50376
1970
57

U N I V E R S I T E D E L I L L E

50376
1970
57

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES :

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

DOYEN :

Monsieur René DEFRETIN

ASSESSEURS :

MM.	HEUBEL	Professeur de Chimie Minérale
	LEBRUN	

PROFESSEURS :

MM.	BACCHUS	Astronomie, Calcul Numérique
	BEAUFILS	Catalyse
	BECART	Spectroscopie moléculaire
	BLOCH	Psychophysiologie
	BONNEMAN	Chimie Analytique Industrielle
	BONTE	Géologie Appliquée
	BOUGHON	Mathématiques
	BOUISSET	Physiologie Générale
	BOURIQUET	Physiologie Végétale
	CELET	Géologie Dynamique
	CONSTANT	Electronique Automatique
	CORSIN	Paléontologie
	DECUYPER	Mathématiques
	DEDECKER	Mathématiques
	DEHORS	Electronique et Automatique

./.

MM.	DELATTRE	Géologie Régionale
	DELEAU	Géologie, Sédimentologie
	DELHAYE	Chimie
		Géologie Structurale
	DESCOMBES	Mathématiques
	DURCHON	Biologie et Physiologie Animales
	FOURET	Physique
	GABILLARD	Electronique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM DE BALSAC	Biologie et Physiologie Animales
	HOCQUETTE	Botanique
Mle	LENOBLE	Physique
MM.	LINDER	Biologie Végétale
	LUCQUIN	Chimie
	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
Mle	MARQUET	Mathématiques
MM.	MONTARIOL	Chimie
	MONTREUIL	Chimie
	MORIAMEZ	Physique
	MOUVIER	Chimie
	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique
	PHAM MAU QUAN	Mathématiques
	POUZET	Calcul Numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie
	SCHILTZ	Physique
Mme	SCHWARTZ	Mathématiques
MM.	TILLIEU	Physique
	TRIDOT	Chimie
	VAILLANT	Mathématiques Pures
	VIDAL	Automatique Théorique et Appliquée
	VIVIER	Biologie et Physiologie Animales
	WATERLOT	Géologie et Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	AUBIN	Mathématiques Pures
	BEGUIN	Mécanique des Fluides
	BELLET	Physique
	BENABOU	Mathématiques
	BILLARD	Physique
	BOILLET	Physique
	BUI TRONG LIEU	Mathématiques
	CAPURON	Biologie Aniamle
	CARREZ	Calcul Numérique
	CORTOIS	Physique

./.

MM.	DEVRAINE	Chimie Minérale Calais
Mme	DRAN	Chimie Organique
MM.	GOUDMAND	Chimie
	GUILBAULT	Biologie et Physiologie
	GUILLAUME	Biologie Végétale
	HUARD DE LA MARRE	Calcul Numérique
	JOLY	Zoologie Amiens
	LABLACHE-COMBIER	Chimie
	LACOSTE	Biologie Végétale
	LAMBERT	Physique Saint-Quentin
	LANDAIS	Chimie
	LAURENT	
	LEHMANN	Mathématiques
Mme	LEHMANN	Mathématiques
MM.	LOUCHEUX	Chimie
	MAES	Physique
	MONSIGNY	Chimie Biologique
	PANET	Electrotechnique
	PARSY	Mathématiques
	PONSOLLE	Chimie Valenciennes
	RACZY	Physique Valenciennes
	ROBERT	Calcul Numérique
	SAADA	Physique
	SALMER	Radioélectricité et Electronique
	SEGARD	Chimie Biologique
Mme	ZINN-JUSTIN	Mathématiques

ETUDE IMMUNOLOGIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI

Philippe ROOS

Ce travail a été réalisé sous la direction des Professeurs GUILLAUME et TACQUET au Laboratoire Associé au C.N.R.S. N° 36 de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur, Professeur Ch. GERNEZ-RIEUX).

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 36 de l'Institut Pasteur de Lille.

C'est un devoir bien agréable d'exprimer avant toute chose ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Ch. GERNEZ-RIEUX de m'avoir accueilli il y a déjà de nombreuses années à l'Institut Pasteur de Lille. Je ne saurais lui dire combien je lui en suis obligé.

Je suis heureux de pouvoir exprimer ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs GUILLAUME et TACQUET, qui m'ont proposé ce sujet de recherche. Pendant la durée de ce travail ils n'ont cessé de me prodiguer des conseils éclairés et de précieux encouragements. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

En acceptant de présider mon Jury de Thèse, Monsieur le Professeur BOURIQUET m'a fait un grand honneur et je lui en suis vivement reconnaissant.

Monsieur le Docteur BURTIN, Directeur de Recherche au C.N.R.S., a accepté de lire ce travail et de participer à ce Jury de Thèse. Je l'en remercie vivement.

Monsieur le Professeur VIVIER m'a permis de réaliser la partie de ce travail concernant la microscopie électronique dans son Laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille. Je le remercie de l'intérêt qu'il a toujours pris à mes recherches.

Je tiens ici à remercier le Professeur OUCHTERLONY, Directeur du Bakteriologiska Institutionen de Göteborg (Suède) de m'avoir accueilli dans son Laboratoire et de m'avoir initié avec ses collaborateurs, les Docteurs LIND et NORLIN aux problèmes d'immunologie des mycobactéries.

Enfin à mes amis et camarades de travail des Laboratoires des Mycobactéries, de Chimie bactérienne et de Microscopie électronique et tout particulièrement à Monsieur JOSEPH, ainsi qu'à Monsieur PETITPREZ et aux techniciens et techniciennes qui se sont succédés au cours des ans dans le laboratoire (*), j'adresse un très grand merci pour l'aide qu'ils m'ont apportée et pour la sympathique atmosphère de travail et d'amitié qu'ils ont contribué et contribuent à faire régner.

(*) Mmes BINDSCHEDLER, GUISNET, Mlle BISSINGER et M. JACOB

ABREVIATIONS UTILISEES

$\overset{\circ}{A}$	Angström
Ac	anticorps
Ag	antigène
B.C.G.	bacille de Calmette et Guérin
°C	degré celsius
D.E.A.E. cellulose	diethylaminoethylcellulose
D.N.A.	acide desoxyribonucléique
DNase	desoxyribonucléase
g	force de gravité
NAc	quantité limite d'anticorps décelable exprimé en poids d'azote
RNase	ribonucléase
S 600g	surnageant S_1 résultant de la centrifugation à 600g du broyat bactérien
S 12.000g	surnageant S_2 résultant de la centrifugation à 12.000g du S 600g
Tris	2 amino - 2 hydroxyméthyl propane 1 - 3 - diol ou Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I - L'IMMUNITE DANS LA TUBERCULOSE 1

1) Comment se produit cette immunité 2

2) De quel type d'immunité s'agit-il 4

3) Rapports entre hypersensibilité et immunité 5

II - LES ANTIGENES DES MYCOBACTERIES 6

AVANT PROPOS 15

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES 19

I - OBTENTION DE MATERIEL BACTERIEN 19

1) Choix des souches 19

2) Méthodes de culture 20

II - BROYAGE DU MATERIEL BACTERIEN 26

1) Le cryobroyage 30

2) Techniques utilisant les zéolithes 33

CHAPITRE II

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

35

I - PREPARATION DES IMMUN-SERUMS 35

1) Choix de l'animal 35

2) Méthode de sollicitation antigénique 36

a) Technique d'immunisation par voie intraveineuse 37

b) Technique d'immunisation par voie sous cutanée 37

c) Choix d'une technique 38

II - TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS 38

1) Macrométhode de précipitation en gélose 38

2) Microméthode de précipitation en gélose 40

3) Technique d'immunodiffusion en cellule (Oudin) 41

4) Technique d'immunoélectrophorèse 41

III - CHOIX DES TECHNIQUES ET INTERPRETATION 41

CHAPITRE III

STRUCTURE ANTIGENIQUE ET FRACTIONNEMENT DES ANTIGENES DE MYCOBACTERIUM PHLEI 46

I - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE MYCOBACTERIUM PHLEI 46

II - FRACTIONNEMENT PRELIMINAIRE 52

III - STRUCTURE ANTIGENIQUE DES PAROIS 54

IV - STRUCTURE ANTIGENIQUE DU SURNAGEANT 12.000 g S_2 60

V - FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT S_2 62

1) Techniques 64

a) Technique de chromatographie sur DEAE cellulose DE 11 64

b) Technique de la filtration sur gel de Sephadex 64

c) Technique de gradient de centrifugation 65

2) Fractionnement en une seule étape 66

a) Fractionnement par centrifugation 66

b) Fractionnement par la technique chromatographique 67

c) Fractionnement par la technique de gel filtration 69

d) Fractionnement par gradient de centrifugation de saccharose 75

3) Technique de fractionnement en deux temps 81

a) Fractionnement dans lequel intervient la simple centrifugation 82

b) Fractionnement dans lequel intervient la centrifugation en gradient de saccharose 84

α /Fractionnement sur DEAE cellulose de la fraction 24 88

β /Fractionnement de la fraction 24 du gradient sur Sephadex 91

c) Discussion 91

CHAPITRE IV

ESSAIS D'OBTENTION DE LYSAT BACTERIEN PAR DES PROCEDES BIOLOGIQUES 95

I - OBTENTION DE SPHEROPLASTES ET ETUDE DE LA COMPOSITION ANTIGENIQUE DU LYSAT DE SPHEROPLASTES 96

1) Modalités d'obtention de sphéroplastes de Mycobacterium phlei 96

a) Milieux testés 98

b) Substances transformantes 99

c) Choix du milieu d'induction 102

2) Résultats 102

3) Structure antigénique des sphéroplastes 105

II - ETUDE DU LYSAT BACTERIOPHAGIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI 107

1) Préparation du lysat bactérien 108

2) Obtention du lysat bactérien 110

3) Etude de la structure antigénique du lysat 110

III - CONCLUSION 112

CHAPITRE V

ETUDE D'UN ANTIGENE ISOLE 114

I - ETUDE DE LA COMMUNAUTE ANTIGENIQUE AVEC D'AUTRES BACTERIES 119

II - LOCALISATION DE CET ANTIGENE DANS LA CELLULE 124

1) Technique de fractionnement des immunoglobulines 127

a) Technique de fractionnement au sulfate de sodium 127

b) Technique de fractionnement au $SO_4(NH)_2$ 128

c) Technique de fractionnement à l'éthanol 128

d) Discussion 129

2) Techniques de conjugaison 130

a) Purification de la ferritine 131

b) Conjugaison 132

3) Résultats 137

III - ANALYSE CHIMIQUE 145

IV - ETUDE IMMUNOLOGIQUE 147

1) Immunité non spécifique 148

a) Immunisation par l'antigène R membranaire 148

b) Immunisation par des parois solubilisées 148

2) Immunité spécifique 150

a) Immunisation par l'antigène R 151

b) Immunisation par des parois solubilisées 151

CONCLUSION 152

INTRODUCTION

Les mycobactéries, tout au long de leur étude, n'ont cessé de poser des problèmes, tant en ce qui concerne les réactions immunologiques qu'elles engendrent dans un organisme, qu'en ce qui concerne leur composition antigénique propre.

A peine KOCH avait-il découvert la tuberculine que de grands espoirs naissaient ; la vaccination antituberculeuse semblait trouvée. Espoir vite déçu, en ce qui concerne l'obtention d'antigène vaccinant ; par contre, KOCH mettait en évidence pour la première fois un phénomène d'immunité cellulaire, l'hypersensibilité retardée. Les chercheurs, à la suite de cet auteur, allaient orienter leurs travaux dans deux voies différentes :

- d'une part l'étude antigénique des mycobactéries,
- d'autre part les problèmes de l'immunité dans la tuberculose.

Nous envisagerons successivement l'historique de ces deux aspects de l'étude immunologique des mycobactéries.

I - L'IMMUNITE DANS LA TUBERCULOSE

Notre connaissance des mécanismes de défense immunologique contre la tuberculose reste encore à l'heure actuelle, très incomplète,

malgré les nombreux travaux qui s'y attachent. L'étude de l'immunité tuberculeuse a commencé avec le phénomène que KOCH avait décrit en 1891 en ces termes :

"Si à un cobaye sain on inocule une culture pure de bacille tuberculeux vivants, ce n'est qu'après 10 à 14 jours qu'apparait, au point d'inoculation, un nodule dur qui s'ouvre bientôt et produit un ulcère persistant jusqu'à la mort de l'animal. Les choses se passent tout différemment lorsqu'on inocule un animal déjà tuberculeux. Le lieu de réinoculation devient dès le lendemain ou le surlendemain dur et noirâtre sur une étendue de 5 à 10 mm. La peau se nécrose les jours suivants ; elle ne tarde pas à s'éliminer et laisse à sa place un ulcère superficiel qui guérit rapidement de façon définitive, sans que les ganglions voisins ne soient tuméfiés".

Cette réaction comporte en fait deux temps : une réaction d'hypersensibilité proprement dite qui se développe dans les premières 48 heures, il s'agit d'une réaction de type inflammatoire qui peut aller jusqu'à la nécrose. Le deuxième phénomène est une réaction d'immunité qui se traduit par une évolution différente de la lésion locale et surtout par une inhibition de la dissémination des germes et une certaine destruction de ceux-ci.

1) Comment se produit cette immunité ?

Essentiellement par des germes vivants et l'on sait qu'à l'heure actuelle l'immunité la plus forte dans l'infection tuberculeuse

est obtenue par l'administration de B.C.G. Certes des bacilles tués par la chaleur ou par des agents chimiques immunisent, mais très faiblement par rapport aux bacilles vivants. La structure des mycobactéries explique peut être leur faible pouvoir immunogène. En effet, si on examine en microscopie électronique la structure des mycobactéries (photographie n°2), on constate, outre la structure classique de paroi et de membranes cytoplasmique, la présence d'une couche amorphe aux électrons. Cette structure particulière aux mycobactéries permettrait peut être de comprendre pourquoi des bactéries entières injectées à un animal, ne provoquent pratiquement pas la formation d'anticorps, contrairement aux bactéries broyées dont les parois sont mises à nu.

Des études ont bien sûr été poursuivies pour étudier l'action immunisante de certaines fractions obtenues à partir de mycobactéries. Il faut dire que toutes les fractions utilisées ont toujours été obtenues par voie chimique et jamais par des méthodes peu traumatisantes n'altérant pas la structure des antigènes. La cire D, dont on connait le rôle dans l'hypersensibilité, pas plus que les protéines ni les lipopolysaccharides, ne semble jouer un rôle dans l'immunité. Par contre, des fractions préparées à partir de bactéries broyées, se sont révélées douées d'un certain pouvoir immunogène, YOUMANS et coll. (127) ont aussi essayé le pouvoir protecteur de fractions de mycobactéries sur des lignées de souris et ont eu des résultats assez discordants, selon les espèces considérées. En fait, il faut souligner que la vaccination antituberculeuse par des fractions antigéniques de mycobactéries, n'a jamais été couronnée de succès.

2) De quel type d'immunité s'agit-il ? immunité humorale ou immunité cellulaire

Il est devenu classique de dire que l'immunité dans la tuberculose est une immunité cellulaire. Il faut bien reconnaître qu'il y a autant de faits expérimentaux qui vont dans l'un ou l'autre sens.

Les travaux de LURIE (49), SUTER (113), de DANNENBERG (17) et MAXWELL (60), montrent que l'immunité humorale ne joue pratiquement aucun rôle dans la protection contre la tuberculose. LURIE a prouvé également le rôle des macrophages dans la destruction des bacilles tuberculeux. Des macrophages d'animaux immunisés se montrent plus facilement capables de phagocyter ces bacilles que des macrophages d'animaux neufs. Mais il faut bien dire que, pour certains auteurs comme SEIBERT (101), MACKANESS (50, 51 et 52), il existe sûrement une corrélation entre "l'activité sérologique" et "l'immunité dans la tuberculose". Ces auteurs, en précisant "activité sérologique" ne s'avancent guère et ne disent pas s'il s'agit d'anticorps spécifiques ou de facteurs sérologiques non spécifiques. Certains auteurs comme MACKANESS, sont même allés plus loin et ont nié les résultats de LURIE, précisant qu'il n'y avait aucune différence d'activité entre les cellules d'animaux immunisés et non immunisés.

Enfin il faut noter que, même pour les tenants de la théorie cellulaire, l'immunité due aux macrophages étudiée "in vitro", est toujours plus faible que celle observée "in vivo". Il n'est pas interdit de penser que les deux types de réactions cellulaire et humorale jouent un rôle ; les travaux de FONG SCHEIDER et ELBERG (19)

vont dans ce sens. Ces auteurs ont montré en effet, que les sérums d'animaux immunisés protégeaient les macrophages de l'action dégénératrice des bacilles virulents. Il faut signaler aussi que la recherche des anticorps s'est toujours montrée inconstante dans la tuberculose. Enfin, il faut citer les cas d'accidents mortels dus à l'injection de B.C.G. chez des sujets atteints d'alymphocytose pure, alors que des sujets normolymphocytaires agammaglobulinémiques se comportent aussi bien en face du B.C.G. que du bacille de Koch.

3) Rapports entre hypersensibilité et immunité

Il s'agit bien de distinguer le rôle que l'hypersensibilité et l'immunité jouent dans l'opposition de l'organisme à une réinfection. La question qui se pose est celle-ci : dans la résistance accrue qu'oppose un organisme ayant déjà été en contact avec des mycobactéries, l'hypersensibilité a-t-elle un rôle à jouer, et quelle est son importance ? Il faut noter que l'hypersensibilité, phénomène immunologique le plus spectaculaire dans la tuberculose, a été longtemps considérée comme la cause principale de la résistance spécifique. Cette théorie, énoncée par ROMER, n'est plus admise à la suite des travaux de BOCQUET et RICH. Il faut reconnaître que, dans la tuberculose, la coexistence de l'hypersensibilité et de l'immunité spécifique est si constante, qu'il était difficile de ne pas mettre sur le même plan ces deux faits.

Il existe cependant des arguments qui montrent que l'hyper-

sensibilité et l'immunité peuvent être dissociées. Un cobaye qui a déjà été infecté, peut perdre au bout d'un certain temps les marques de l'hypersensibilité, alors que l'immunité persiste. De plus, on peut très bien désensibiliser un cobaye par des doses répétées de tuberculine, sans que l'immunité protectrice soit mise en cause ; on sait que la nécrose est un phénomène essentiellement d'hypersensibilité et l'on connait son rôle désastreux ou favorable sur la marche d'une infection tuberculeuse. Donc, d'une part, après une affection tuberculeuse l'immunité spécifique peut exister sans qu'il y ait réaction d'hypersensibilité et d'autre part, la réaction d'hypersensibilité peut avoir des conséquences diverses sur l'évolution de l'infection. On le voit, les phénomènes immunitaires déclenchés dans un organisme par les mycobactéries, restent toujours complexes.

II - LES ANTIGENES DES MYCOBACTERIES

L'étude de la structure antigénique des mycobactéries a également fait l'objet de nombreuses recherches depuis la découverte du bacille de KOCH. Ces recherches présentent un intérêt non seulement pour la classification des mycobactéries, mais peuvent aider à une meilleure compréhension du pouvoir pathogène. Il faut noter que, parallèlement à l'étude de la structure antigénique et du pouvoir immunogène de certaines bactéries, des études chimiques ont été faites sur les mycobactéries, sans que d'ailleurs ces travaux se rejoignent.

L'analyse chimique des mycobactéries, réalisée par les équipes d'ANDERSON (2), de LEDERER et d'ASSELINEAU (3), a permis d'identifier les divers composants, sans qu'une structure chimique d'ensemble ait pu être proposée.

En ce qui concerne l'analyse des structures antigéniques, deux grands courants de recherche se sont définis ; le premier s'est attaché plus particulièrement à une étude des antigènes des mycobactéries en vue d'une classification, la taxonomie des mycobactéries depuis la "découverte" des mycobactéries atypiques ayant été sujette à bien des remaniements ; c'est pourquoi de nombreux chercheurs ont voulu utiliser des structures antigéniques pour l'identification des mycobactéries. Le second courant de recherche s'est attaché plus particulièrement à l'étude des constituants de la cellule mycobactérienne en étudiant certaines fractions chimiquement définies ou certaines fractions antigéniquement définies.

A dessein d'une étude taxonomique des mycobactéries, on a fait appel à toutes les techniques classiques de l'immunologie, mise en évidence de l'hypersensibilité, agglutination, réaction de fixation du complément, hémagglutination, techniques de précipitation en gel.

Parmi les méthodes faisant appel aux phénomènes d'hypersensibilité, deux méthodes ont été employées, celle faisant intervenir l'hypersensibilité retardée (phénomène de KOCH) au moyen de tuberculines, et celle faisant appel à l'hypersensibilité immédiate (réaction de SCHULTZ et DALE).

Les tuberculines, qui sont des produits d'autolysats bactériens, permettent de mettre en évidence le fait qu'un individu ou un animal a été en contact ou non avec une mycobactérie. Elles permettent aussi, par la plus ou moins grande intensité de la réponse immunologique, de déterminer si les tuberculines injectées correspondent à la mycobactérie qui a contaminé l'animal.

La mise en évidence de caractères immunologiques spécifiques fut entreprise dès 1909 par JOSEPH (34) qui montra les caractères particuliers des "sensitines", pour employer le terme proposé par MAGNUSON de Mycobacterium tuberculosis, de Mycobacterium bovis et Mycobacterium avium. On essaya ensuite de trouver des sensitines spécifiques de chaque espèce, puis des extraits purifiés remplacèrent ces tuberculines brutes. Ce furent successivement les travaux de SEIBERT et GREEN (100), de STOCKL et MATHOIS (57), de GREEN (26) qui utilisèrent les fractions "PPD" de SEIBERT. Plus récemment, des auteurs comme MORISAWA (66) ont utilisé des peptides extraits de la cellule bactérienne pour mettre en évidence des réactions d'hypersensibilité retardée.

Les réactions d'hypersensibilité immédiate font appel à la réaction de SCHULTZ et DALE. Des fractions de filtrats de culture non chauffés de Mycobacterium tuberculosis, bovis, avium et fortuitum, ont été utilisées pour le diagnostic d'espèce ; les travaux ont surtout été réalisés par l'équipe de JENSEN (33). Ceux-ci ont utilisé des fragments d'iléons de cobaye ayant été immunisés avec des filtrats de culture microbienne. Les contractions de ces fragments intestinaux

d'animaux sensibilisés mis en présence d'Ag, ont permis de mettre en évidence des antigènes spécifiques de type.

Un deuxième groupe de techniques utilisa les méthodes classiques de la sérologie : réaction de fixation de complément, agglutination, hémagglutination. Ces études ont eu pour but de contribuer à l'identification des divers composants agissant en tant qu'haptènes ou antigènes chez les différents types ou espèces de mycobactéries. Ces études ont surtout été faites à partir de tuberculines, de filtrats de culture ou d'extraits de ces filtrats ; plus récemment, on a employé des extraits bactériens. Les premières expériences ont été réalisées au moyen de la technique de fixation du complément. Différents travaux de GRIFFITH (27) montrèrent quelques différences entre bacille humain, bovin et aviaire. SCHAEFER, à la suite de ces travaux, étudia les propriétés antigéniques des bacilles tuberculeux et bovins, distingua dans les bacilles du groupe aviaire quatre types sérologiques et rechercha la spécificité des protéines des bacilles tuberculeux au moyen d'une technique quantitative de la réaction de fixation du complément (90, 92). Cette technique fut reprise en 1954 par MEYNELL (65) et KWAPINSKI (40) qui montrèrent l'existence, d'une part d'un antigène commun entre les différentes espèces de mycobactéries et, d'autre part, d'antigènes spécifiques. TARNOK (118) plus récemment, utilisa cette technique pour la mise en évidence de l'activité sérologique de l'acide désoxyribonucléique (DNA extrait de mycobactéries). TACQUET et coll. ont employé cette technique dans un but d'identification des mycobactéries en utilisant

des immun-sérums préparés avec des antigènes phénolés, comme l'avait préconisé SCHAEFER.

