entre les électrodes, l'autre, *verticale*, due au ruissellement continu de la solution-tampon.

La migration des protéines s'effectue donc suivant la *résultante* de ces deux facteurs, appliquée à la mobilité propre à chacune des fractions. La progression de haut en bas se fait en éventail jusqu'au niveau des languettes du bord inférieur, puis par un écoulement goutte à goutte, les fractions, diluées dans la solution-tampon, se trouvent réparties dans les tubes à essais. Chaque fraction occupe généralement un groupe de 2 à 4 tubes.

La coloration de la feuille à l'amidoschwarz 10 B permet le

(1) Nous croyons savoir que cet appareil n'est plus livré par les constructeurs (Bender et Hobein à Munich) — qui réalisent uniquement maintenant un appareil du même type, mais plus important, à 44 tubes.

repérage facile des fractions et des tubes, où chacune d'elles se trouve à l'état de plus grande pureté et de plus forte concentration.

Précisons que le sérum doit être préalablement dialysé contre la solution-tampon à pH 8,6, puis dilué à 50 p. 100 avec cette même solution. Le traitement de 2,5 ml de sérum représente donc l'électrophorèse continue de 5 ml de mélange.

A titre d'indication, nous donnons ici la durée de quelques temps opératoires :

- Dialyse du sérum : 40 heures.
- Mise en route de l'appareil, saturation du papier : 5 heures.
- Electrophorèse de 5 ml de sérum dilué à 50 p. 100 : 45 heures. (Séchage et coloration du papier séparateur : 3 heures).
- Elimination du véronal par dialyse contre de l'eau physiologique : 20 heures. Le fractionnement d'un sérum représente donc approximativement une manipulation d'une semaine.

2° Rétablissement de la concentration de la fraction à sa valeur initiale dans le sérum entier : Nous avons eu recours à un artifice pour apprécier la dilution de la fraction dans le produit final de la manipulation précédente. Un même volume de sérum pur et de diluat de la fraction isolée sont soumis à l'électrophorèse sur papier sur la double piste d'une même cuve de l'appareil « Elphor H » de Grassmann et Hannig. Les deux bandes sont traitées de la même façon et l'on obtient : d'une part un protéinogramme du type classique, d'autre part une courbe représentant la protéine contenue dans le diluat. On mesure par planimétrie les surfaces respectives occupées par la fraction en cause sur l'un et l'autre diagramme. Le rapport des surfaces donne une valeur suffisamment précise de la dilution de la protéine isolée.

Ce rapport a généralement une valeur comprise entre 5 et 10. Pour comparer le pouvoir agglutinogène du sérum et de chacune de ses fractions, il faudra ramener la concentration de la protéine isolée à une concentration identique à celle qui est la sienne dans la dilution au 1/10^e du sérum entier. Pour préparer les dilutions au 1/10^e correspondantes, on procédera de la façon suivante :

- soit z le rapport des surfaces S/s (donc des concentrations),
- soit V ml la quantité à préparer.

V ml dilution sérum au 1/10^e = $V/10$ sérum + $9 V/10$ eau physiologique.

V ml dilution comparable fraction au

$$1/10^e = \frac{V \times z}{10} \text{ fraction} + \frac{V - z}{10} \text{ eau phys.}$$

TABLEAU A

Taux limite d'agglutination-lyse à l'égard du séro groupe Icterohaemorrhagiae

N° Chien Date sérum	sérum total		α		β		γ	
	agg.	lyse	agg.	lyse	agg.	lyse	agg.	lyse
<i>E 226 :</i>								
14.9.60	1/1.000	s. l.	tr < 1/100	neg.	1/1.000	1/100	1/1.000	s. l.
5.12.60	1/10.000	1/100	neg.	neg.	1/10.000	1/100	1/1.000	s. l.
2.2.61	1/10.000	1/1.000	tr < 1/100	neg.	1/10.000	1/1.000	1/5.000	1/100
<i>T. 057 :</i>								
(1) { 12.7.60 .	1/1.000	1 100	neg.	neg.	1/1.000	légère pas appréciée	1/100	légère pas appréciée
14.9.60 .								
9.12.60	1/1.000	1/100	neg.	neg.	1/1.000	1/100	1/500	1/100
<i>T 063 :</i>								
9.12.60	1/500	1/100	neg.	neg.	1/500	légère pas appréciée	1/100	s. l.
(1) Mélange de deux sérums, chacun d'eux existant en quantité insuffisante pour une manipulation. tr = traces s. l. = sans lyse.								

3° *Sérums étudiés* : Six sérums provenant de trois chiens ont été étudiés selon cette méthode :

E. 226 : 14.9.60, 5.12.60, 2.2.61

T. 057 : 12.7.60 + 14.9.60, 9.12.60

T. 063 : 9.12.60

Signalons que les pourcentages de la fraction β de ces sérums se situent entre les écarts extrêmes suivants : 23,6 p. 100 et 25,8 p. 100.

Les agglutinations-lyses ont été faites soit au Laboratoire des Leptospiroses de l'Institut Pasteur de Paris par l'un d'entre nous, soit au Centre Biologique d'Expérimentation avec la collaboration du Vétérinaire Biologiste Capitaine F. WEBER. Tous nos résultats ont été recoupés par des examens successifs.

RÉSULTATS

On trouvera, dans le tableau A, les taux limites d'agglutination-lyse pour chacun de ces sérums et chacune des fractions globuliniques qui en ont été isolées. La fraction Albumine, qui s'est révélée sans intérêt à ce point de vue lors d'essais préalables, n'a pas été comprise dans ce travail.

Le tableau B montre les observations faites lors d'un examen concernant l'un des sérums *E. 226*.

TABLEAU B

Détail d'un séro-diagnostic *E. 226*

Dilutions	1/100	1/1.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000
Sérum total ...	++ lyse F	+ lyse f	⊥ s. l.	traces s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.
Fraction α	traces s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.
Fraction β	++ lyse F	+ lyse f	⊥ s. l.	traces s. l.	nég. s. l.	nég. nég.
Fraction γ	+ lyse f	⊥ s. l.	traces s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.	nég. s. l.

lyse F = lyse forte ; lyse f = lyse faible ; s. l. = sans lyse.

CONCLUSION

De la comparaison de ces résultats, il apparaît que la fraction β globulines possède un pouvoir agglutinogène sensiblement égal à celui du sérum entier. La fraction γ vient ensuite avec une activité notable, mais nettement inférieure. Quant aux globulines α , il n'apparaît pas qu'elles participent aux réactions antigène-anticorps.

Dans le cas particulier des agglutinines anti-leptospires il semble que l'on puisse en conclure qu'elles sont dans une large mesure localisées dans les globulines β , ce qui ne saurait les identifier purement et simplement à cette protéine, mais permet de poser la question en général pour l'ensemble des anticorps.

*(Centre Biologique d'Expérimentation de l'Armée, 65-Tarbes
et Laboratoire des Leptospiroses de l'Institut Pasteur, Paris.)*