La réaction d'hémagglutination a été utilisée par de nombreux auteurs, mais essentiellement dans un but diagnostic. Il s'agit d'une des réactions immunologiques les plus sensibles et il était logique de l'employer pour la mise en évidence d'anticorps dans une maladie comme la tuberculose dont l'évolution s'échelonne chez l'homme sur de nombreuses années et dont le retentissement humoral est faible. Le principe mis en évidence par DUBOS et MIDDLEBROOK (62) est le suivant : des hématies sensibilisées par un antigène sont agglutinées spécifiquement par des anticorps ; si du complément est ajouté à la réaction, un phénomène d'hémolyse se produit. Cette technique a été étudiée par de nombreux auteurs dont GERNEZ-RIEUX et TACQUET (22). Après les études de MIDDLEBROOK (62), GERNEZ-RIEUX et coll. qui se situent entre 1950 et 1952, la technique d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée a été reprise par de nombreux auteurs comme BRODHAGE (11) et TSUMITA (123) qui s'attachèrent eux aussi à l'étude de cette réaction dans un but diagnostic. Cette technique fut aussi utilisée dans le but d'identifier les mycobactéries ; ainsi NASSAU et SCHWABACHER (68) ont différencié Mycobactérium tuberculosis et certaines mycobactéries atypiques au moyen de la technique d'hémagglutination. Un troisième groupe a employé cette même technique pour décrire le spectre antigénique et la communauté antigénique entre ces différentes mycobactéries. Les premiers travaux furent d'abord menés par THURSTON (122) qui, en 1956, montra la présence d'un antigène commun

aux différentes espèces, ensuite les travaux successifs de LAGERKRANTZ (42) et BECH (5), aboutirent à la mise en évidence de plusieurs fractions antigéniques par exemple pour :

Mycobacterium tuberculosis : fractions A B C D

Mycobacterium phlei : fractions A B C

Mycobacterium johnei : fractions A B D

Enfin on a pu, grace à cette technique, envisager le pouvoir antigénique de certaines fractions chimiquement définies, comme LAUD avec certains polysaccharides, TAKAHASHI avec des phosphatides extraits de Mycobacterium tuberculosis, MATSUMOTO avec un lipopolysaccharide obtenu à partir de Mycobacterium bovis, variété B.C.G.

Une autre modalité technique proche de la précédente a été l'emploi de la réaction de floculation. Cette dernière ne semble toutefois pas avoir donné de résultats très concluants. Il faut citer les travaux de STACEY (107), SUBRAHMANYAN (111) et TAKAHASHI (115), ces auteurs ayant surtout cherché à étudier le pouvoir antigénique de certaines fractions chimiques comme les polysaccharides ou phosphatides.

Une autre technique classique a été employée : la réaction d'agglutination. Elle avait été préconisée par SCHAEFER il y a de nombreuses années (90). Evidemment, cette technique n'est valable que pour les souches "S", ce qui limite l'emploi pour la famille des mycobactéries à quelques espèces du groupe avium. Plus récemment SCHAEFER (94,95,96) a proposé une modification à sa technique en traitant au préalable les bactéries par le phénol de façon à extraire

une fraction antigénique spécifique qui lui sert à préparer des immun-sérums. D'autres auteurs comme OLITSKY (72) et HAGIME (28) ont confirmé l'intérêt de cette technique pour l'identification du groupe III des mycobactéries atypiques.

Il faut bien souligner que les techniques précédentes n'apportèrent qu'une idée très faible sur la constitution antigénique des mycobactéries et que c'est l'apport important de la technique de précipitation en gélose qui permit une approche de la compréhension de la structure antigénique des mycobactéries. Il faut noter toutefois que les études ont en général été faites sur des autolysats bactériens, ceci à cause des difficultés d'obtention des antigènes bactériens. Ce point limite en partie les résultats obtenus à partir de cette technique, les autolysats bactériens n'ayant bien souvent que de lointains rapports avec la structure antigénique propre des bactéries. Deux types de méthodes ont été employés, la double diffusion en gélose et l'immuno-électrophorèse. Ces deux techniques ne peuvent mettre en évidence que des antigènes solubles capables de diffuser dans la gélose, ce qui peut sembler une limite à cette technique, l'avantage qu'elles présentent est leur grand pouvoir de résolution et finalement leur facilité de mise en pratique. Les premiers travaux furent entrepris par PARLETT et YOUMANS (74) en 1956 en utilisant la technique d'Oudin, puis celle d'Ouchterlony. Ces travaux furent repris ensuite par l'équipe suédoise de LIND et NORLIN (45,70,71) qui établirent une véritable carte antigénique des filtrats de culture des différentes mycobactéries ; ces résultats

furent ensuite complétés par ceux de GIMPL (23). Tous ces travaux ont toujours fait appel à la technique de double diffusion. La technique d'immunoélectrophorèse fut d'abord utilisée par deux auteurs, BURTIN et KOURILSKY (12) qui ont pu mettre en évidence dans les autolysats de culture différents constituants chimiquement définis. Ils ont caractérisé ainsi l'existence de trois fractions essentiellement polysaccharidiques ainsi que quatre fractions protéiques. Ces fractions étaient en partie celles déjà trouvées par SEIBERT dans l'étude électrophorétique de la tuberculine. BURTIN insistait déjà sur le fait qu'il mettait en évidence, non pas des antigènes à proprement parler, mais des haptènes provenant de la dégradation de molécules plus complexes. L'autre groupe qui utilisa la technique d'immunoélectrophorèse fut l'équipe de CASTELNUOVO et PENSO (14,15,16,78) qui se consacra à une étude de la "carte" antigénique des mycobactéries. D'autres auteurs, au lieu de s'attacher à l'étude de l'ensemble de la structure antigénique des mycobactéries, ont étudié plus particulièrement certaines fractions chimiquement définies et obtenues, la plupart du temps, par un fractionnement chimique d'autolysats bactériens.

Certains se sont intéressés plus particulièrement aux fractions protéiniques (8,31,32,103), d'autres aux glucides (13,43,56, 67,102,107,128) et d'autres aux lipides. D'autres encore ont étudié plus particulièrement les différences antigéniques des différents constituants de la cellule bactérienne ; ainsi RIBI (82) a étudié plus particulièrement la paroi en insistant sur le rôle qu'elle joue dans le phénomène d'allergie ; d'autres comme les YOUMANS (127) les

ribosomes isolés des mycobactéries.

On le voit, les études antigéniques ont surtout consisté en une recherche permettant d'aboutir à une classification des mycobactéries au moyen de leur "carte" antigénique. Peu d'études ont été faites sur les antigènes proprement dits des mycobactéries, les difficultés de broyage des bactéries étant telles que la plupart des auteurs ont préféré s'adresser à des autolysats bactériens. Ce faisant, ils ont plus étudié des composés dérivés de ces antigènes que les antigènes eux-mêmes. Ainsi BURTIN précise en conclusion de ses travaux que les substances qu'il a isolées sont des "haptènes" incapables de provoquer la formation d'anticorps et qu'ils seraient donc des produits de dégradation de molécules plus complexes.

D'autres études ont été consacrées au fractionnement purement chimique des mycobactéries, la structure de gros complexes macromoléculaires n'a pas été abordée et nos connaissances sur la structure même des mycobactéries ne comportent que des éléments épars sans élément d'unité.

Lorsque nous nous sommes intéressés au problème de la structure antigénique des mycobactéries, le principe fondamental qui a guidé la réalisation de cette étude a été de préserver la structure des constituants de la cellule bactérienne et d'éviter de les modifier sous l'action d'un fractionnement chimique. Ceci nous permettait d'obtenir des structures macromoléculaires dont il était possible de déterminer par la suite, la structure chimique et le rôle immunologique éventuel.

AVANT PROPOS

De l'étude bibliographique des travaux consacrés à la structure antigénique, on retient surtout le fait que ces recherches ont eu pour objet plus de comptabiliser un certain nombre d'antigènes, que d'isoler des structures macromoléculaires et de les étudier. Notre but a été d'obtenir des structures macromoléculaires antigéniques, d'analyser leurs propriétés immunologiques, de connaître leur structure chimique et leur emplacement dans la cellule. Ceci devrait nous permettre d'établir un lien entre l'emplacement dans la cellule d'une structure macromoléculaire et son activité immunologique.

Pour isoler ces séquences antigéniques, il fallait éviter de les modifier lors de leur obtention et surtout du fractionnement. La plupart des auteurs ont utilisé comme matériel de départ des filtrats d'autolysats bactériens. Il s'agissait de cultures laissées suffisamment longtemps à 37°C pour que les enzymes, libérées des bactéries, puissent attaquer et dégrader d'autres bactéries et libérer ainsi des fractions solubles. Le problème qui se pose est celui de savoir si ces fractions peuvent encore rendre compte de la structure des mycobactéries. En toute logique, il ne peut s'agir que de fractions altérées n'ayant plus qu'un lointain rapport avec les structures initiales de la bactérie. Comme l'a très bien démontré

BURTIN, les produits d'autolysats sont des dérivés de complexes macromoléculaires où l'on trouve certes des produits se comportant comme des antigènes, mais où l'on trouve surtout des fractions réagissant en tant qu'haptènes. Si l'on cherche à isoler de gros complexes macromoléculaires, cette technique est donc à proscrire formellement.

Le but primordial de notre travail n'a pas été tellement d'étudier la structure antigénique pour elle-même, mais plutôt comme point de départ pour l'isolement de complexes macromoléculaires.

Après avoir isolé un ou plusieurs complexes, il s'agissait évidemment de les étudier du point de vue chimique, de les situer dans la cellule, de voir quel rapport il avait avec d'autres bactéries. Il s'agissait aussi d'étudier quel rôle immunologique ce ou ces complexes macromoléculaires pouvaient jouer. Avaient-ils un rôle protecteur contre l'infection tuberculeuse ou contre d'autres infections microbiennes ; étaient-ils capables d'engendrer ou non des phénomènes d'hypersensibilité retardée. Pour que l'étude structurale aussi bien que l'étude de la structure antigénique soient valables, il fallait avoir des germes viables et si possible, obtenus toujours dans les mêmes conditions, d'où la mise au point de cultures en masse de bactéries. Pour obtenir des complexes macromoléculaires, il fallait disposer de méthodes de broyage et d'extraction des antigènes qui ne soient que des méthodes physiques ne pouvant en aucune façon, altérer les structures. Il convenait donc d'employer

des techniques telles que l'on puisse travailler à froid de telle sorte qu'après broyage des bactéries, les antigènes isolés ne puissent être altérés par les enzymes bactériennes. Les techniques chimiques étaient donc exclues de ce premier stade de la préparation antigénique. De même pour le fractionnement, nous nous sommes résolus à employer exclusivement des techniques physiques pour nous préserver des modifications possibles de structure, engendrées par un fractionnement chimique.

Les phénomènes déclenchés par la présence de mycobactéries ou de fractions mycobactériennes dans un organisme étant complexes et mal différenciés, il est permis de supposer que seule l'étude de la structure des antigènes de leur emplacement dans la cellule bactérienne permettra de différencier les diverses modalités immunologiques provoquées par ces antigènes in vivo.

Cet avant-propos permet de préciser le plan que nous allons suivre.

Dans une première partie, nous exposerons les procédés d'obtention en masse de bactéries ayant des caractéristiques identiques, ainsi que les procédés de rupture de ces bactéries.

Dans une seconde partie, nous étudierons les techniques immunologiques employées pour la mise en évidence des antigènes mycobactériens.

Dans une troisième partie, nous envisagerons la structure antigénique et le fractionnement, ainsi que l'obtention d'antigènes à

l'état pur.

Dans la quatrième partie, nous étudierons les moyens d'obtention d'antigènes par des méthodes biologiques, sphéroplastes ou phages.

Enfin la dernière partie sera consacrée à l'étude d'un antigène isolé de Mycobacterium phlei. Nous envisagerons les communautés antigéniques avec d'autres mycobactéries ou Nocardia, son emplacement dans la cellule et son rôle immunologique éventuel.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - OBTENTION DE MATERIEL BACTERIEN

1) Choix des souches

Ces études ont été effectuées principalement avec une souche de Mycobacterium phlei (souche 689, Centre de Collection de types microbiens de Lausanne). Notre choix s'est porté sur cette souche pour deux raisons : sa culture relativement plus rapide que les autres mycobactéries et sa structure antigénique très proche de celle des mycobactéries pathogènes. De plus, Mycobacterium phlei a fait l'objet de très nombreuses études métaboliques et enzymatiques, ce qui pouvait être intéressant pour la poursuite ultérieure de nos recherches.

D'autres souches de Mycobacterium phlei d'origines différentes, ont été comparées au début de nos études, avec la structure de la souche 689. Les structures s'étant révélées identiques, les résultats acquis avec Mycobacterium phlei souche 689, ont été considérés comme caractéristiques de cette espèce.

Par ailleurs, une étude comparative a été effectuée avec d'autres espèces mycobactériennes :

Mycobacterum bovis (var. B.C.G.)

Mycobacterium kansasii

Mycobacterium avium (sheard)

Mycobacterium minetti

Mycobacterium smegmatis

Mycobacterium xenopei

Mycobacterium scrofulaceum

Nous n'avons pas utilisé de souches pathogènes de type bovin ou humain, les conditions de culture que nous nous étions imposées, ne nous permettaient pas d'obtenir ces germes dans des conditions de sécurité convenables. Ces recherches ont donc été conduites sur des germes cultivés dans des conditions identiques : mêmes milieux de culture, conditions rigoureuses d'oxygénation, d'agitation et de pH, ceci permettant d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance, afin d'éviter de travailler sur un matériel lysé.

De plus, les études de structure antigénique et surtout d'isolement d'antigène purifié, exigeaient des quantités importantes de bactéries. Ces conditions ne pouvaient être obtenues que par l'emploi de fermenteur.

2) Méthodes de culture

Les méthodes habituelles d'obtention de bactéries au Laboratoire, en milieu liquide, sont non seulement peu pratiques, mais

aussi peu économiques et d'un rendement médiocre. Certes les cultures sur milieux solides ont un rendement excellent en poids, mais très faible en cellules viables ; en effet, seule la couche supérieure de la culture est riche en cellules vivantes, les couches inférieures étant constituées de cadavres bactériens. Classiquement avec les méthodes usuelles de culture de bactéries en milieu liquide, on obtient 1 g de poids sec de bactéries par litre de culture. Les rendements sont au moins cinq fois supérieurs avec des cultures en fermenteur.

Les paramètres les plus importants pour l'obtention de bactéries, pH, aération, agitation, peuvent être fixés de façon rigoureuse dans un fermenteur, ce qui n'est jamais le cas dans une culture classique. La culture immergée et agitée présente les avantages d'un système de composition homogène dans les différentes parties du milieu dans lequel il est possible d'obtenir un équilibre de l'état gazeux. Le micro-environnement de chaque bactérie est donc toujours identique dans chaque culture. Des quantités importantes de bactéries, en état de croissance identique, peuvent être recueillies par l'emploi d'unité pilote de fermentation. Les détails techniques de cette installation ayant déjà fait l'objet d'un Diplome d'Etudes Approfondies de Biochimie, nous ne décrirons ici que les méthodes d'obtention en fermenteur de trois types de mycobactéries :

- une mycobactérie à croissance rapide : Mycobacterium phlei
- une mycobactérie à croissance plus lente : Mycobacterium kansasii
- une mycobactérie à croissance lente : Mycobacterium bovis (var. B.C.G.)

Ces cultures en masse étant destinées à l'étude des antigènes, nous avons éliminé tout milieu contenant des fractions protéiques et utilisé un milieu minéral simple, le milieu de Sauton :

Asparagine	4	g
Acide citrique	2	g
Phosphate bipotassique	0,5	g
SO_4 Mg	0,5	g
Citrate de fer	0,05	g
Glycérine	48	ml
H_2O q.s.p.	1000	ml

Les modalités techniques sont les suivantes : les souches sont entretenues sur milieu solide de Coletsos ; on ensemence à partir de ces milieux des fioles dites à toxine, contenant un litre de milieu de Sauton. Ces fioles sont cultivées en agitation pendant le temps nécessaire pour obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance.

Cette préculture est inoculée stérilement dans les fermenteurs. Ces cultures de mycobactéries en fermenteur posent en effet le problème de maintien de stérilité. Le problème de la contamination se pose différemment selon que les germes sont à croissance rapide ou à croissance lente. En cas de culture de mycobactéries à croissance rapide, peu de germes contaminants auront la possibilité de s'y développer, le rapport du nombre étant toujours en faveur de l'inoculum.

Par contre, si l'on procède à des cultures de germes à développement lent, donc à taux de croissance faible, une contamination par des germes, ayant un taux de croissance rapide, pourra survenir. En effet, ces germes indésirables seront très vite à une concentration supérieure à celle du germe inoculé et la culture sera perdue. Notre expérience nous a permis de constater que, pour des cultures d'Escherichia coli ou même de Bacillus, les possibilités de contamination sont réduites car peu de germes ont un taux de croissance aussi rapide et des souillures ont peu de chances de se développer. Par contre, les mycobactéries ont des taux de croissance variant de 0,20 pour Mycobacterium phlei à 0,07 pour Mycobacterium tuberculosis. Si des bactéries comme Escherichia coli, dont le taux de croissance est de 3, contaminent même en très faible proportion un fermenteur ensemencé avec des mycobactéries, on aura très rapidement un développement du germe contaminant. L'inoculation de la préculture dans le fermenteur doit donc être effectuée avec beaucoup de précaution.

Ce maintien de la stérilité doit être maintenu pendant des délais de cinq jours à trois semaines, ce qui est possible grace aux dispositifs de sécurité adoptés dans la construction des fermenteurs. Différents essais nous ont permis de déterminer, pour chaque espèce mycobactérienne, les coefficients d'agitation et d'aération les plus efficaces pour obtenir, dans un minimum de temps, une quantité maximum de bactéries en phase exponentielle de croissance.

Les tableaux I, II et III résument les paramètres de culture, retenus pour les trois types de germes étudiés. Il faut noter que le pH

au cours de ces cultures, a été maintenu constant par addition automatique de HCl N ou de NH_4OH N.

TABLEAU I

Conditions de culture en fermenteur pour Mycobacterium phlei :

Temps	Débit d'air en (litres/minute)	Vitesse d'agitation (tours/minute)
To	1	200
TO + 24 h	3	300
TO + 48 h ↓ To +120 h	5 idem	400 idem

TABLEAU II

Conditions de culture en fermenteur pour Mycobacterium kansasii :

Temps	Débit d'air en (litres/minute)	Vitesse d'agitation (tours/minute)
To	1	100
To + 24 h	2	100
To + 72 h	3	200
To + 96 h ↓ To + 13 jours	5 idem	400 idem

TABLEAU III

Conditions de culture en fermenteur pour Mycobacterium bovis var. B.C.G.:

Temps	Débit d'air en (litres/minute)	Vitesse d'agitation (tours/minute)
To	1	100
To + 72 h	2	100
To + 96 h	3	200
To + 144 h ↓ To + 20 jours	(5 ((idem	(400 ((idem

On constate la très faible aération utilisée en début de la culture. De nombreux essais nous ont montré l'importance d'une très faible oxygénation pendant la phase de latence. Un débit d'air de trois litres par minute, dès le début de la phase de latence, suffit à inhiber la croissance. Il est donc important de surveiller le taux d'aération d'une culture de mycobactéries en fermenteur. Avec ces précautions, les rendements en fermenteur sont en général six fois supérieurs à ceux obtenus avec les cultures en fioles. Celles-ci donnent lieu à la formation de voiles, d'importance apparamment satisfaisante, mais comprenant en réalité un grand nombre de cellules mortes.

Un fermenteur contenant quinze litres de milieu permet, après cinq jours, l'obtention en moyenne de 180 g en poids humide de mycobactéries.

Ces bactéries sont recueillies stérilement par un système de centrifugation en continu du type Szent-Gyorgyi et Blum. La suspension bactérienne est envoyée dans la centrifugeuse par une

surpression d'air stérile. Les bactéries, après lavage à l'eau distillée stérile dans des pots à centrifugation, sont recueillies stérilement et conservées à - 20°C.

II - BROYAGE DU MATERIEL BACTERIEN

De nombreuses méthodes ont été employées pour rompre les bactéries. Une des techniques les plus simples préconisée par WEIDEL pour Escherichia coli est l'autolyse : elle a l'inconvénient d'altérer considérablement les structures bactériennes. Le choc osmotique a été préconisé également, ce moyen avait été utilisé uniquement pour les bactéries halophiles. Ces bactéries, ne cultivant qu'en présence de fortes concentrations de sel, éclatent par simple choc osmotique dès qu'elles sont dans une solution hypotonique.

La reproduction de ce phénomène a été tentée chez des bactéries non halophiles par immersion dans le glycérol de façon à capter l'eau de la cellule, de manière brutale.

Ces techniques de choc osmotique ou de déshydratation ont été peu utilisées. Il convient d'en rapprocher la méthode de broyage récemment proposée, par les zéolithes silico-aluminiques. Ces substances agiraient en captant l'eau de la paroi bactérienne, facilitant ainsi son broyage. SALTON a également proposé le traitement des bactéries par la chaleur, méthode selon nous, peu intéressante, car elle altère les structures que l'on cherche à isoler. Ces inconvénients

peuvent être évités par les méthodes de désintégration mécanique.

Les premières furent le broyage ou l'agitation violente en présence d'abrasifs comme le sable, alumine ou les billes de verre, d'acier, de plastique. A ce groupe se rattache l'emploi de l'appareil de Mickle, permettant de rompre des bactéries par interactions en présence de billes de plastique.

La sonnation a été et est toujours une des méthodes les plus employées. Ce procédé présente néanmoins l'inconvénient d'utiliser des appareils à fréquence fixe dont la seule variable est le temps.

Une des dernières méthodes proposées a été l'utilisation de fortes pressions pour rompre les bactéries grace à un appareil appelé "French Press". Le principe en est simple et séduisant : on fait passer à travers une valve, ayant un très petit orifice, des bactéries soumises à de très fortes pressions, la valve étant évidemment refroidie pour empêcher l'échauffement.

Les mycobactéries sont particulièrement résistantes aux divers agents agresseurs, qu'ils soient physiques ou chimiques. Si l'obtention et la séparation de parois et de composants cytoplasmiques d'Escherichia coli ne posent guère de problèmes (sonnation, simple broyage avec de l'alumine, agitation dans un "Mickle" ou attaque de la paroi par des procédés biologiques), il n'en est pas de même pour les mycobactéries. Les raisons de ces difficultés sont liées à la structure des mycobactéries. Lorsqu'on examine ces germes en microscopie électronique on constate, outre la présence de la paroi, l'existence

d'une couche assez importante, peu dense aux électrons, entourant la paroi. Cette couche est responsable de l'agglutination des mycobactéries entre elles. Elle semble également responsable de leur grande résistance aux différents traitements physiques et chimiques. Cette structure, très particulière de paroi, explique sans doute le taux de croissance faible de ces germes, lié à un métabolisme réduit et au passage très difficile des éléments nutritifs. La pratique des coupes, en vue de l'examen en microscopie électronique, montre d'ailleurs que la pénétration des fixateurs dans la bactérie est très difficile et que sa coupe elle-même n'est pas aisée. Tous ces faits viennent donc en confirmation de la structure particulièrement résistante des mycobactéries.

La sonnation et le broyage à l'appareil de Mickle ne sont de ce fait que difficilement applicables à ces germes. Certains auteurs ont employé la sonnation, mais l'emploi de fréquences très élevées altère les structures et l'échauffement du milieu dénature les protéines. Nos essais de broyage au Mickle ont donné des pourcentages de rupture de l'ordre de 5 à 10 p. 100 après des temps très longs, ce qui excluait toute utilisation pratique de cet appareil. Des essais de sonnation ont également été pratiqués avec un appareil Raytheon 10 Kc. Pour obtenir des taux de rupture de l'ordre de 10 à 20 p. 100, nous avons dû employer des temps de sonnation de trois heures et plus ; les différents essais effectués avec des germes soumis à cet appareil, ont montré qu'un traitement de plus de 10 min altérait leur activité enzymatique ; on peut donc considérer qu'après

APPAREIL DE BROYAGE

Schéma n° 1

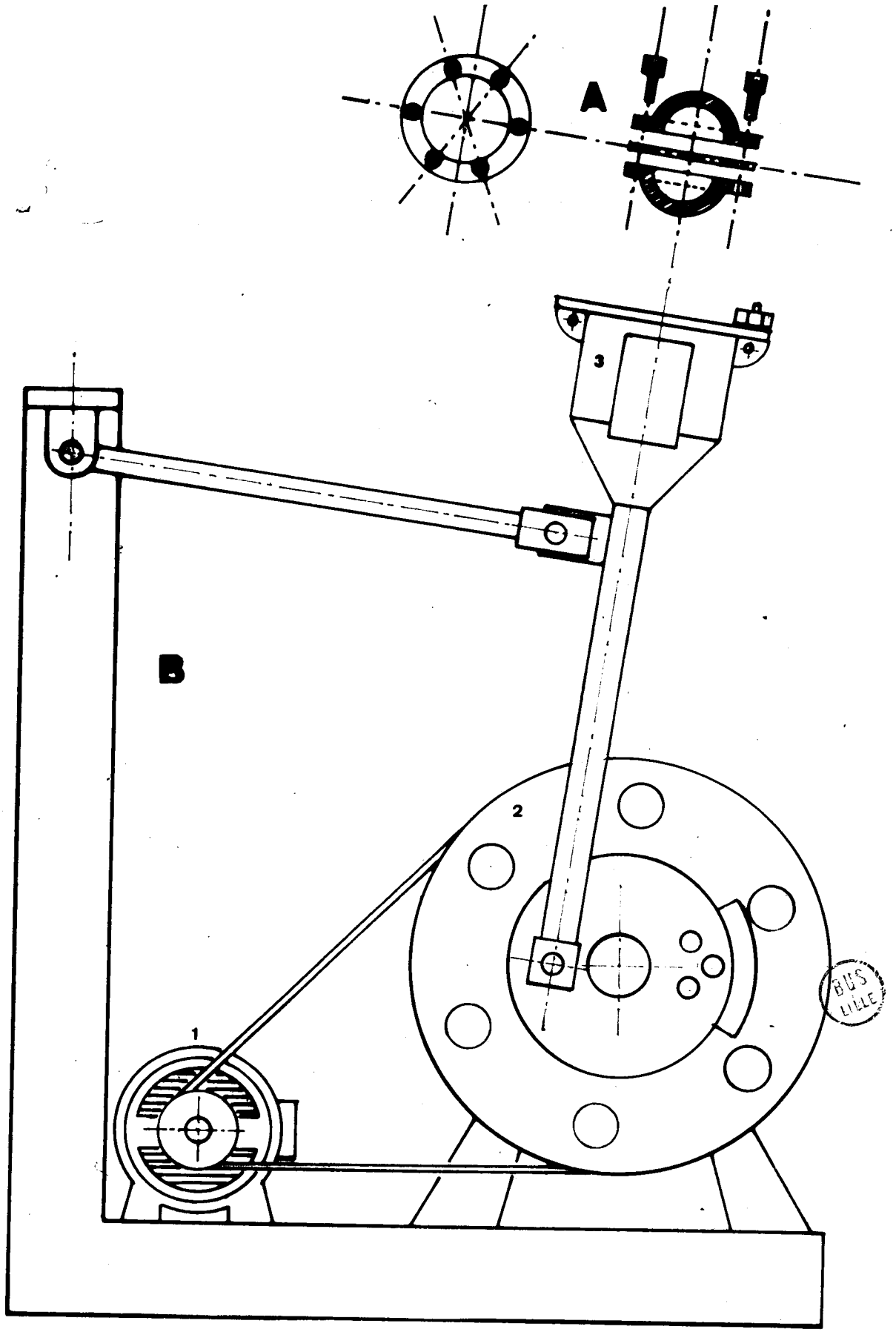
A : CHAMBRE DE BROYAGE

B : APPAREIL

1) moteur électrique

2) volant

3) tête destinée à recevoir la chambre de broyage


A
3
B
2
1

3 heures de sonnation, il ne reste plus aucune structure intacte.

Un des moyens les plus commodes est peut-être la "French Press", qui a été utilisée pour le fractionnement des mycobactéries, par RIBI notamment. Si elle est d'un emploi facile, il est cependant toujours difficile de contrôler l'élévation de température lorsqu'on emploie des pressions de l'ordre de 10 tonnes.

Nos recherches ont porté sur deux techniques de broyage : une technique associant la rupture mécanique et l'action du froid ou le cryobroyage, et une autre technique plus récente, l'emploi des zéolithes.

1) Le cryobroyage (*)

Il s'agit d'une technique dont le principe a été proposé initialement par ZAMPIERI (129) et que nous avons reprise et modifiée.

Si l'on soumet un produit organique à de très basses températures, il perd rapidement ses propriétés de plasticité et peut être broyé. De même des microorganismes congelés dans de l'azote liquide à - 180°C, peuvent être broyés ensuite par des moyens mécaniques (voir schéma n° 1).

Le broyage est réalisé à l'aide d'un moulin, constitué de deux bielles fixées sur un volant mu par un moteur électrique. Ces bielles sont reliées au chassis par un bras mobile et possèdent à

(*) Nous remercions très sincèrement les Professeurs PENSO et CASTELNUOVO de l'Institut Supérieur de Santé de Rome qui nous ont procuré les sphères, utilisées dans cette installation.

leur sommet deux têtes permettant de fixer les chambres de broyage. Celles-ci décrivent alors un mouvement ellipsoïdal à raison de 250 mouvements par minute. Les chambres de forme ovoïde sont en acier inoxydable de 1 cm d'épaisseur et sont composées de deux parties hémisphériques fermées hermétiquement au moyen d'écrous. Ces chambres vont recevoir le matériel bactérien qui sera congelé. La rupture des microorganismes est assurée par des billes de tungstène de 1 cm de diamètre, qui sont animées d'un mouvement ellipsoïdal à l'intérieur de la chambre. C'est la projection de ces billes sur la masse bactérienne congelée qui va assurer la rupture des microorganismes et transformer rapidement cette masse dure en une poudre.

Le cycle de broyage va se dérouler de la manière suivante : on dépose la masse bactérienne dans la chambre stérilisée au préalable, on ferme les deux parties de la chambre qui est plongée ensuite pendant 15 minutes dans l'azote liquide ; lorsque la masse est congelée, on ajoute les billes, et l'on refroidit encore 15 minutes.

Les chambres de broyage sont alors montées sur les bielles. On procède à un broyage de 15 minutes. On décongèle ensuite jusqu'à la température de 0°C sous un courant d'air chaud. Les bactéries sont soumises à six reprises à un cycle de congélation, broyage, décongélation. Il faut noter que ces congélations et décongélations successives sont indispensables pour avoir un excellent pourcentage de rupture. Un simple cryobroyage ne donne qu'un rendement beaucoup plus faible. Avec cette technique nous obtenons des pourcentages de rupture variant de

Mycobactéries broyées

PHOTOGRAPHIE N° 1

Mycobactéries broyées observées en microscopie électronique
après ombrage phosphotungstique.

On distingue nettement les "sacs" bactériens cassés et vidés
de leur contenu.

BUS
LILLE

90 à 95 p. 100. Le contrôle du broyage se fait au microscope électronique, en examinant la préparation après ombrage à l'acide phosphotungstique.

Ce traitement permet d'obtenir une masse rendue élastique par la libération des acides nucléiques, masse dans laquelle on peut mettre en évidence les parois microbiennes vidées de leur contenu (photographie n°1).

Le broyat est ensuite homogénéisé dans un broyeur à couteaux type Virtis, avec un tampon Tris HCl 10^{-2}M, $MgCl_2$ 10^{-2}M à pH 7,4. De ce broyat, on élimine les bactéries intactes par une centrifugation de 600 g pendant 30 minutes ; on obtient ainsi un mélange de parois et de constituants cytoplasmiques.

2) Technique utilisant les zéolithes

Plus récemment, nous avons utilisé le silico-aluminate de type 4A de l'"Union Carbide". D'après ZIPPER et PERSON (130) ces produits agissent en absorbant l'eau des structures lipoprotéiques de la paroi, favorisant ainsi la rupture des bactéries par un simple broyage au mortier.

Cette technique s'est révélée relativement efficace avec les mycobactéries puisqu'elle donne des pourcentages de rupture de l'ordre de 50 à 60 p. 100. La technique d'utilisation est très simple : on mélange dans un mortier (mortier et pilon sont stérilisés) 5 g environ de bactéries avec 10 g de zéolithe. Cette masse est triturée jusqu'à obtention d'une pâte homogène, puis d'une poudre. Un bon rendement de broyage n'est obtenu que grace à un écrasement au mortier suffisamment

long, car les zéolithes ne font que fragiliser la paroi, le phénomène d'écrasement est donc indispensable. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle doit être effectuée dans des conditions de stérilité rigoureuses. Un certain échauffement se produisant lors du mélange, il convient d'utiliser un matériel préalablement refroidi et maintenu à 0°C dans un bain de glace.

Lorsque le broyage est terminé, on dissout la poudre dans 200 ml d'eau distillée stérile et on centrifuge à 1000 g pendant 15 minutes pour éliminer les zéolithes. Le mélange de parois et de constituants cytoplasmiques obtenu dans le surnageant, est séparé selon la méthode précédemment décrite.

Nous avons procédé à des comparaisons entre la structure antigénique des constituants cytoplasmiques obtenus par les deux méthodes de broyage. Ces structures nous sont apparues identiques.

Cette dernière méthode présente un grand intérêt pour l'étude taxinomique des mycobactéries, du fait de sa facilité d'emploi.

CHAPITRE II

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

I - PREPARATION DES IMMUN-SERUMS

L'étude des structures antigéniques nécessite l'obtention d'anti-sérums dont la valeur est conditionnée par les modalités techniques de préparation.

L'immunologiste doit au préalable effectuer un choix de l'animal à immuniser et de la méthode de sollicitation antigénique.

1) Choix de l'animal

Le lapin a été choisi de préférence à d'autres animaux car il permet d'obtenir de bons sérums précipitants, susceptibles d'être utilisés dans notre système révélateur (méthode de précipitation en gélose). Les variations de réponse selon les animaux, nous ont conduit à utiliser des lots de 10 lapins pour chaque fraction antigénique, dont certains des anti-sérums ont été mélangés, après évaluation du taux d'anticorps de chacun d'eux.

2) Méthode de sollicitation antigénique

La préparation de ces anti-sérums nécessite habituellement le choix d'un adjuvant qui a la propriété d'augmenter l'importance de la réponse immune.

Notre choix s'est porté sur deux substances classiquement utilisées : l'alun de potassium et le mélange incomplet de Freund (lanoline - huile de vaseline). Les seuls points que nous discuterons ici seront les modalités d'injection et les quantités d'antigènes.

Nous avons procédé à différents essais portant sur la fréquence des injections, la durée de ces injections, la quantité d'antigène à injecter. La complexité du problème était telle que nous avons limité notre programme d'essai à deux techniques :

- une technique utilisant la voie sous-cutanée avec comme adjuvant le mélange incomplet de Freund,
- une technique utilisant la voie veineuse avec comme adjuvant l'alun de potassium.

Pour chaque modalité choisie, des essais ont été réalisés avec des doses d'antigènes fixes (1 mg par exemple) et des fréquences d'injections variables (toutes les 48 h, 72 h etc...). Ces études ont été complétées par des expériences effectuées à des fréquences de six jours par exemple, avec des doses variables d'antigènes, 1 mg, 2 mg, etc...

L'évolution de la courbe d'apparition et de disparition des anticorps a été étudiée par des prélèvements bihebdomadaires,

les contrôles d'apparition des anticorps se faisant, de façon qualitative, par la technique d'Ouchterlony, et de façon quantitative, par une technique de précipitation en tubes. Ces essais ont été faits avec les deux techniques suivantes :

a) Technique d'immunisation par voie veineuse

Le facteur adjuvant choisi est l'alun de potassium. L'antigène est dissous à la concentration de 1 mg par ml dans une solution d'alun de potassium à 1 p. 100, amenée à pH 7. On pratique trois injections dans la veine marginale de l'oreille du lapin de 7,5 ml pendant trois semaines, suivies de trois injections de 3 ml par semaine, pendant cinq semaines. Les injections sont arrêtées pendant un mois. On pratique ensuite une injection intramusculaire de 3 ml, suivie éventuellement d'une série d'injections intraveineuses. Le sérum est prélevé huit jours après la dernière injection.

b) Technique d'immunisation par voie sous-cutanée

On utilise comme produit adjuvant le mélange suivant, stérilisé par chauffage à 120°C pendant 20 min :

lanoline	1,5)	V/V
huile de vaseline	8,5)	

Des injections sous-cutanées sont réalisées, après incorporation de l'antigène dans l'huile, en phase continue et selon les proportions :

adjuvant	:	1 ml
antigène	:	0,5 ml d'une solution à teneur protéique de 5 mg/ml

Les injections sont faites en plusieurs points de l'abdomen, une fois par semaine, ceci pendant six à sept semaines. Après la dernière injection, les lapins sont laissés au repos dix jours, puis on procède au prélèvement sanguin.

c) Choix de la technique

Notre choix s'est porté sur la seconde technique qui donne des immun-sérums aussi riches en anticorps que la technique plus longue d'immunisation par voie veineuse. Elle permet d'obtenir les anti-sérums en moins de deux mois, soit dans un délai relativement bref. Les sérums, avant d'être utilisés, sont décomplémentés par vieillissement à 4°C pendant un mois. Ils sont ensuite stérilisés par filtration sur filtre "Millipore" de 0,25 µ et conservés en ampoules scellées de 1 ml, à la température de - 20°C.

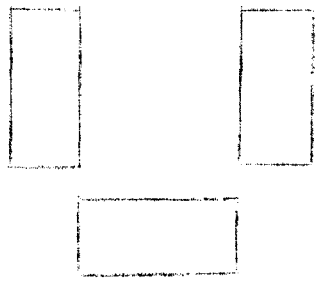
II - TECHNIQUE DE MISE EN EVIDENCE DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

Nous avons utilisé uniquement des techniques de précipitation en gélose en macro ou microméthode ; soit la technique d'OUCHTERLONY (73), soit la technique d'OUDIN.

1) Macrométhode de précipitation en gélose

On utilise des plaques de verre sur lesquelles sont collés des cercles d'acier de 8 cm de large et 1 cm de hauteur. On coule d'abord

une couche de 3 ml d'Agar à 1 p. 100 dans une solution de NaCl à 8,5 p. 100 ou dans un tampon véronal. On dépose ensuite un moule ayant la forme désirée. Nous avons employé ici des réservoirs rectangulaires de 4 mm sur 6 mm, disposés de la façon suivante :



Finalement on coule à nouveau 5 ml de gélose. Après avoir enlevé le moule, le matériel est prêt pour la réaction. Dans le bassin central on dépose l'immun-sérum et dans les bassins latéraux les solutions antigéniques.

Les chargements peuvent se faire pendant un ou plusieurs jours, selon la richesse en antigènes et en anticorps. On laisse la réaction se développer à 30°C entre chaque remplissage, puis la précipitation se former à 4°C pendant quatre jours. On élimine ensuite les réactifs en excès par un lavage dans une solution de NaCl à 1 p. 100 puis dans l'eau distillée. Avant de sécher la plaque par une bande de papier Whatman n° 1, on photographie, on colore ensuite par l'amidoschwartz ou le vert de lissamine.

L'étude de l'évolution du diagramme de précipitation est importante à suivre car elle permet d'éviter les erreurs dues à des artefacts. En effet, s'il est avantageux de recharger plusieurs fois

en antigènes ou en anticorps une plaque d'Ouchterlony, la modification du rapport antigène-anticorps peut entraîner un déplacement d'un arc de précipitation. Il est donc indispensable de suivre et de comparer les différents aspects que peut donner cette réaction, en fonction des différentes concentrations d'antigènes et d'anticorps.

2) Microméthode de précipitation en gélose

Elle est réalisée sur lames de microscope. Un gel de composition identique à celui utilisé dans la macrométhode est coulé sur les lames ; on découpe ensuite des réservoirs dans la gélose. Nous avons utilisé des réservoirs de 3 mm de diamètre, disposés en quinconce. La distance diagonale libre entre le bord du réservoir interne et le bord du réservoir externe est de 5 mm. On charge les godets avec l'immun-sérum et les fractions antigéniques une fois seulement. La manipulation est, par ailleurs, en tous points identique à celle de la macrométhode. Nous avons surtout utilisé cette méthode comme technique de "dépistage", étant donné le peu de réactifs qu'elle exige.

Il est à noter que nous avons employé parfois dans ces techniques des tampons véronal à pH 8,6. Ceci est intéressant dans le cas d'antigènes peu diffusibles, l'augmentation du pH favorisant cette diffusion ; il conviendra toutefois de veiller à ce que l'augmentation de pH ne diminue la constante d'association antigène-anticorps.

3) Technique d'immunodiffusion en cellule (Oudin)

Cette cellule est constituée de deux lames de verre, distantes l'une de l'autre, dans laquelle sont coulés successivement un gel d'agar contenant l'immun-sérum, puis une couche de gel vierge, enfin le ou les gels d'Agar contenant le ou les antigènes. Cette technique permet d'employer de faibles concentrations d'Agar et donne une excellente diffusion. Elle présente toutefois l'inconvénient d'empêcher toute technique de coloration finale.

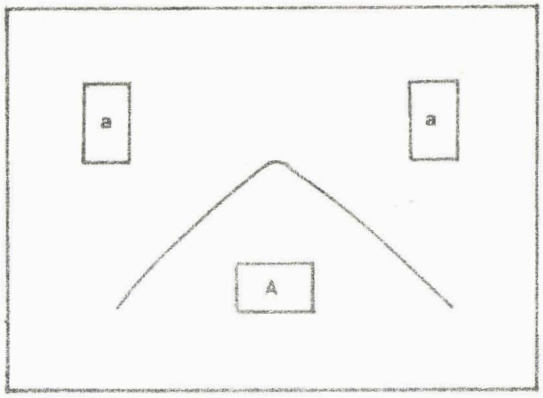
4) Technique d'immunoélectrophorèse

La microméthode sur lames de microscope avec une gélose tamponnée au véronal à pH 8,6 a été faite sous une tension de 250 volts pendant une heure.

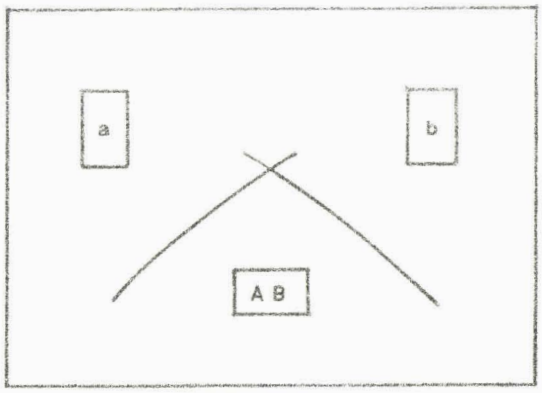
III - CHOIX DES TECHNIQUES ET INTERPRETATION

La réaction d'immunodiffusion en gélose type Ouchterlony nous a semblé la mieux adaptée à cette étude : elle permet de modifier en cours de réaction le rapport antigène-anticorps et de suivre l'évolution du diagramme de précipitation. Elle nécessite certes un taux d'anticorps plus important que d'autres techniques de mise en évidence de la réaction antigène-anticorps, la réaction d'hémagglutination par exemple. La sensibilité de la réaction d'Ouchterlony n'est en effet que de

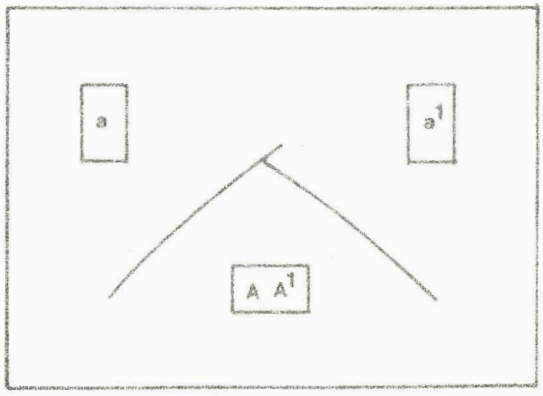
I



II



III



A, B = anticorps

a, b = antigènes

a et a^1 étant deux antigènes ayant une certaine communauté antigénique

Différents types de réaction d'Ouchterlony

Schéma n° 2

2,5 µg N.Ac (*), tandis que celle de la réaction d'hémagglutination est de 0,003 µg N.Ac.

Elle présente cependant l'avantage considérable de permettre facilement l'analyse d'un complexe antigène-anticorps, donc de suivre également la purification d'un mélange d'antigènes. Elle offre également la possibilité d'établir des relations éventuelles entre des antigènes différents.

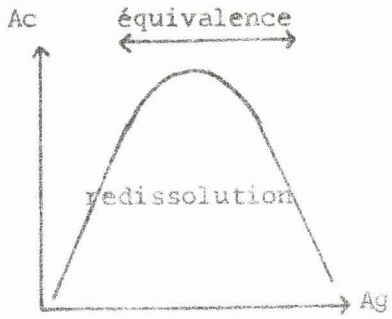
Si on ne tient compte que d'un système équilibré, c'est-à-dire où le rapport $\frac{Ag}{Ac}$ est voisin de l'unité, on peut distinguer, selon Ouchterlony, trois types de réactions, résumées sur le schéma n° 2. La réaction de type I correspond à l'identité complète entre deux antigènes et il n'existe qu'un seul arc de précipitation.

La réaction de type II donne deux arcs de précipitation qui se croisent, ce qui signifie que deux antigènes différents sont présents.

La réaction de type III est caractérisée par l'inflection d'un des arcs de précipitation qui rencontre un autre arc, indiquant ainsi une certaine communauté antigénique entre les deux composants a et a_1.

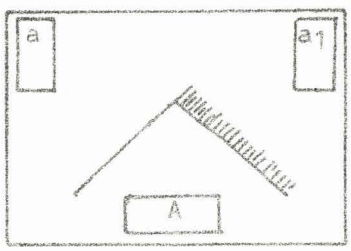
Il convient toutefois de signaler qu'en l'absence d'équivalence Ag/Ac, il peut y avoir une redissolution du précipité en excès d'antigènes ou d'anticorps, phénomène qui est également observé dans les réactions de précipitation en milieu liquide.

(*) N.Ac = quantité limite d'anticorps décelable exprimé en poids d'azote.



Par ailleurs, un déséquilibre du rapport antigène-anticorps peut également entraîner :

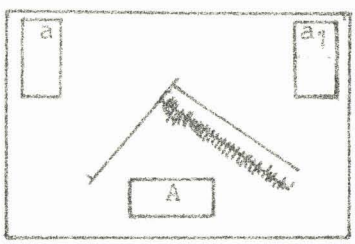
- soit une traînée près d'un arc de précipitation donnant l'aspect suivant :



$A = Ac$
$a = Ag$
$a > a_1$

- soit un dédoublement de l'arc de précipitation.

BUS LILLE



$A = Ac$
$a = Ag$
$a > a_1$

L'interprétation d'un diagramme de précipitation devra donc tenir compte de ces notions classiques en immunologie ; il nécessite une étude comparative des solutions de concentrations différentes en antigènes et en anticorps. De plus, seule la confrontation et la comparaison des diagrammes de précipitation, acquises aux différents temps de la réaction, permettront de se faire une idée du nombre exact de couples antigène-anticorps, entrant en jeu dans la réaction.

CHAPITRE III

STRUCTURE ANTIGENIQUE ET FRACTIONNEMENT DES ANTIGENES DE MYCOBACTERIUM PHLEI

Lorsque nous avons pensé isoler des fractions macromoléculaires de mycobactéries, encore fallait-il pouvoir les situer dans la cellule bactérienne et pour cela connaître la structure d'une mycobactérie. La connaissance parfaite de la structure est en effet indispensable pour sélectionner les méthodes de fractionnement. Ainsi l'étude des différentes structures morphologiques pouvait amener à comprendre quel complexe macromoléculaire était susceptible d'être attaché à la paroi, de préciser l'importance des structures membranaires et la relation de tel antigène avec telle structure.

Toutes ces raisons nous ont donc amené à une étude préliminaire de la structure, en microscopie électronique, de Mycobacterium phlei.

I - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE MYCOBACTERIUM PHLEI (79)

Nous nous sommes adressé à des microorganismes obtenus dans les mêmes conditions de culture que ceux utilisés pour l'extraction de fractions macromoléculaires antigéniques. Il s'agit de cultures agitées faites sur milieu de Sauton. Pour avoir des bactéries en phase exponentielle de croissance, nous avons utilisé des cultures de quarante hui

Mycobacterium phlei

Aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°2

Mycobacterium phlei (coupe longitudinale)

ci : couche inerte

p : paroi

mc : membrane cytoplasmique

sp : sphérule

n : noyau

m : mésosome

ci
p
mc
sp
0,2 µ

heures de croissance, au maximum.

Les mycobactéries sont fixées selon la technique de RYTER et KELLENBERGER (87) et fixées à l'épon selon LUFT (48). Les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome Porter Blum, recueillies sur grilles nues, lavées à l'hydroxyde de plomb. Lorsqu'on examine une coupe de Mycobacterium phlei (photographie n° 2), on distingue trois zones essentielles : les enveloppes bactériennes, le cytoplasme avec son matériel nucléaire et enfin une structure particulière, invagination de la membrane cytoplasmique, le mésosome, situé dans le cytoplasme et accolé au noyau. L'enveloppe a une épaisseur moyenne de 450 Å et comprend une couche externe, une paroi et une membrane cytoplasmique.

La couche la plus externe, appelée couche "inerte", prenant très mal les colorants, entoure la bactérie d'une manière continue. Cette couche, d'une épaisseur de 170 Å, dont la composition chimique est inconnue, résiste aux traitements physiques auxquels sont soumises les mycobactéries. La présence de cette structure semble être à l'origine de la grande résistance de ces germes aux divers agents agresseurs, physiques et chimiques. On a pu se rendre compte que cette couche "inerte" reliait entre eux et accolait les microorganismes et expliquait, sans doute, la formation fréquente d'amas.

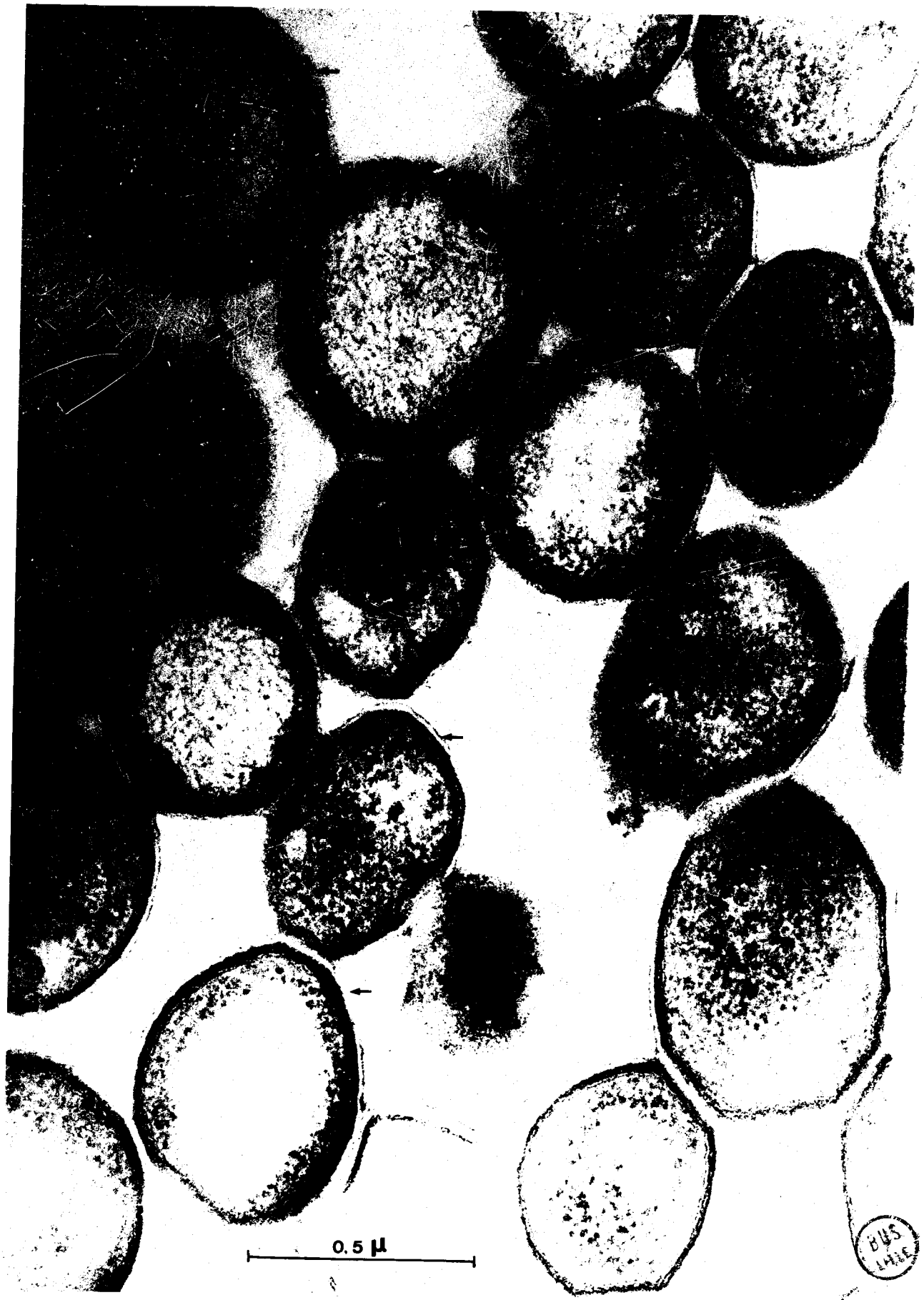
Ceci a pu être démontré de façon fortuite, par l'étude de l'obtention de sphéroplastes de mycobactéries. Pour obtenir ces sphéroplastes, nous nous sommes adressés à différents inducteurs dont le chlorure de lithium. L'examen en microscopie électronique des

Mycobacterium phlei

Aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°3

Mycobacterium phlei traité par le LiCl. On note une visualisation plus nette de la couche amorphe


0.5 µ

coupes de mycobactéries traitées au LiCl (photographie n° 3), permet d'individualiser d'une façon beaucoup plus précise cette couche externe. Aucune explication n'a pu être apportée à ce phénomène ; en effet le LiCl, métal léger, ne peut en aucun cas être considéré comme un contrastant. L'explication la plus plausible est une combinaison du LiCl avec des composants de la couche amorphe, modifiant l'opacité aux électrons de cette couche.

La paroi, d'une épaisseur moyenne de 100 Å, est étroitement accolée à la couche amorphe, même après cryobroyage. Après la paroi se situe une couche de 100 Å environ, peu dense aux électrons et qui sépare la paroi proprement dite et la membrane cytoplasmique. Le problème qui se pose est de savoir si cette couche doit être rattachée directement à la paroi, ou si elle a une existence autonome.

La membrane cytoplasmique est composée de deux feuillets séparés par une distance de 80 Å. Le fait que la membrane cytoplasmique ne soit pas directement accolée à la paroi, permet d'expliquer la présence dans le surnageant S_2 des fragments de membranes (sans compter le mésosome). En effet, les relations avec la paroi n'étant pas très étroites, il est normal que la membrane puisse se détacher de la paroi et passer facilement dans le surnageant.

En dehors de ce système d'enveloppe, on trouve encore classiquement le matériel nucléaire et le cytoplasme. Ce dernier contient de nombreuses particules denses de 150 Å de diamètre qui sont des ribosomes. On observe également des sphérules de nature indéterminée,

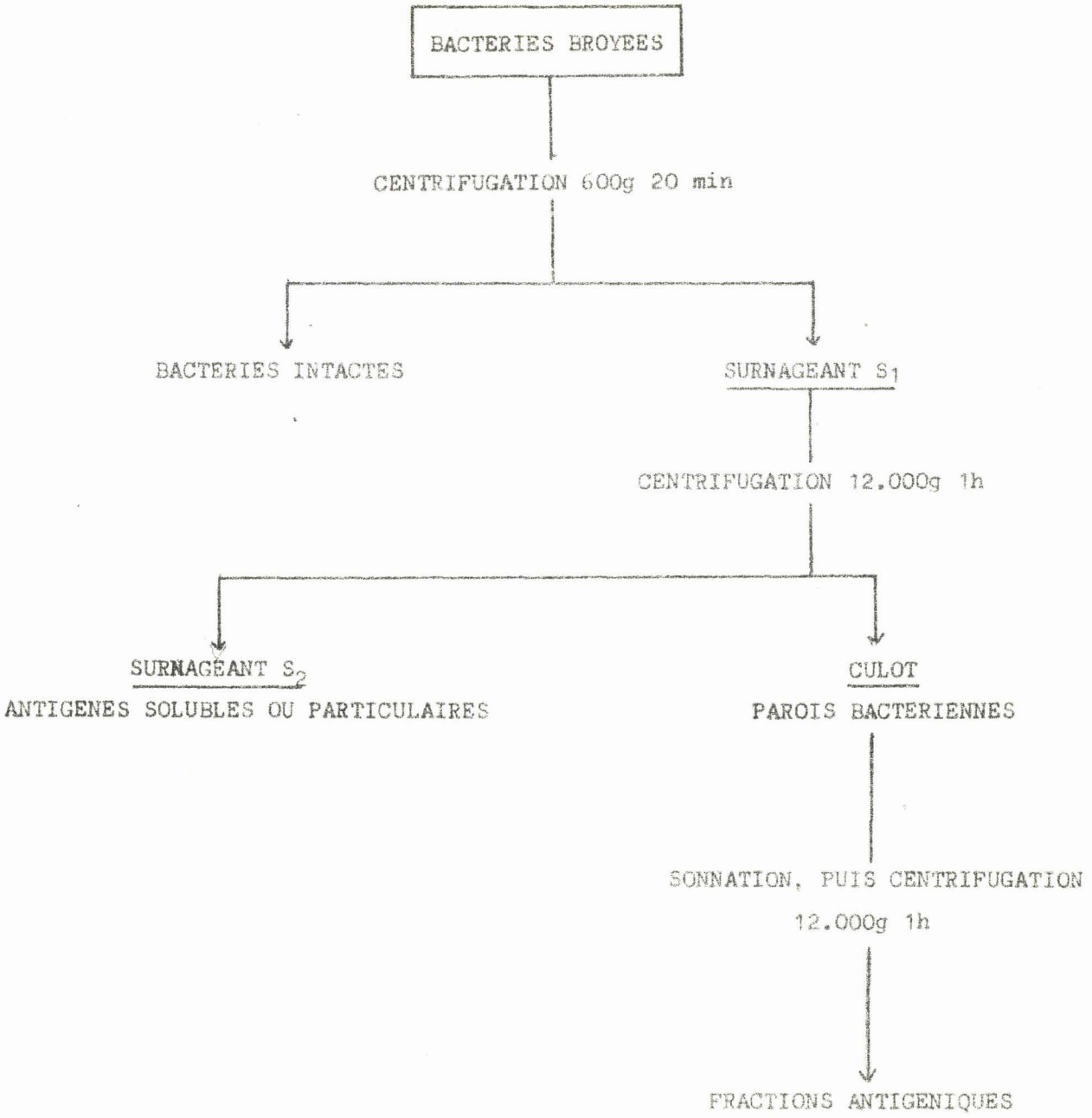
les uns peu denses, les autres très opaques qui, pour TAKEYA, sont des granules de polyphosphates. Cependant, la formation intracellulaire caractéristique de ces mycobactéries est surtout constituée par un mésosome. Il s'agit d'un ensemble relativement important, pouvant atteindre 0,5 à 0,6 µ de diamètre. Cette masse est entourée d'une enveloppe double qui n'est que le prolongement de la membrane cytoplasmique. On retrouve en effet les deux feuillets de la membrane, dont l'un est d'ailleurs plus opaque aux électrons, feuillets séparés par un certain espace. A l'intérieur de cette enveloppe, se trouvent des structures lamellaires ou tubulaires (il est en effet difficile de reconstituer à partir d'images en deux dimensions des structures en trois dimensions). Qu'elles soient tubulaires ou lamellaires, ces structures ont un aspect identique, en microscopie électronique, à la membrane cytoplasmique et à l'enveloppe du mésosome, c'est-à-dire deux feuillets de densité différente, séparés par une zone claire. Ce mésosome proviendrait d'invaginations successives de la membrane cytoplasmique ; lieu de localisation de nombreuses enzymes comme la membrane cytoplasmique, il joue un rôle dans la division. En effet, dans une mycobactérie en division, ce mésosome est toujours en contact avec le noyau qu'il semble scinder ; on constate que le mésosome est en relation avec le septum au moment de la division, ceci a été mis en évidence également par RYTER chez Bacillus subtilis (88). Cette structure doit être détachée très facilement lors du broyage bactérien et se retrouver en partie dans le surnageant.

La structure générale de Mycobacterium phlei étant décrite, nous allons essayé de voir maintenant quelle peut être la répartition au cours des fractionnements, des éléments bactériens après cryobroyage et quelles sont les relations qui peuvent être mises en évidence entre l'antigène et la structure bactérienne.

II - FRACTIONNEMENT PRELIMINAIRE

Le cryobroyage des mycobactéries permet d'obtenir un mélange de bactéries intactes (le broyage ne peut jamais concerner la totalité des bactéries), des parois bactériennes et un mélange complexe comprenant tout le contenu cytoplasmique, DNA, RNA, ribosomes, débris de membranes cytoplasmiques et de mésosomes. Le premier problème est donc de procéder à un positionnement de ces différents constituants dans les différentes phases du fractionnement en tenant compte des notions acquises par l'étude en microscopie électronique. En effet, il semble bien que si la couche amorphe et la paroi forment un ensemble relativement homogène, on doive retrouver ces deux constituants reliés l'un à l'autre. Dans la phase en suspension, on doit retrouver certes les différents constituants, ribosomes, DNA, "polyphosphates", mais aussi des "fragments" de membranes et de mésosomes.

Notre fractionnement a été réalisé à partir des bactéries broyées et homogénéisées, dans un broyeur à couteaux type Virtis, avec un tampon Tris Hcl 10^{-2}M, $MgCl_2$ 10^{-2}M à pH 7,4. Ce broyat a été tout d'abord débarrassé des bactéries intactes par une première centri-



SEPARATION ET OBTENTION D'ANTIGENES SOLUBLES ET DE PAROIS BACTERIENNES A PARTIR D'UN BROYAT DE MYCOBACTERIES.

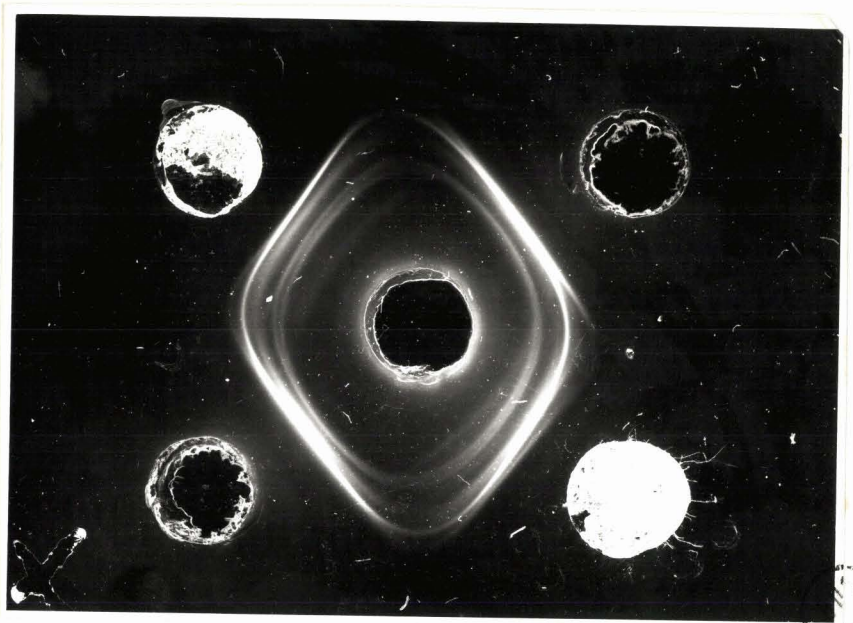
TABLEAU IV

fugation à 600 g pendant 20 minutes. Nous avons obtenu ainsi un surnageant dans lequel se trouvaient les antigènes solubles mélangés avec les parois. Le premier surnageant a été appelé S_1 ; nous avons ensuite séparé les parois des antigènes solubles par une centrifugation à 12.000 g pendant une heure. Les antigènes solubles ou particulaires ont été retrouvés dans le surnageant, les parois dans le culot. Ces différentes fractions ont fait l'objet d'observations en microscopie électronique, après ombrage phosphotungstique. Ces examens nous ont permis de vérifier l'absence de bactéries intactes dans le surnageant S_1 et l'absence de parois dans le surnageant S_2. Cette séparation a été résumée sur le tableau IV. Les différents temps de centrifugation et les vitesses de séparation, ont été déterminés après avoir contrôlé en microscopie électronique que les surnageants étaient exempts de bactéries ou de parois.

Nous avons donc séparé un surnageant S_2 qui renferme des antigènes particulaires ou solubles et un culot contenant exclusivement les parois bactériennes.

III - STRUCTURE ANTIGENIQUE DES PAROIS

Nous avons tenté d'obtenir des fractions d'antigènes à partir des parois soumises à l'action de vibrations sonniques, afin de séparer quelques structures macromoléculaires. La sonnation a été effectuée pendant 15 Minutes avec un Raytheon Sonic Oscillator (puissance 10 Kc). Les résidus de parois ont été séparés des fractions isolées par



Structure antigénique de parois de Mycobacterium phlei
en réaction d'Ouchterlony

godet central : Immun-sérum anti-antigènes de parois
godets périphériques : Ag de parois

PHOTOGRAPHIE N°4

une centrifugation de 12.000 g pendant une heure. Le surnageant 12.000 g (S_3) a servi à préparer un immun-sérum.

Les réactions d'Ouchterlony, pratiquées entre ce sérum de parois et les extraits de parois, ont montré la présence de cinq fractions antigéniques (photographie n° 4).

Nous avons procédé également à des réactions croisées entre l'immun-sérum préparé à partir du surnageant 12.000 g (S_2) et les fractions obtenues à partir des parois. Nous avons constaté la présence de cinq fractions antigéniques. Des réactions croisées, faites d'une part avec l'immun-sérum anti-surnageant S_2 (c'est-à-dire le surnageant avec le contenu cytoplasmique, le DNA, les membranes) et les surnageants S_2 et S_3 (fractions de parois), et d'autre part, avec l'immun-sérum anti S_3 réagissant avec les surnageants S_2 et S_3, prouvent que le surnageant contient les mêmes antigènes que ceux extraits des parois. Donc, en soumettant des parois à la sonnation, on ne fait que détacher des structures qui sont déjà passées partiellement dans le surnageant au moment du cryobroyage.

Il n'est pas possible, avec les méthodes que nous nous sommes imposées, de pousser plus loin le fractionnement des structures macromoléculaires isolées de parois.

Des études complémentaires ont été faites pour tenter d'isoler par des méthodes chimiques, différents constituants de la paroi, dont les caractères antigéniques ont été comparés à ceux

obtenus précédemment. Après différents essais de "solubilisation" des parois, nous avons obtenu une rupture de celles-ci et la transformation en substances particulaires par l'action du mélange :

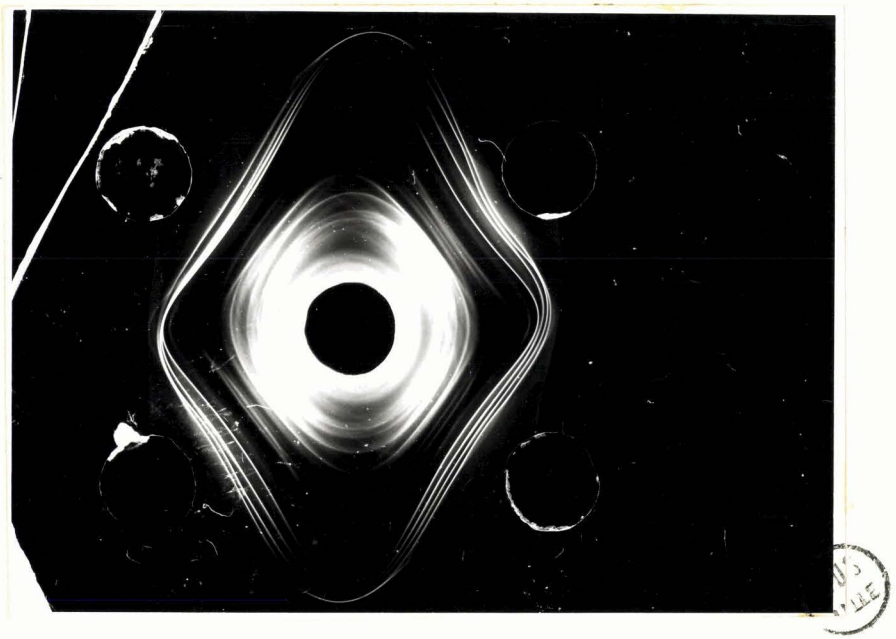
$$v/v \begin{cases} \text{urée} = 8\ M \\ \text{Brij 7 p. 100 (polyoxyéthylène cetylether)} \end{cases}$$

Le traitement par ce mélange permet d'obtenir une disparition de la structure des parois, ainsi que le vérifie l'examen en microscopie électronique. L'immun-sérum préparé à partir de ces parois solubilisées, n'a permis de déceler que cinq fractions antigéniques, celles-ci étant exactement celles que nous avions extraites par sonnation et qui sont donc présentes dans le surnageant.

Des essais d'études immunologiques ont été également faits sur des extraits de parois obtenus après traitement enzymatique (trypsine notamment) et là encore, nous n'avons obtenu que des structures trop altérées pour pouvoir être considérées comme des structures macromoléculaires antigéniques.

L'étude des antigènes de parois nous a donc semblé difficile sans altérer la nature de ces structures macromoléculaires, tout au moins dans la limite des techniques que nous nous étions imposées.

Ces constatations nous ont conduit à étudier des antigènes extraits du surnageant, sans leur faire subir aucun traitement chimique ultérieur, de façon à ne pas altérer les structures antigéniques.

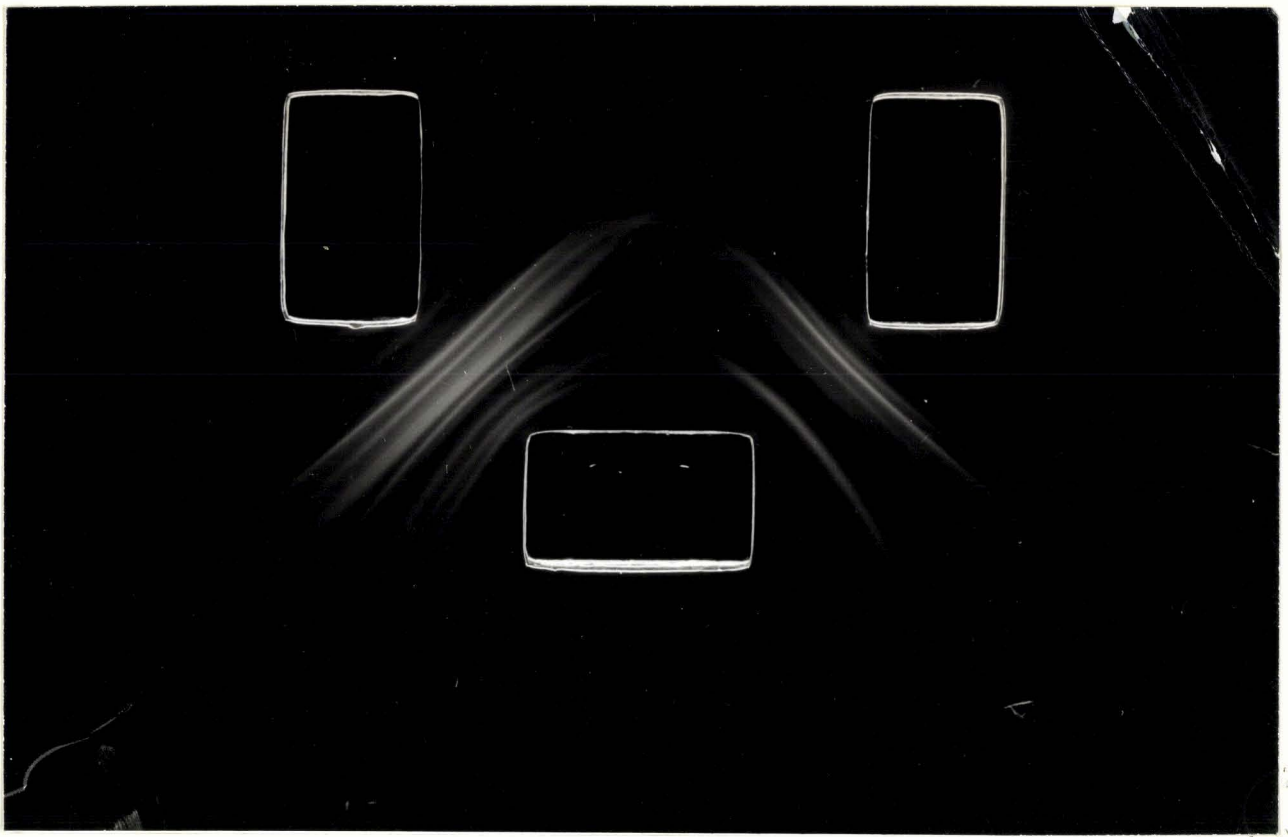


Structure antigénique du S 12.000 g de Mycobacterium phlei
en réaction d'Ouchterlony
(microméthode)

godet central : Immun-sérum anti S 12.000 g

godets périphériques : S 12.000 g (titrent 10 mg/ml en protéines)

PHOTOGRAPHIE N°5

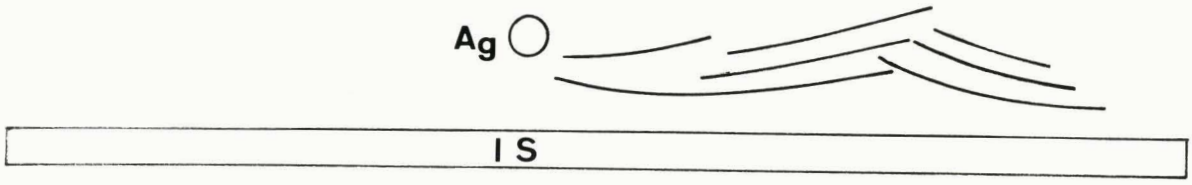


Structure antigénique du S 12.000 g de Mycobacterium phlei
en réaction d'Ouchterlony
(macrométhode)

godet inférieur : Immun-sérum anti S 12.000 g

godets supérieurs
- gauche : S 12.000 g pur
- droit : S 12.000 g dilué au 1/100

PHOTOGRAPHIE N°5bis



BIU LILLE

Dans le godet : S. 12.000 g

Dans la rigole : Immun-sérum anti S 12.000 g

DIAGRAMME IMMUNOELECTROPHORETIQUE DU SURNAGEANT 12.000 g

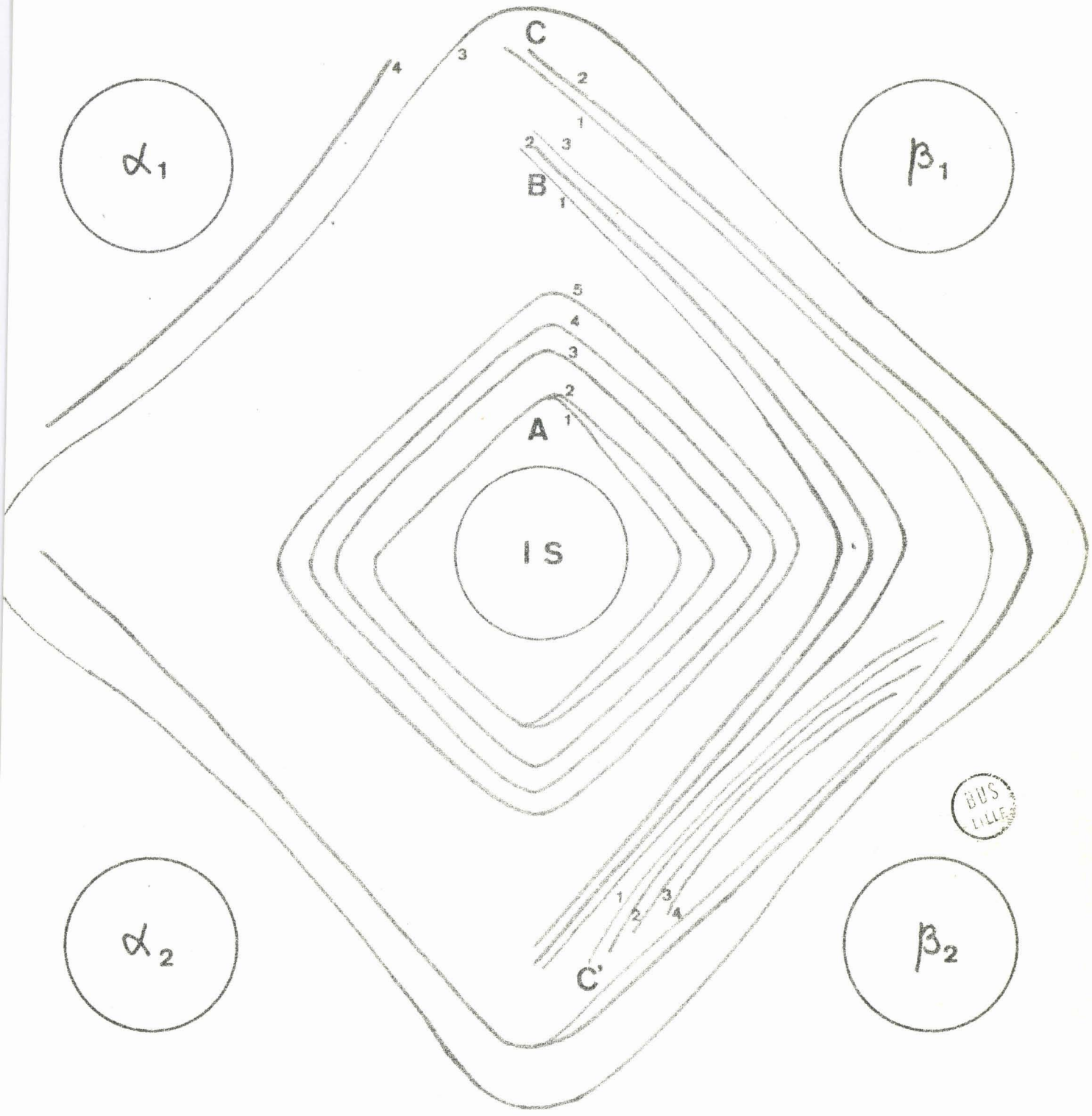
Schéma n° 3

IV - STRUCTURE ANTIGENIQUE DU SURNAGEANT 12.000 g S_2

Le surnageant S_2 est obtenu par centrifugation à 12.000 g du broyat bactérien débarrassé de bactéries entières. Ce surnageant, en tenant compte des données morphologiques et de l'étude de parois, doit donc contenir des morceaux de membrane et de mésosome, la matériel nucléaire, les ribosomes et tout le contenu cytoplasmique. Ce surnageant S_2, concentré par ultrafiltration, a été utilisé pour la préparation d'un immun-sérum, selon les modalités décrites au chapitre "Techniques".

La première méthode utilisée pour mettre en évidence la structure antigénique du surnageant S_2 a été l'immunoélectrophorèse. Celle-ci nous a permis d'observer sept fractions antigéniques, comme l'indique le schéma n° 3. Devant le petit nombre de fractions caractérisées et l'impossibilité de faire varier le rapport antigène/anticorps, nous avons préféré utiliser la technique d'Ouchterlony. Celle-ci nous a permis de mettre en évidence 12 fractions antigéniques qui ont été désignées par les lettres A, B, C, précisant la position des trois groupements principaux, lettres suivies de chiffres pour indiquer chaque arc de précipitation. La photographie n° 5 représente la composition antigénique du surnageant S_2.

En faisant varier le rapport antigène/anticorps, il est possible d'obtenir par centrifugation à 100.000 g une concentration des antigènes et de mettre en évidence quatre nouvelles fractions antigéniques appelées C'1, 2, 3 et 4. Nous avons procédé également à des essais avec des immunoglobulines Ig G purifiées, obtenues à partir de l'immun-sérum,



BUS LILLE

STRUCTURE ANTIGENIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI

Schéma n° 4

qui nous ont permis de faire varier le rapport Ag/Ac par augmentation de la concentration en anticorps. Ceci nous a permis de déceler 16 fractions antigéniques (voir schéma n° 4).

La recherche d'un diagramme antigénique le plus complet possible était indispensable pour qu'ensuite le fractionnement des antigènes puisse être considéré comme valable. En effet, lors de l'étude du fractionnement, nous mettons en contact avec l'immun-sérum un antigène séparé et concentré par rapport au surnageant de départ. Dans ce cas, le rapport Ag/Ac est fortement perturbé. Il était donc indispensable de nous assurer, par une série de réactions d'Ouchterlony faisant varier, dans des limites très larges, ce rapport Ag/Ac, que nous avions un nombre déterminé d'antigènes, quelles que soient les variations du rapport Ag/Ac.

V - FRACTIONNEMENT DU SURNAGEANT S_2

Ayant obtenu un broyat bactérien par des méthodes altérant le moins possible les structures antigéniques, il s'agissait ensuite de fractionner ce broyat, afin d'obtenir des structures macromoléculaires antigéniquement pures, le but de notre travail étant l'étude de la structure des antigènes, de leur emplacement dans la cellule et de leur rôle immunologique. Il était indispensable de mettre au point des techniques permettant d'obtenir, à partir du surnageant S_2, des fractions antigéniquement pures, dans nos conditions expérimentales.

Nous avons exclu tout fractionnement par des moyens chimiques, ce qui limitait notre méthode aux techniques physiques telle la centrifugation et la chromatographie.

Nos essais de mise au point d'une méthode de séparation de nos antigènes a été précédée d'un travail préliminaire consistant à comparer les différentes techniques d'isolement possibles : obtention de procédés précis et surtout reproductibles permettant d'obtenir ainsi des quantités importantes de matériel, afin d'étudier les structures macromoléculaires obtenues; maintien de la stabilité des structures antigéniques au cours du fractionnement.

A partir d'un mélange aussi complexe comportant 16 fractions antigéniques, il était impossible de pouvoir séparer en une seule étape des fractions antigéniquement pures. Il était donc nécessaire d'étudier au préalable différentes techniques, de voir quelle approche de fractionnement on pouvait espérer de chacune d'elles et de combiner ensuite une association la plus favorable au fractionnement.

Pour nos séparations, nous avons employé un surnageant S_2 à une concentration de 10 mg/ml de protéines (dosage par la technique de LOWRY, 47).

1) Techniques

a) Technique de chromatographie sur DEAE cellulose DE 11

La cellulose, lavée dans un excès d'eau distillée est soumise à des décantations successives pour éliminer les particules les plus fines. La cellulose est mise en suspension dans un volume X de Hcl 0,5 N, puis le surnageant est éliminé ; la cellulose remise en suspension dans le même volume X de NAOH 0,5 N puis lavée à l'eau distillée. Ensuite, on remplit la colonne avec la cellulose et on termine par un rinçage à l'eau distillée pour avoir un effluent neutre. On fait passer au-travers de la colonne le tampon de l'éluent (Tris 10^{-2}M Hcl pH 7,4). La colonne est alors prête pour le dépôt de l'échantillon et le démarrage de l'élution avec un gradient de NaCl 0,1 M à NaCl M (en tampon Tris 10^{-2}M Hcl pH 7,4). Le débit est de 5 ml par minute, régularisé par une pompe péristaltique.

b) Technique de la filtration sur gel de Sephadex

La Sephadex est mise à gonfler dans un excès de solvant utilisé pour l'élution : il s'agit d'un solvant $\begin{matrix}\text{Tris Hcl } 10^{-1}\text{M}) \\ \text{NaCl} \quad\quad \text{M} \quad\quad)\end{matrix}$ pH 8. Ce solvant est toujours utilisé après stérilisation à l'autoclave. On ajoute en outre une faible dose d'agent bactériostatique : du mercurothiolate sodique à 1 p. 10.000.

Le gel gonflé est lavé à l'eau distillée plusieurs fois de suite avec décantation et élimination des particules surnageantes.

Après dégazage, on remplit la colonne ; finalement, on fait passer un certain volume de tampon pour stabiliser le gel. On peut alors effectuer le dépôt de l'échantillon et l'élution. Le débit est de 5 ml par minute, régularisé par une pompe péristaltique.

c) Technique de gradient de centrifugation

On réalise un gradient de saccharose en tampon Tris $MgCl_2$ 10^{-2}M à pH 7,2. Les solutions de saccharose sont stérilisées avant emploi 30 minutes à 120°C.

La réalisation du gradient se fait dans un mélangeur constitué de deux réservoirs reliés par un robinet, le mélange se faisant par barbotage d'azote "R". Les prélèvements sont réalisés, non par percement du pot à centrifuger, mais à l'aide d'une aiguille que l'on plonge dans le gradient.

2) Fractionnement en une seule étape

Notre idée première fut d'essayer de fractionner le surnageant par centrifugation, non pour obtenir un antigène pur, mais pour essayer de fractionner en groupements d'antigènes notre complexe initial de 16 antigènes.

a) Fractionnement par centrifugation

Différents essais de centrifugation, à différents temps et différentes vitesses, nous ont montré qu'une centrifugation de 4 h à 144.000 g permet de séparer les antigènes solubles en quatre fractions, deux surnageants α_1 et α_2 et deux fractions sédimentables appelées β_1 et β_2. La fraction α_1, la plus légère, est opalescente et possède une teneur en protéines de 3,4 mg/ml et une teneur en oses de 1,75 mg/ml (technique à l'Orcinol, 125).

La phase intermédiaire α_2 est limpide et possède une concentration en protéines de 5,2 mg/ml et en oses de 9 mg/ml. Le culot est formé de deux fractions superposées, β_1 d'aspect gélatineux incolore (concentration en protéines 10,4 mg/ml et en oses 9,6 mg/ml) et β_2 (concentration en protéines 10,4 mg/ml et en oses 12,2 mg/ml). Tous ces chiffres de dosage correspondent à la concentration obtenue après dilution du culot au volume du surnageant initial. La structure antigénique de ces différentes fractions a été évaluée en réaction d'Ouchterlony et résumée sur le schéma n°4.

La fraction α_1 comporte quatre antigènes de type A et un antigène particulier C_4 qui n'est retrouvé dans aucune autre fraction. La fraction α_2 ne possède pas les antigènes C_1, C_4 B et A_1.

La fraction sédimentable β_2 donne un plus grand nombre d'arcs de précipitation (15 arcs) que le surnageant S_2 (12 arcs). Ces quatre fractions supplémentaires ont été appelées C'_1, C'_2, C'_3 et C'_4. La fraction β_1 ne diffère de la fraction β_2 que par l'absence de ces

fractions C'.

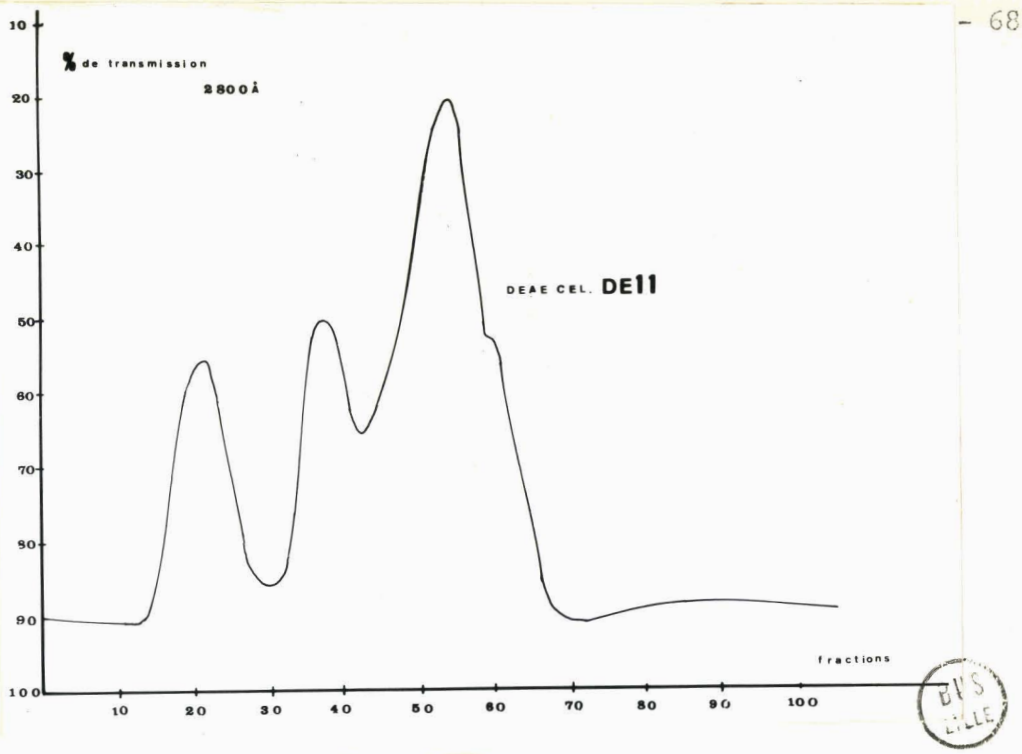
Nous avions donc obtenu par cette technique un début de fractionnement, tout au moins pour les deux surnageants. Nous pensions donc en partant de ce matériel, isoler des fractions antigéniquement pures en les soumettant à la chromatographie.

b) Fractionnement par la technique chromatographique

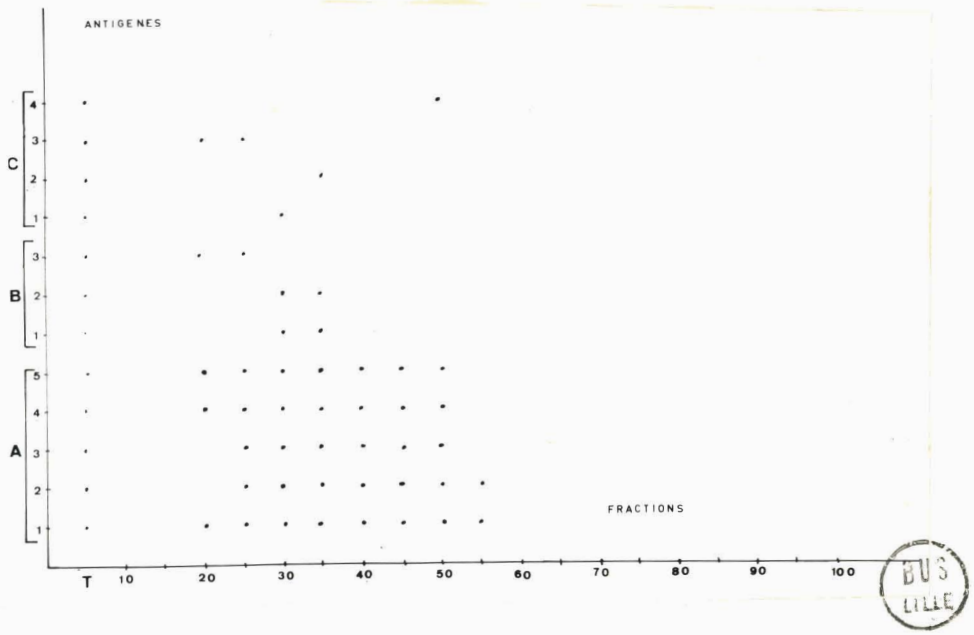
Reprenant les travaux de KNICKER (37), nous avons tout d'abord adopté la chromatographie sur DEAE cellulose DE 11, afin d'obtenir des fractions antigéniquement pures. Le fractionnement a été fait sur des colonnes de 20 mm de diamètre interne, d'une hauteur de 300 mm, réfrigérées. L'élution est effectuée avec un gradient de NaCl de 0,1 M à NaCl M en tampon Tris Hcl pH 7,4. Le volume de solvant étant de 400 ml, les fractions recueillies sont de 5 ml ; ces fractions sont recueillies à froid, groupées selon le diagramme d'élution et ensuite dialysées. Cette dialyse se fait également à 4°C contre de l'eau distillée. Après dialyse, les fractions sont lyophilisées et redissoutes avant d'être analysées par les techniques immunologiques. Nous n'avons jamais pu obtenir avec cette technique un fractionnement d'antigènes purs ou même un groupement de fractions antigéniques pouvant être isolées par la suite.

Des groupements de fractions plus réduits peuvent certes être obtenus par passages successifs sur différents types de résines.

1



2



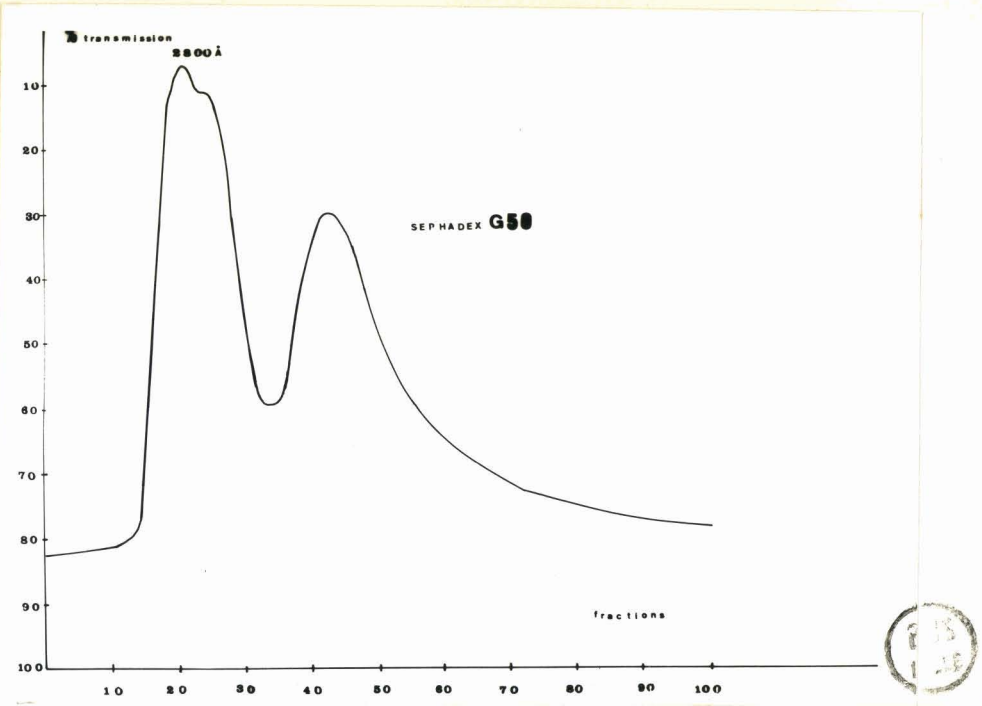
FRACTIONNEMENT SUR DEAE CELLULOSE DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Diagramme d'élution

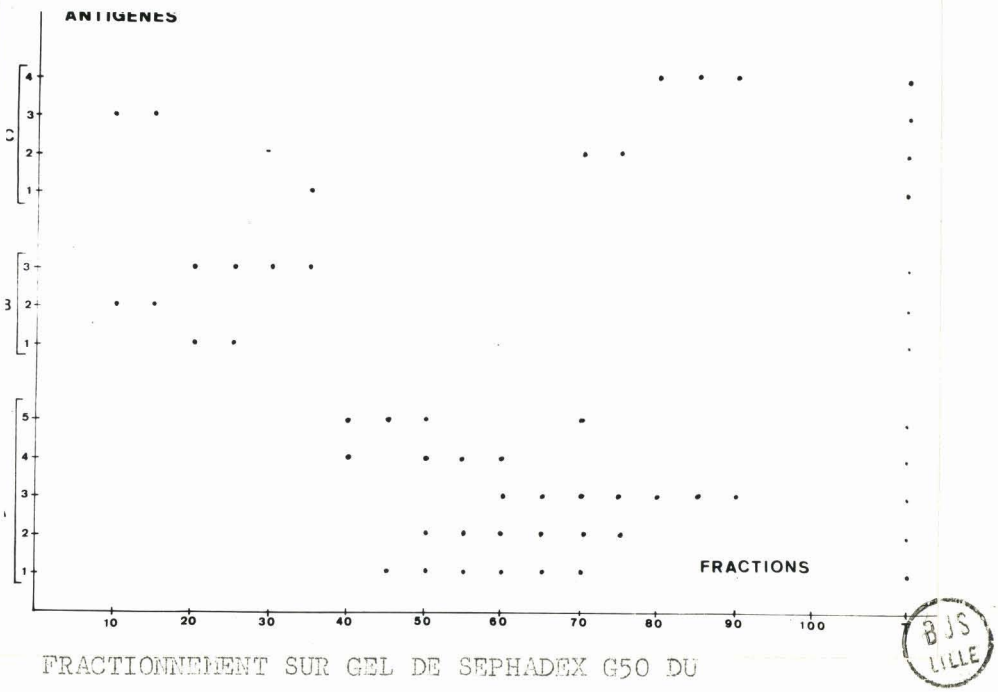
2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 5

1



2



BJS LILLE

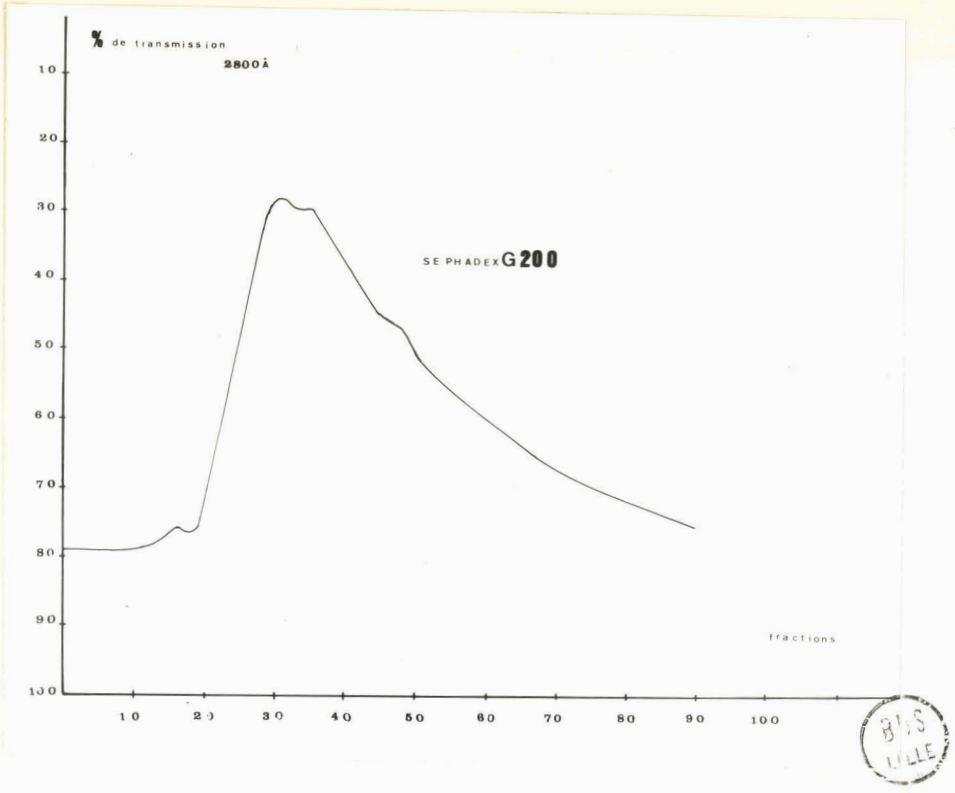
FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX G50 DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Diagramme d'élution

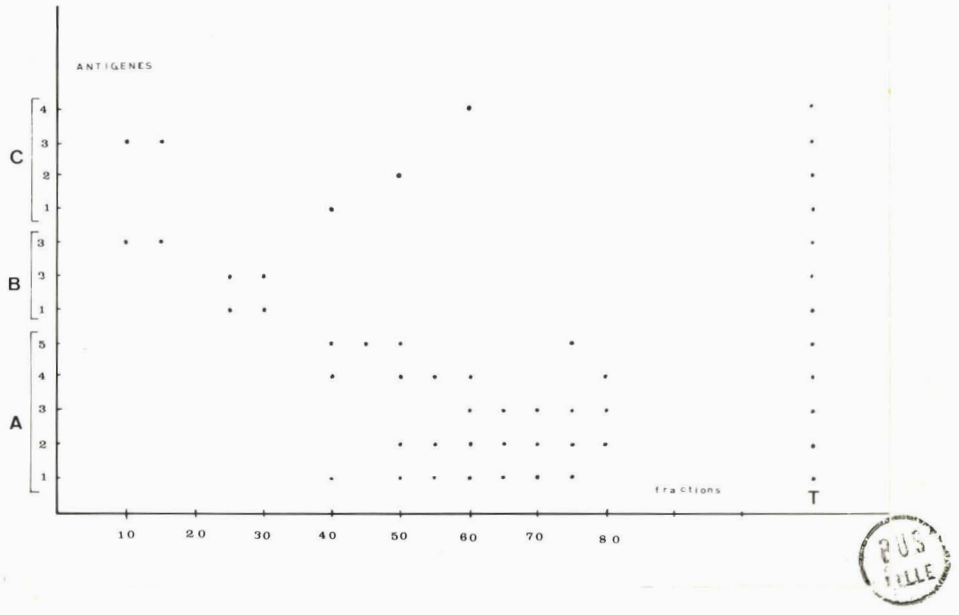
2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n°6

1



2



FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX G200 DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 7

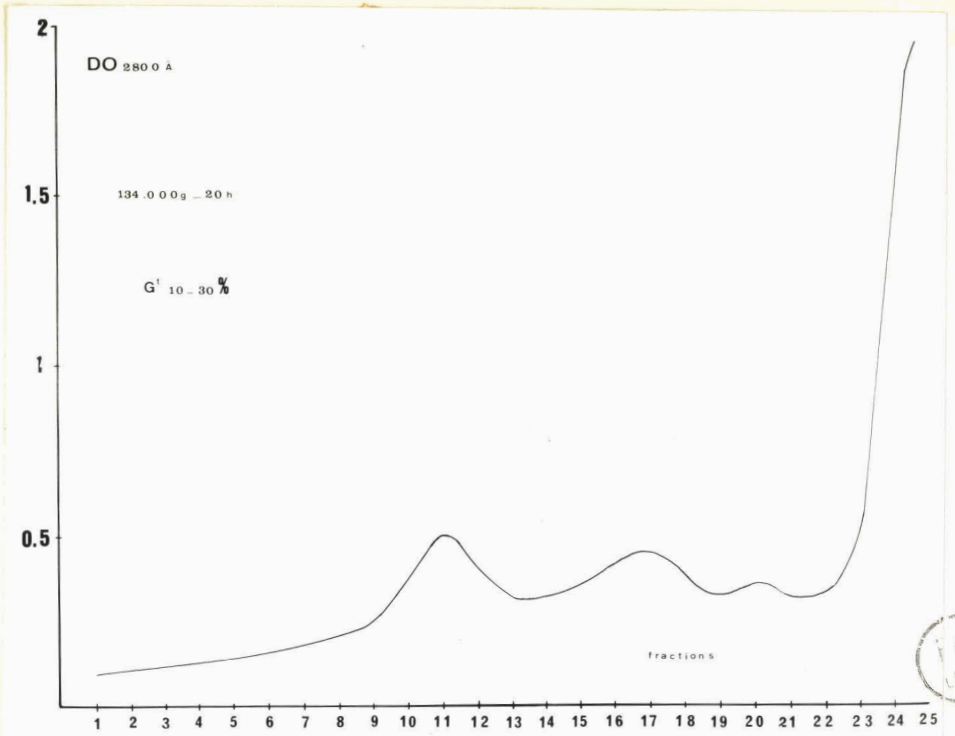
Comme pour la chromatographie sur DEAE, les fractions de 5 ml d'éluat sont recueillies à froid, groupées selon le diagramme d'élution et ensuite dialysées. La concentration des dialysats se fait ensuite par lyophilisation.

Sur les schémas de fractionnement n° 6 et 7, sont résumés les diagrammes d'élution avec les résultats immunologiques correspondant. Chaque point correspond à la présence d'un antigène dans la fraction correspondante du diagramme d'élution. Les résultats du fractionnement sont intéressants en ce qui concerne notamment le Sephadex G50 ; on constate en effet un début de séparation concernant les antigènes de type B.

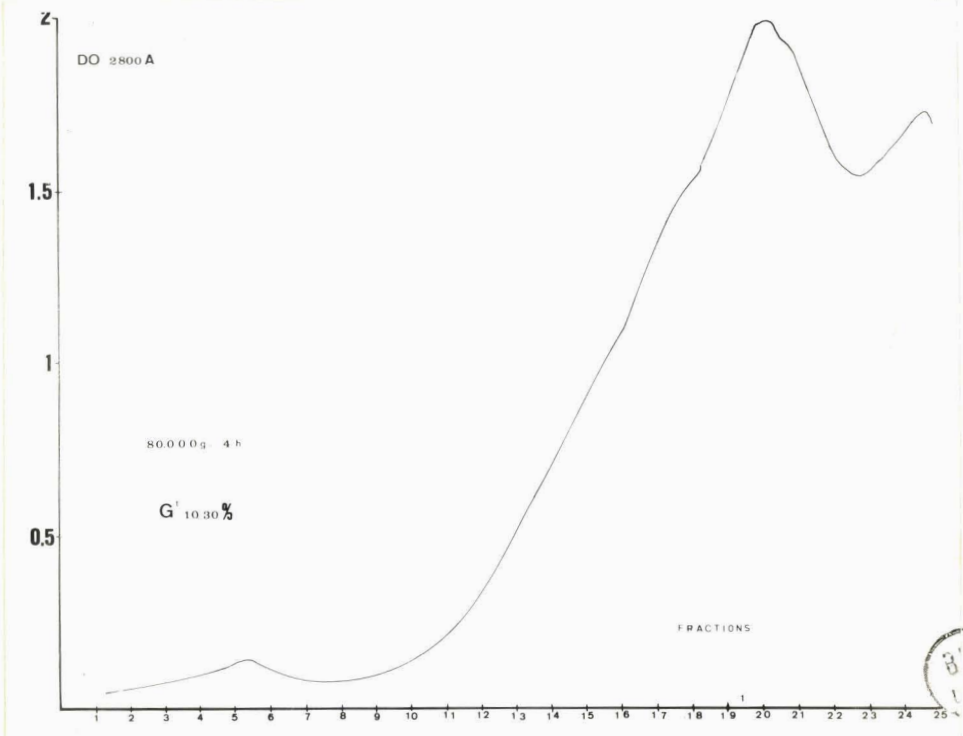
Cette fois encore, aucune fraction antigéniquement pure n'a pu être isolée. On note toutefois, en ce qui concerne les Sephadex G25 et G50, un meilleur étalement du fractionnement qu'avec les Sephadex G100 et G200.

Ce fractionnement donne des résultats d'une constance remarquable prouvée aussi bien par la régularité du diagramme d'élution que par la régularité des résultats immunologiques. Nous avons donc avec cette technique, une méthode donnant des résultats semblables à la méthode sur DEAE en ce qui concerne le fractionnement proprement dit, mais la régularité de fractionnement permet d'envisager son application à un travail en grande série.

1



2



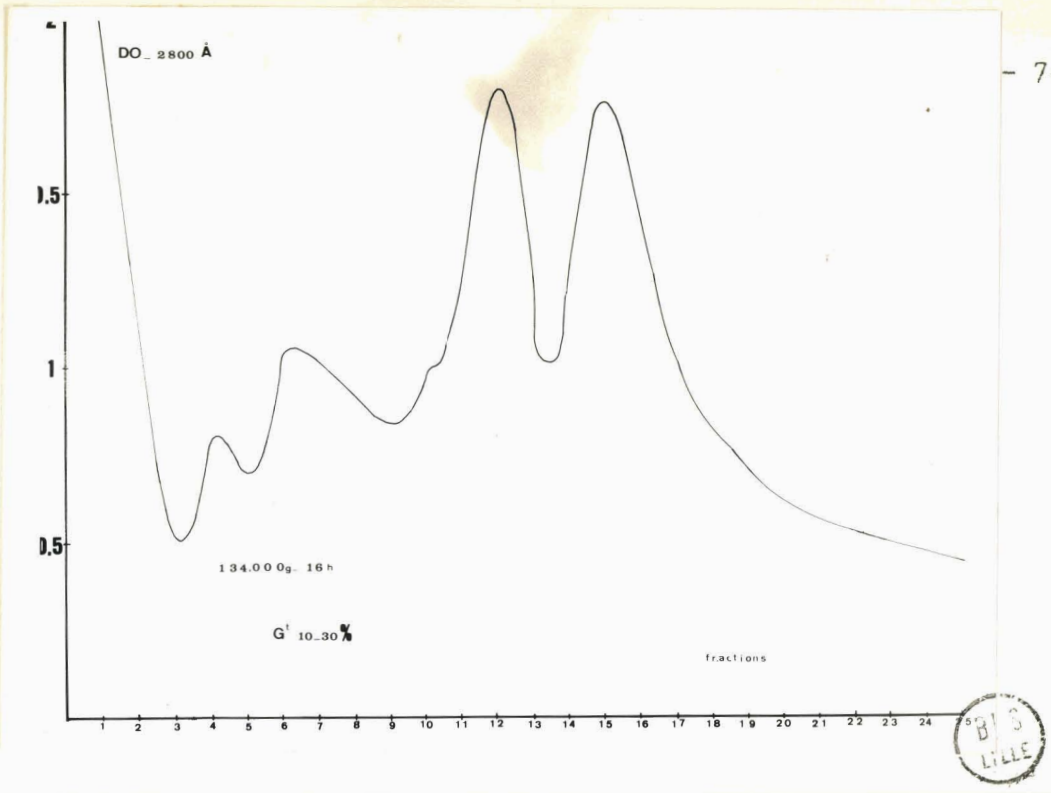
FRACTIONNEMENT EN GRADIENT 10 - 30 p. 100 DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - 134.000 g 20 h

2 - 80.000 g 4 h

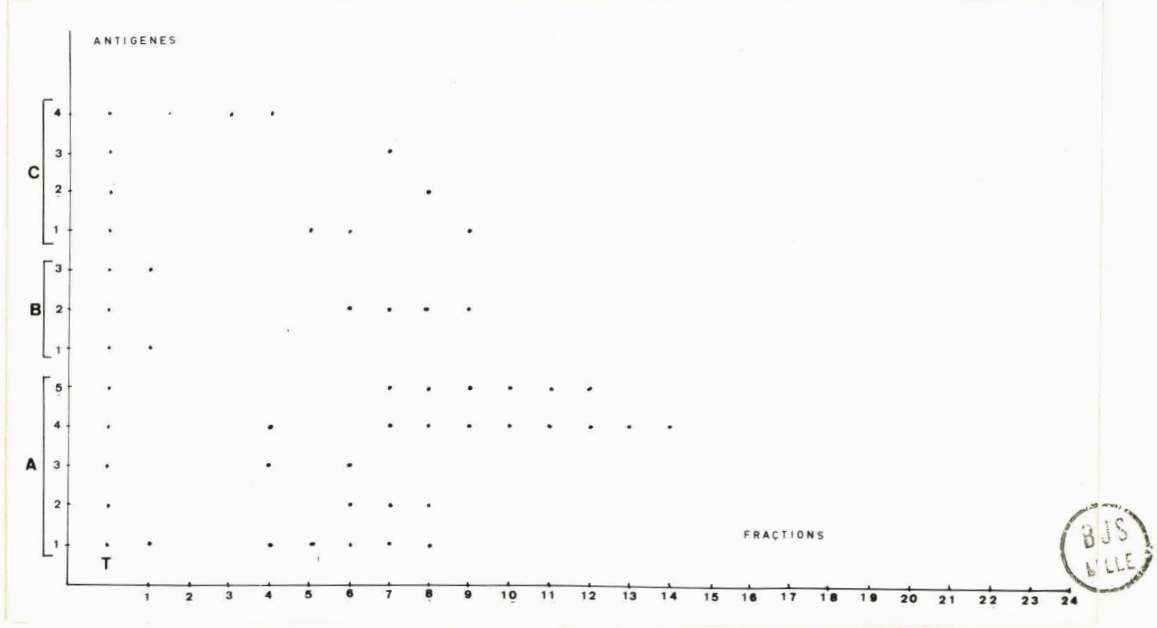
Schéma n° 8

1



B.U.S. LILLE

2



B.U.S. LILLE

FRACTIONNEMENT EN GRADIENT DE SACCHAROSE 10 - 30 p. 100
134.000 g 16 h DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 9

d) Fractionnement par gradient de sédimentation de saccharose

La centrifugation nous ayant déjà permis de séparer certains groupements de fractions, il était logique d'utiliser une méthode plus fine de séparation : le fractionnement en gradient de saccharose.

Les premières études furent réalisées à l'aide d'une couronne SW 39 L (Spinco) qui nous permettait un large éventail de vitesse, mais limitait la quantité à fractionner de 0,8 ml par tube. Après avoir déterminé le gradient de saccharose (10 - 30 p. 100) le plus favorable au fractionnement, nous avons étudié, comme le montrent les schémas n° 8 et 9, les vitesses et les temps de centrifugation nécessaires. La solution antigénique (0,8 ml) est déposée sur un gradient de saccharose 10 - 30 p. 100 (4,2 ml) et centrifugée. On recueille des fractions de 0,2 ml ; ces fractions sont diluées ensuite à 2,5 ml puis leur absorbance mesurée à 2600 et 2800 Å.

En essayant différents temps de 4 h à 20 h, différentes accélérations de 80.000 à 134.000 g, nous en sommes arrivé à employer un temps de 16 h pour une accélération de 134.000 g.

Les fractions de gradient ont pu être utilisées directement, sans dialyse préalable, en réaction d'Ouchterlony, celle-ci n'étant pas perturbée par la présence de saccharose.

Sur les schémas n° 8 et 9, sont représentés trois essais de diagramme de fractionnement avec le même gradient, mais avec des temps et des accélérations différentes. On constate bien que la meilleure

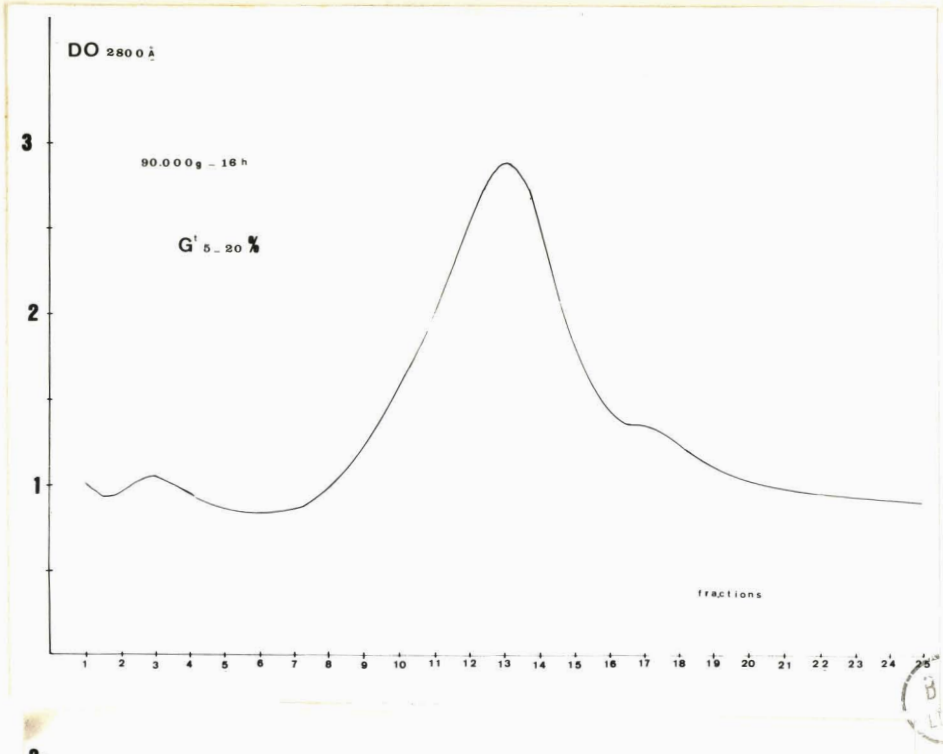
séparation est donnée par une accélération de 134.000 g avec un temps de 16 h. Sur le schéma n° 9, est représenté le diagramme du même gradient et la structure antigénique correspondant aux différentes fractions. Quoique la séparation ne soit pas effective (sauf pour un antigène de type B et un antigène de type C_1), les résultats sont supérieurs à ceux donnés par l'élution en gradient de chromatographie. On voit d'autre part, que les groupements de fractions sont intéressants à étudier. On trouve en effet :

dans la première fraction	3 antigènes
dans la troisième	1 antigène isolé
dans la quatrième	4 antigènes
dans la cinquième	3 antigènes
dans la sixième	5 antigènes
dans la septième	6 antigènes
dans la huitième	6 antigènes
dans la neuvième	4 antigènes
dans les dixième, onzième, douzième	2 antigènes
dans les deux dernières	2 antigènes séparés.

A l'exception de trois fractions, nous avons obtenu une bonne séparation. Ces résultats montrent l'intérêt de l'application de cette technique à l'approche du fractionnement des antigènes bactériens. La technique des gradients de saccharose est donc utile, non comme technique d'isolement d'antigènes purs, mais comme technique préparative de fractionnement.

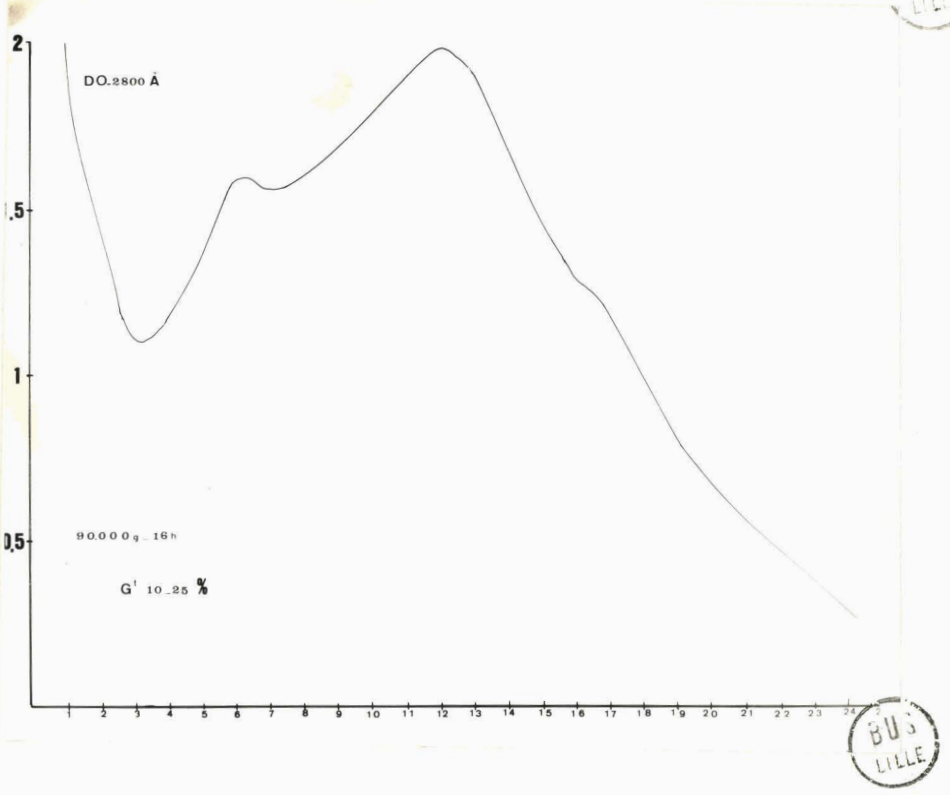
Malheureusement, si la séparation est excellente, les quantités séparées demeurent trop faibles et il est impossible

1



B.U.S
LILLE

2



BU
LILLE

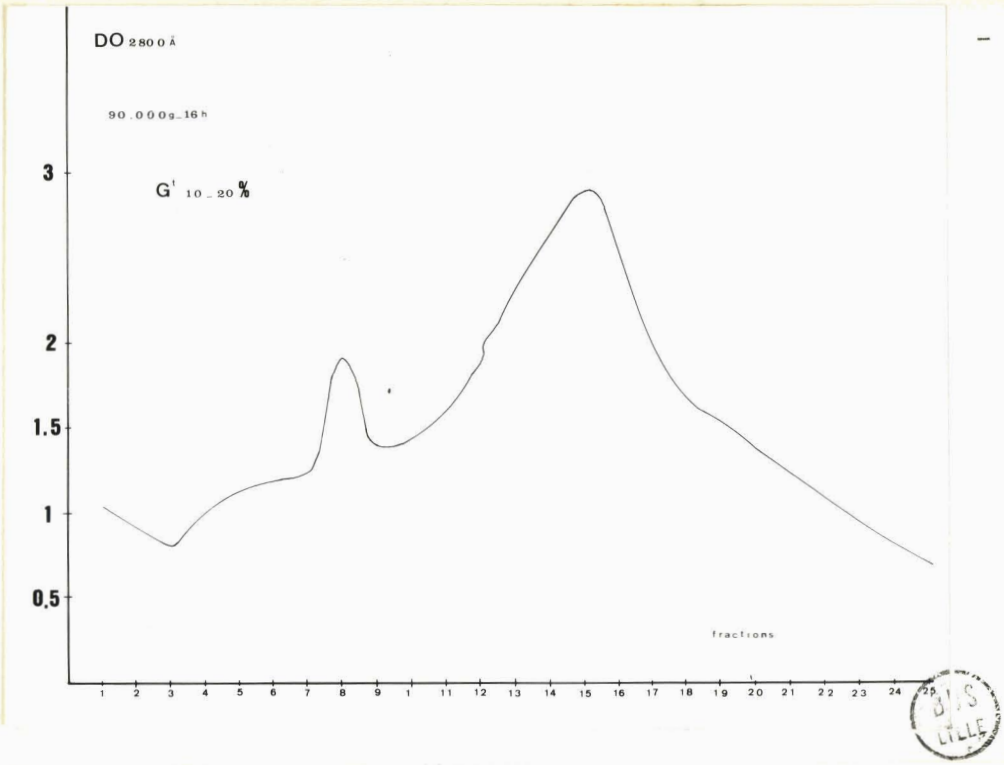
FRACTIONNEMENT EN GRADIENT DE SACCHAROSE DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Gradient 10 - 25 p. 100 - 90.000 g 16 h

2 - Gradient 5 - 20 p. 100 - 90.000 g 16 h

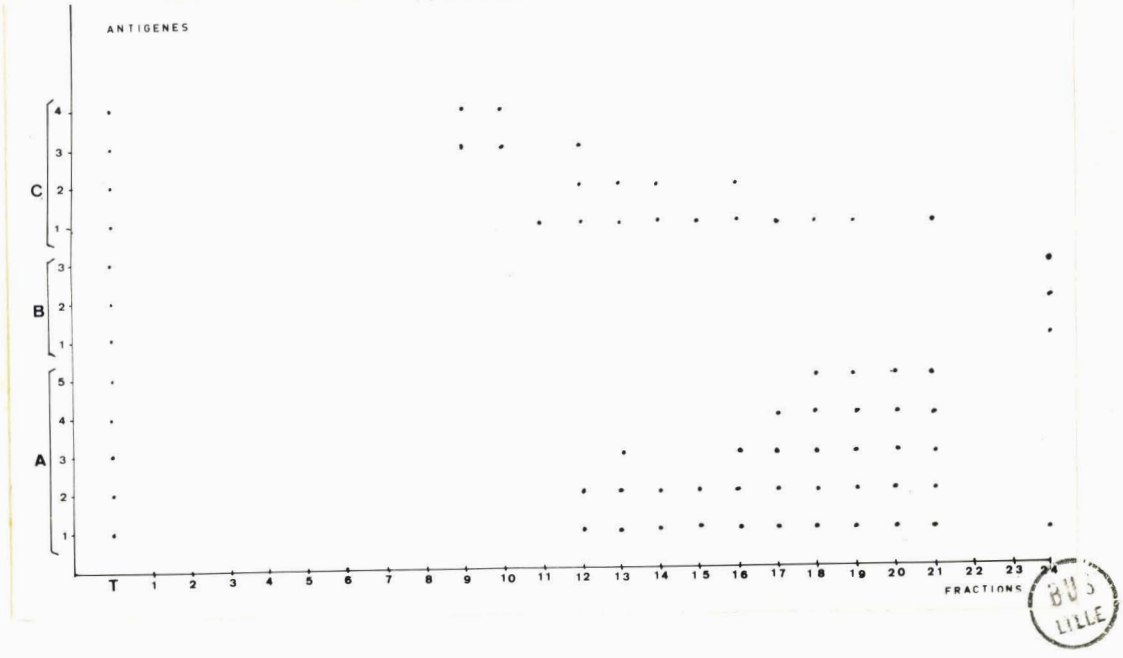
Schéma n° 10

1



BUS LILLE

2



BUS LILLE

FRACTIONNEMENT EN GRADIENT DE SACCHAROSE 10 - 20 p. 100
DU SURNAGEANT 12.000 g

1 - Diagramme d'élution

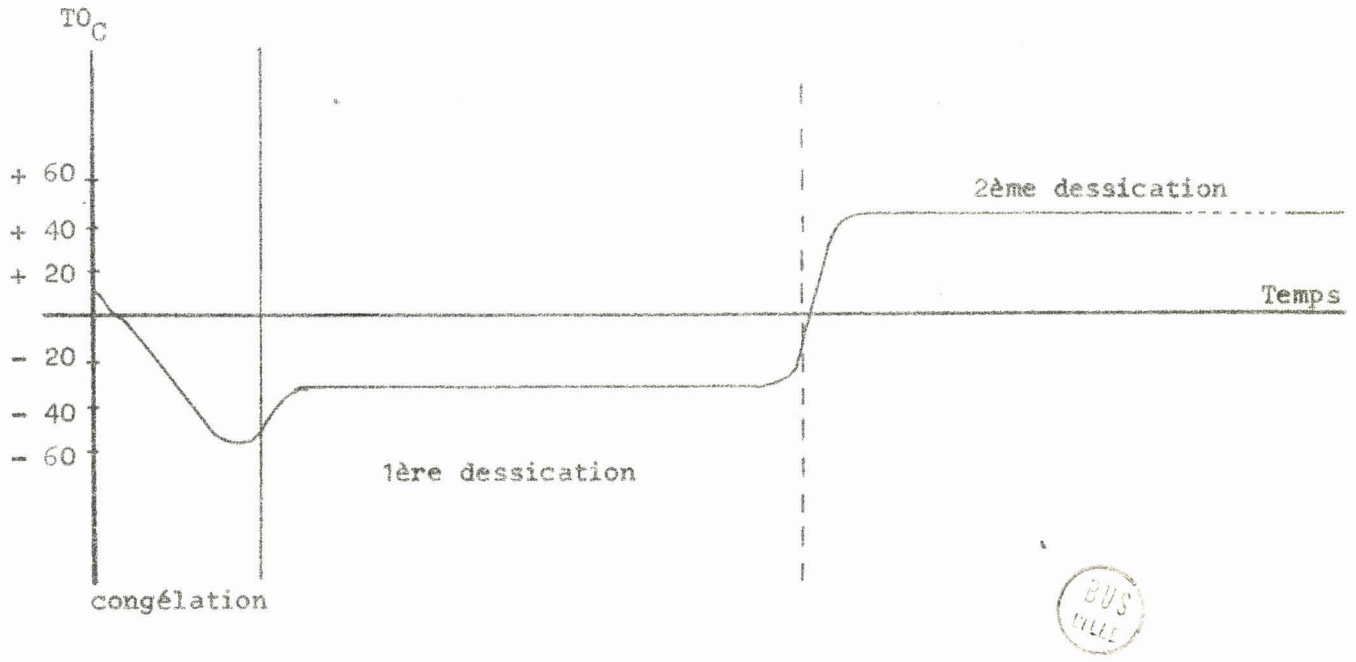
2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 11

d'envisager d'employer cette technique pour l'obtention de quantités suffisantes à l'étude ultérieure d'un antigène. Ceci nous a fait abandonner l'emploi de la couronne SW 39 L pour employer la couronne SW 25 permettant de fractionner 5 ml de solution antigénique par pot, soit 15 ml par centrifugation.

Sur les schémas n° 10 et 11, nous avons représenté les essais de fractionnement avec différents gradients de saccharose 10 - 25 p. 100, 10 - 20 p. 100, 5 - 20 p. 100. En fonction des résultats acquis, la technique suivante a donc été retenue : la solution antigénique (5 ml) est déposée sur un gradient de saccharose 10 - 20 p. 100 en tampon Tris $MgCl_2$ 10^{-2}M, pH 7,2 (25 ml) et centrifugée à 90.000 g pendant 16 h. On recueille le gradient par fractions de 0,5 ml. Sur le schéma n° 11, sont représentés le diagramme de fractionnement et la composition antigénique correspondante. On constate que la séparation est certes moins bonne que dans la centrifugation à 134.000 g ; en effet, un seul antigène est séparé directement, mais on obtient toujours certains groupements de trois ou quatre antigènes qui pourront être utilisés pour un fractionnement ultérieur. Ainsi dans la fraction 24, on isole les trois antigènes de type B avec un antigène de type A seulement ; dans la fraction 17, les antigènes de type A sont isolés.

On voit donc tout l'intérêt qu'il y a à utiliser la technique de gradient de saccharose comme technique préparative. Il est certain qu'une centrifugation en gradient zonal serait également



BUS VILLE

Courbe de température au cours d'une lyophilisation

Schéma n° 12

intéressante pour ce fractionnement préparatif et permettrait l'obtention de plus grandes quantités. C'est ce type de technique que nous utiliserons ultérieurement, lorsque nous aurons à notre disposition ce matériel.

3) Technique de fractionnement en deux temps

Après avoir analysé les différentes méthodes de fractionnement, il nous reste à étudier les groupements de méthodes qui nous permettrons d'obtenir des quantités suffisamment importantes d'antigènes purs.

Nous éliminons à priori les techniques par chromatographies successives, car les éluats de chaque chromatographie doivent être concentrés par lyophilisation, ce qui peut entrainer des altérations de structure des antigènes étudiés. Nous avons constaté qu'une lyophilisation pratiquée sur notre surnageant ne provoquait pas la disparition de structures antigéniques. Ceci est possible à conditions d'arrêter la lyophilisation avant la deuxième dessication : on sait en effet, comme le montre le schéma n° 12, que dans une lyophilisation la dessication se déroule en deux temps, d'abord à froid, puis ensuite à une température supérieure à 0°C. C'est souvent durant cette deuxième période que les structures protéiques sont altérées. Nous avons donc préféré arrêter la lyophilisation au niveau du point A, c'est-à-dire lorsque la température du produit est proche de 0°C. Nous n'obtenons certes pas une substance pulvérulente, mais un produit suffisamment

concentré pour notre usage. Il faudrait plutôt parler ici de concentration que de lyophilisation. Si une concentration de ce type n'altère pas les antigènes, par contre, deux concentrations consécutives entrainent la disparition de certaines structures antigéniques.

Eliminant la technique de chromatographie comme fractionnement préparatif, nous avons donc été amené à utiliser l'ultracentrifugation préparative ou la centrifugation en gradient de saccharose comme premier fractionnement. Nous exposerons donc les résultats obtenus avec :

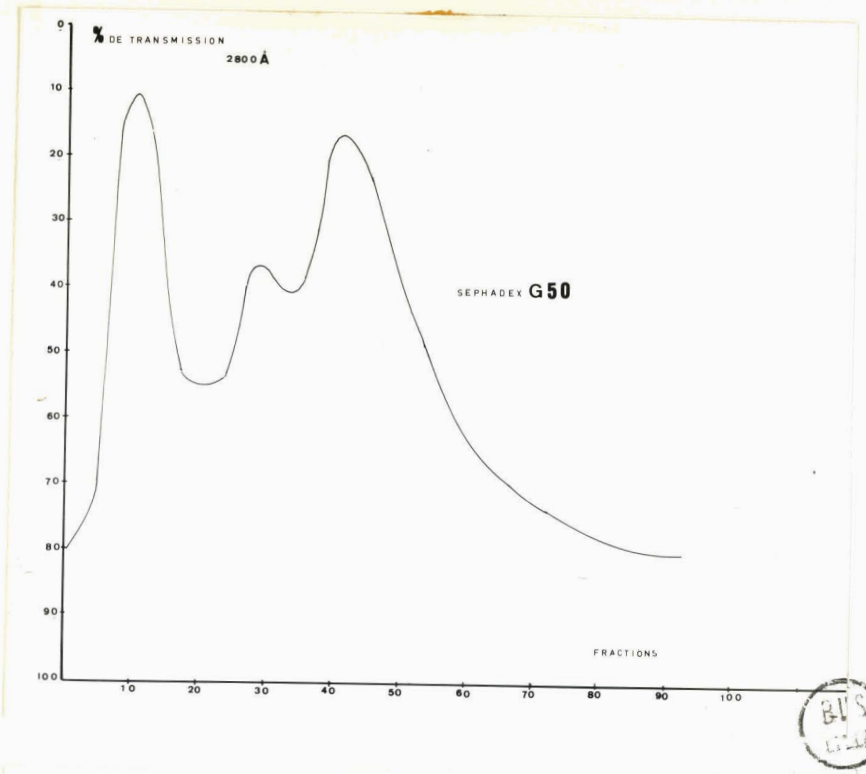
la centrifugation	(suivie de chromatographie :	
	(	sur DEAE cellulose
	(	ou sur Sephadex
le fractionnement en gradient de saccharose	(suivi de chromatographie :	
	(	sur DEAE cellulose
	(	ou sur Sephadex

a) Fractionnement dans lequel intervient la simple centrifugation

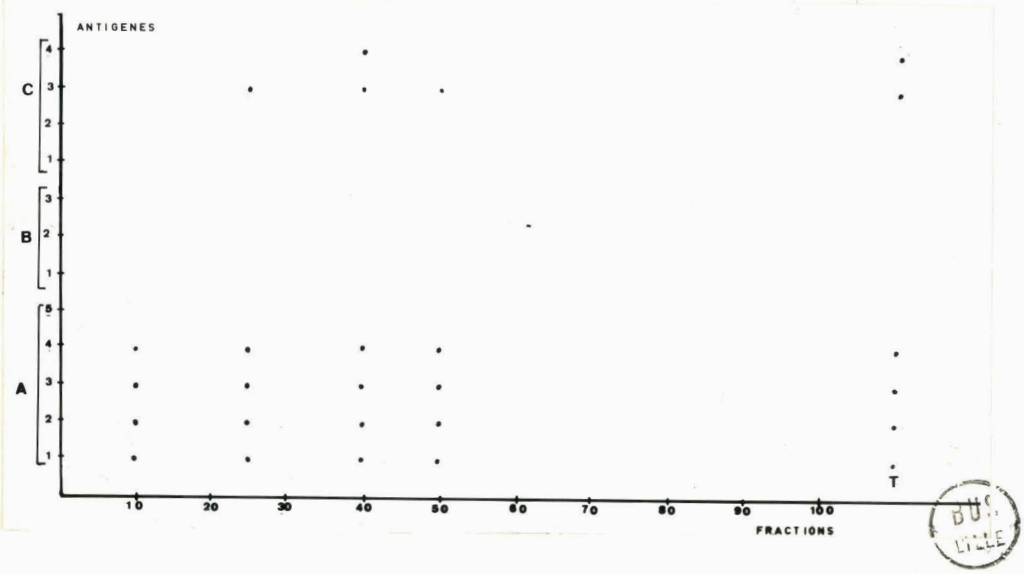
Nos premiers essais de fractionnement avaient montré qu'une centrifugation à 144.000 g pendant 16 h permetait de séparer les antigènes en quatre groupements. Il suffisait donc d'utiliser un de ces groupements pour le fractionner ensuite par une technique de chromatographie.

Le matériel à séparer est le surnageant S_2 résultant de la centrifugation à 12.000 g du mélange parois, antigènes solubles et particulaires. Ce matériel initial contient 16 fractions antigéniques, qui peuvent être séparées en quatre groupements. L'un d'entre eux, le groupement α_1 contient 5 fractions antigéniques ; c'est ce groupement

1



2



FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX G50 DE LA FRACTION α OBTENUE PAR CENTRIFUGATION A 144.000 g

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 13

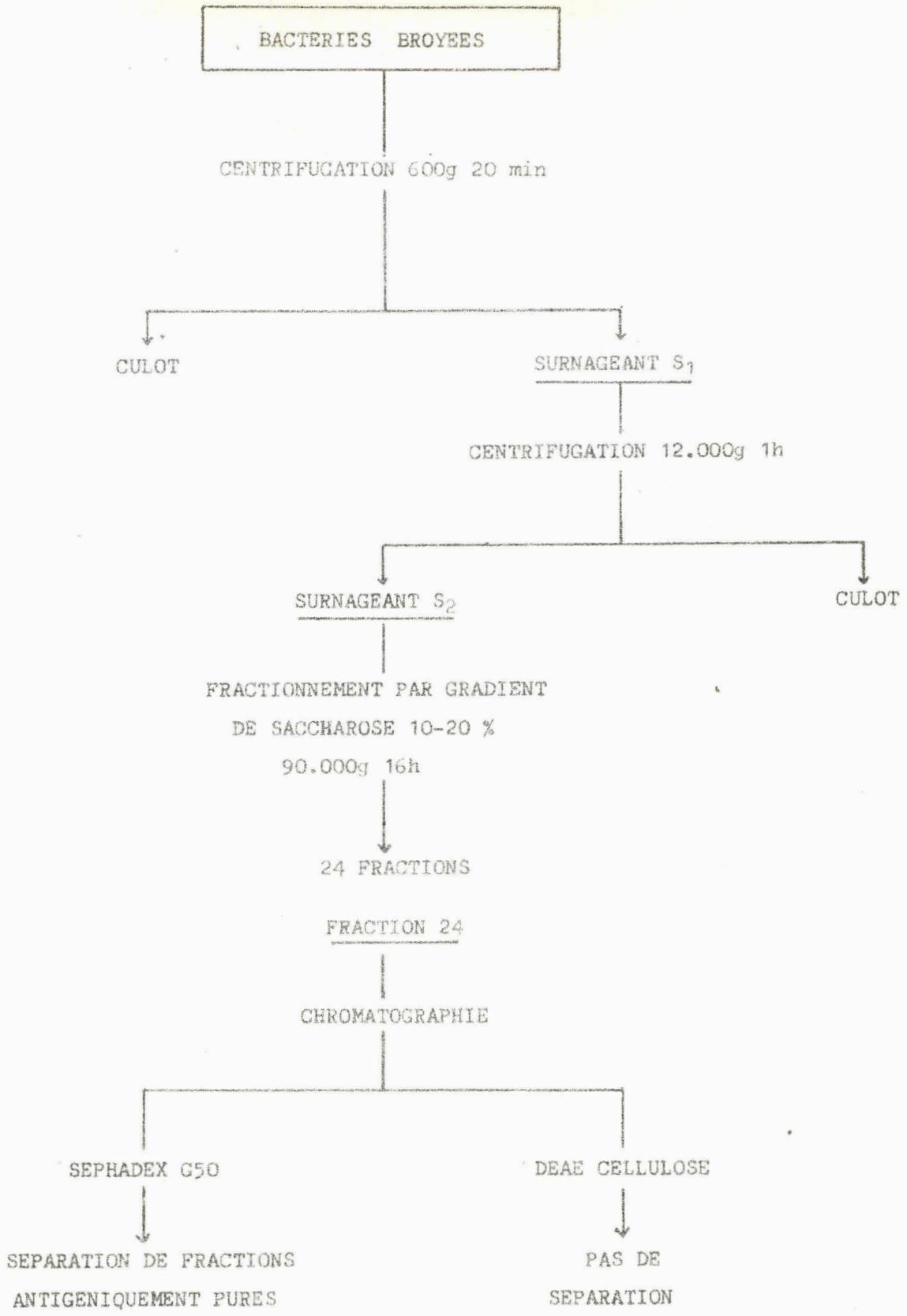
que nous avons essayé de fractionner par chromatographie sur DEAE cellulose et par gel filtration sur Sephadex.

Le schéma n° 13 montre le diagramme d'élution et la composition antigénique des fractions isolées par passage sur Sephadex G50. Ce diagramme indique que nous n'avons pu obtenir aucune séparation avec cette méthode, il en est de même après passage sur DEAE cellulose.

Nous avions choisi cependant parmi les groupements isolés par centrifugation celui qui possédait la plus faible richesse en antigènes, les autres groupements comprenant au minimum huit antigènes. Il nous a donc semblé indispensable d'effectuer un fractionnement préalable plus poussé, permettant d'obtenir au maximum, trois ou quatre fractions antigéniques. La technique la plus apte à résoudre ce problème nous a semblé être la technique de sédimentation en gradient de saccharose. Cette technique joint en effet la finesse de fractionnement à la régularité des résultats, ceci sans qu'aucune altération ne soit apportée au matériel séparé.

b) Fractionnement dans lequel intervient la centrifugation en gradient de saccharose

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose est une méthode très sensible et de réalisation relativement simple. Le gradient peut être effectué avec le tampon et le pH qui s'accordent le mieux avec le produit à fractionner, ce qui est un point important, connaissant la fragilité et la sensibilité aux variations de pH des produits biolo-



OBTENTION DE FRACTIONS ANTIGENIQUEMENT PURES

TABLEAU V

giques. De plus, le saccharose par lui-même n'apporte aucune réaction gênante.

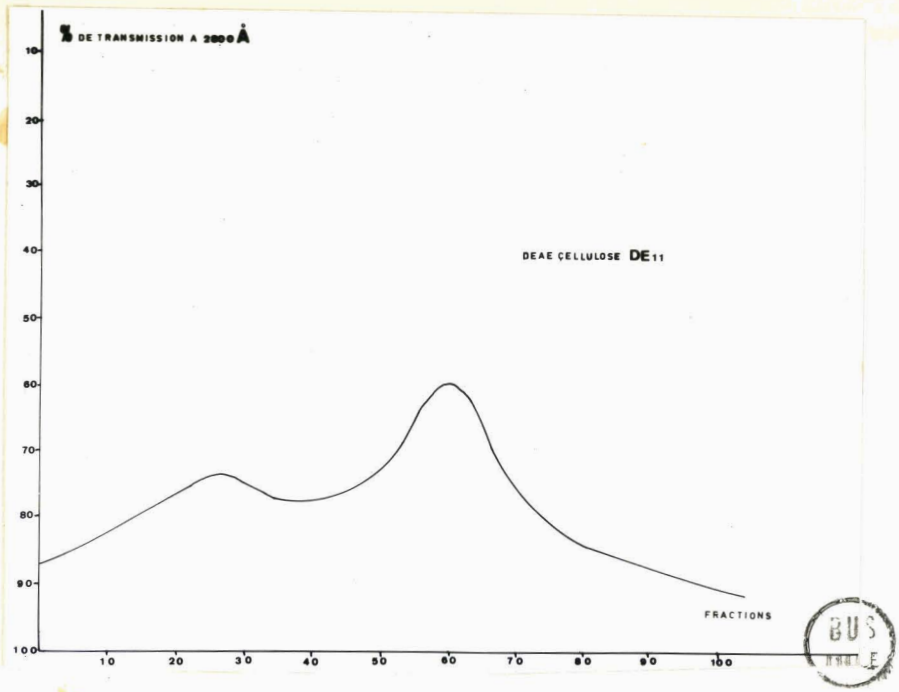
Cette technique combinée à une séparation chromatographique permet l'obtention et la séparation d'antigènes en quantités certes relativement restreintes, mais aussi l'obtention d'antigènes à l'état pur. Nous détaillerons les résultats d'une séparation à partir d'une fraction de gradient. Nous avons choisi de décrire la technique concernant l'isolement d'un antigène dont nous développerons l'étude ultérieurement. Cette technique peut s'appliquer à n'importe quelle fraction du gradient.

La totalité du fractionnement est résumée sur le tableau n° V ; il précise les différentes opérations nécessaires pour aboutir au fractionnement et à l'obtention d'une fraction antigéniquement pure.

Il est procédé tout d'abord à une centrifugation en gradient de saccharose à partir du surnageant 12.000 g, puis à un fractionnement d'une partie du gradient par chromatographie ou gel filtration. Le problème se pose alors du choix de la technique de chromatographie. Nous verrons pour quelles raisons notre choix s'est finalement porté sur la technique de gel filtration.

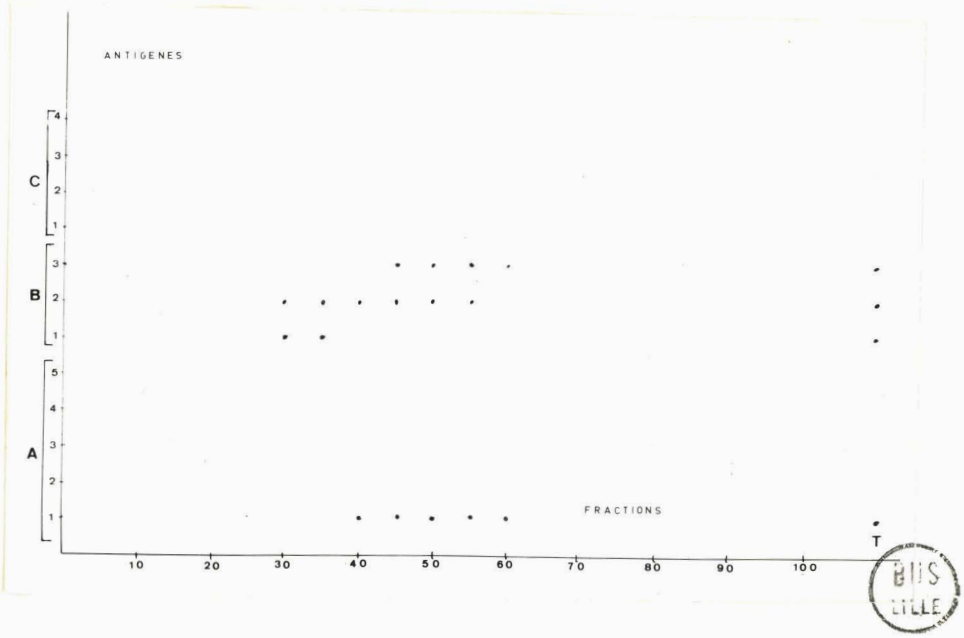
Le surnageant S_2 est fractionné par centrifugation en gradient de saccharose 10 - 20 p. 100 en tampon Tris $MgCl_2$ pH 7,4 à 90.000 g pendant 16 h avec une couronne SW 25 (Spinco). Les fractions sont recueillies par volume de 6,5 ml, ceci permet d'obtenir 24 fractions dont la composition antigénique est la suivante :

1



BUS LILLE

2



BUS LILLE

FRACTIONNEMENT SUR DEAE CELLULOSE DE-11 DE LA FRACTION 24
DU GRADIENT 10 - 20 p. 100

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 14

Fraction n° 11	1 fraction	1 C
12	5 fractions	2 A + 3 C
13	5 fractions	3 A + 2 C
14	4 fractions	2 A + 2 C
15	3 fractions	2 A + 1 C
16	6 fractions	3 A + 3 C
17	5 fractions	4 A + 1 C
18	6 fractions	4 A + 1 C
19	6 fractions	5 A + 1 C
20	5 fractions	5 A
21	6 fractions	5 A + 1 C
22	1 fraction	1 C
24	4 fractions	1 A + 3 B

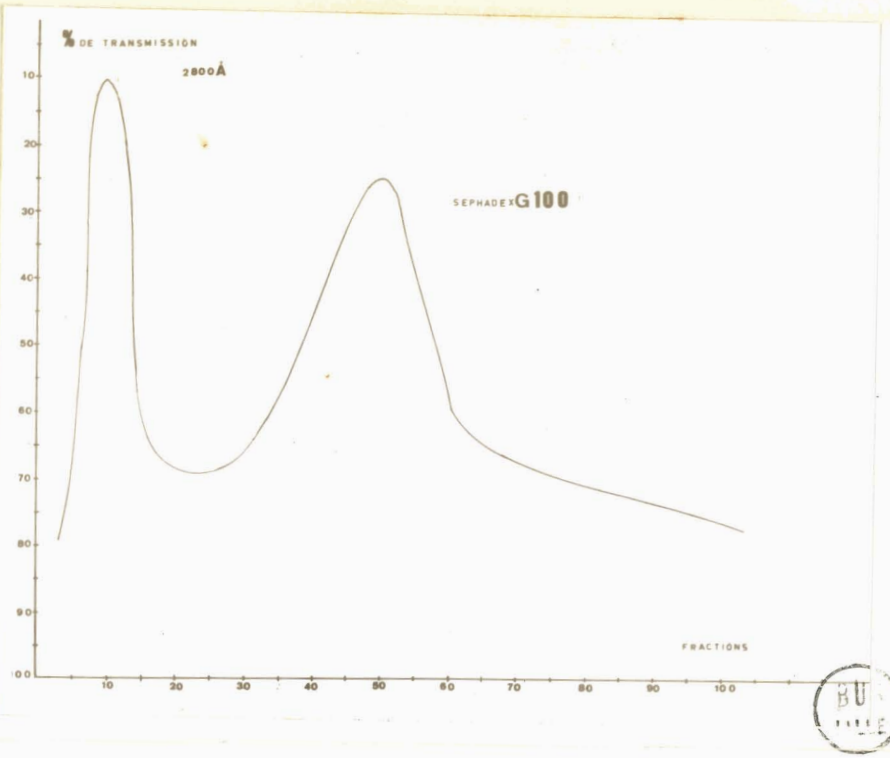
C'est donc à partir de cette fraction 24 que nous avons essayé de séparer des fractions antigéniquement pures.

α / Fractionnement sur DEAE cellulose de la fraction 24

La fraction, sédimentant au fond du gradient, contient quatre antigènes. Après fractionnement sur DEAE cellulose, comme le montre le schéma n° 14, nous n'avons pu isoler aucune fraction antigéniquement pure. De plus, l'utilisation de DEAE s'est avérée difficile, comme nous l'avons montré plus haut.

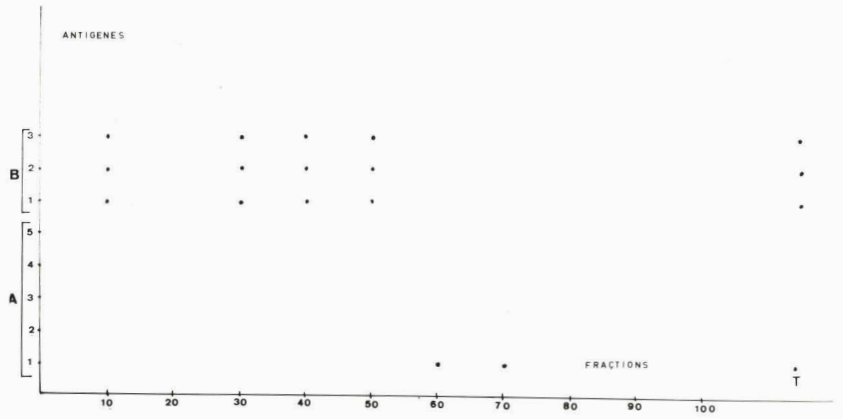
Nous avons donc utilisé la technique de fractionnement en gradient de saccharose comme technique préparative, suivie de filtration sur gel de Sephadex.

1



BU LILLE

2



BUS LILLE

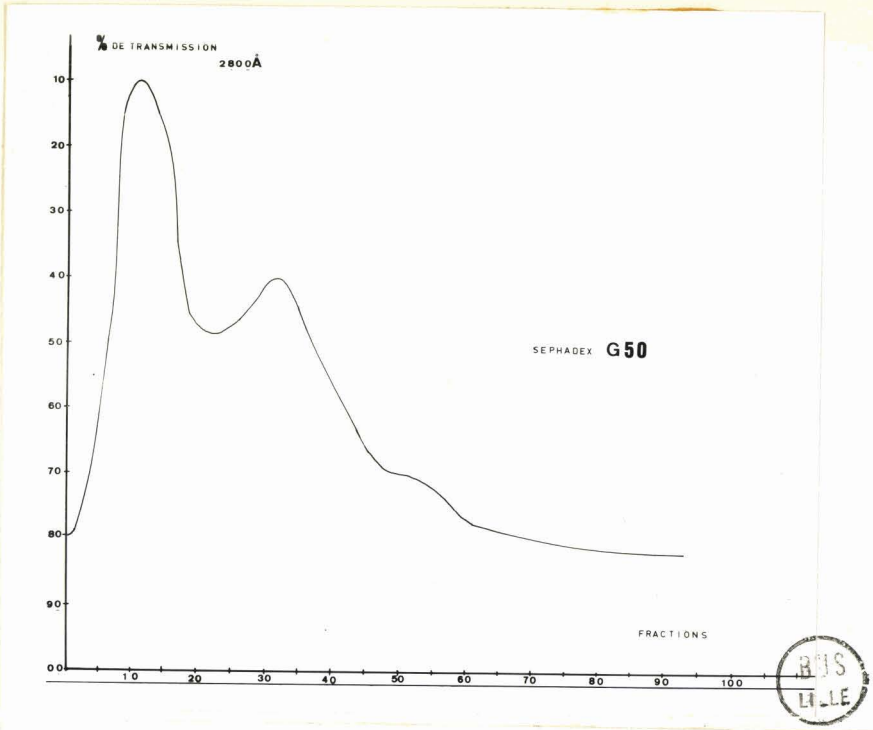
FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX G100 DE LA FRACTION 24 DU GRADIENT 10 - 20 p. 100

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

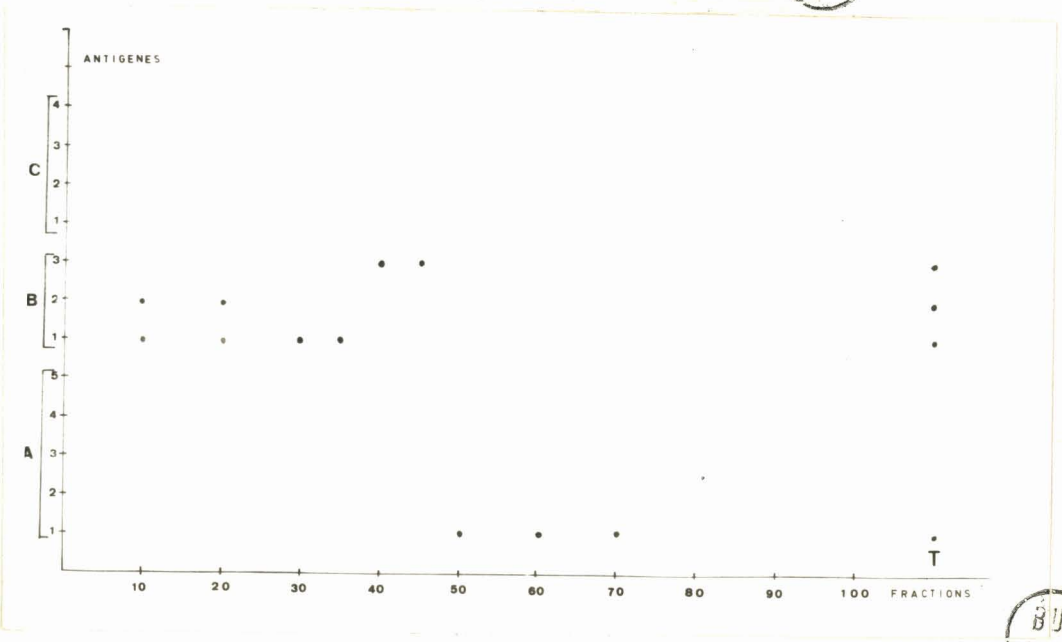
Schéma n° 15

1



BUS LILLE

2



BUS LILLE

FRACTIONNEMENT SUR GEL DE SEPHADEX G50 DE LA FRACTION 24 DU GRADIENT 10 - 20 p. 100

1 - Diagramme d'élution

2 - Structure antigénique des différentes fractions

Schéma n° 16

β /Fractionnement de la fraction 24 du gradient sur Sephadex

- Séparation sur Sephadex G100

La Sephadex G100, comme on le constate sur le schéma n° 15, permet de séparer l'arc A des trois arcs B, mais ne permet pas une séparation des trois arcs B. Cette technique ne peut donc être utilisée que pour l'obtention d'un antigène A pur.

- Séparation sur Sephadex G50

L'utilisation de la gel filtration sur Sephadex G50 permet la séparation, comme on peut le voir sur le schéma n° 16 :

d'un antigène A
d'un antigène B_1
d'un antigène B_3

Cette méthode permet d'obtenir, à partir d'un complexe de quatre antigènes, trois fractions antigéniquement pures dans les conditions expérimentales que nous employons. L'ensemble du fractionnement est résumé sur le tableau V.

c) Discussion

L'objet immédiat de notre travail était d'isoler à l'état pur des fractions antigéniques. La purification et l'isolement d'antigènes à partir d'un mélange complexe d'antigènes est toujours un problème difficile à résoudre en raison des faibles concentrations relatives des antigènes.

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose permet la concentration de certains types d'antigènes. Une autre difficulté provient également de l'instabilité de ces structures antigéniques vis-à-vis de nombreux agents physiques et chimiques.

Ceci nous a conduit à éliminer les procédés de fractionnement chimique, comme la t chnique au sulfate d'ammonium, par crainte d'une dénaturation des antigènes.

En ce qui concerne les résines échangeuses d'ions, notre choix s'était porté sur la DEAE cellulose car les conditions de pH nécessaires à l'utilisation de ce type d'échangeur s'adaptait le mieux à la chromatographie de molécules biologiques fragiles.

Nous avons essayé également d'utiliser la technique de gel filtration. Le choix des types de Sephadex s'est fait après une étude des capacités de séparation des différents Sephadex vis-à-vis du mélange complexe que nous avions à séparer.

En ce qui concerne les techniques chromatographiques, si nous avions eu affaire à un mélange simple, nous aurions pu espérer, comme le premier fractionnement donnait peu de résultats, séparer nos antigènes par un second fractionnement. En effet, par fractionnements successifs, on répartit une fraction du mélange initial dans tout le volume de l'échangeur, ce qui permet de séparer des fractions pures Avec notre mélange complexe, il aurait fallu procéder à de trop nombreuses chromatographies, ce qui posait alors le problème de la concentration après chaque élution.

C'est pourquoi nous avons choisi deux techniques différentes :

- l'ultracentrifugation différentielle en gradient de saccharose,
- la chromatographie.

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose est une méthode d'exécution simple, la confection du gradient ne posant aucun problème. Le saccharose, à condition qu'il soit traité 20 minutes à 105°C, ne donne aucune réaction génante vis-à-vis des constituants qu'il est destiné à séparer. Ce traitement à 105°C permet à la fois d'obtenir un matériel stérile et de détruire certaines enzymes qui se trouvent dans le saccharose et qui pourraient agir sur les structures protéiques. D'une part avec l'ultracentrifugation différentielle en gradient de saccharose, on peut utiliser les tampons et les pH qui conviennent le mieux au produit à séparer.

L'autre avantage de cette technique est la constance des résultats. Tandis que les techniques chromatographiques avec échangeurs d'ions donnent des résultats irréguliers, l'ultracentrifugation différentielle en gradient de densité permet au contraire d'obtenir des résultats constants, évitant ainsi des contrôles immunologiques toujours fastidieux. Ces contrôles ont été effectués seulement sur des lots importants de produits isolés.

Cette technique a le désavantage de rendements relativement faibles, mais ceci est largement compensé par la constance des résultats apportés par cette technique.

Pour la deuxième étape du fractionnement, la chromatographie

pouvait être faite soit sur des résines échangeuses d'ions, soit en gel filtration.

Si la première technique permet souvent une séparation plus efficace que le gel filtration, cette dernière nous a donné une plus grande régularité de rendement. La mise en oeuvre de la technique en gel filtration est en outre de réalisation plus aisée que la chromatographie sur échangeurs d'ions.

Nous avons pu ainsi isoler une fraction antigéniquement pure en quantité suffisante pour préparer des immun-sérums dirigés contre cet antigène et en étudier la structure chimique. L'isolement d'une quantité suffisante de matériel antigénique s'est poursuivi sur un temps assez long (deux ans) pour que nous puissions apprécier la fidélité de cette technique.

En effet, les contrôles immunologiques ont été faits sur des lots comportant des mélanges de fractions obtenus à partir de divers broyats et de divers fractionnements : nous avons toujours constaté la même structure antigénique.

L'étude de la composition en acides aminés de l'antigène, réalisée sur divers lots d'antigènes, s'est révélée identique. Il est donc possible d'affirmer qu'aussi bien d'un point de vue immunologique que chimique, cette technique de séparation s'est révélée valable.

CHAPITRE IV

ESSAIS D'OBTENTION DE LYSAT BACTERIEN PAR DES PROCEDES BIOLOGIQUES

Afin de préciser l'emplacement des différentes structures antigéniques dans la cellule bactérienne, il est nécessaire de connaître les compositions antigéniques de différentes fractions obtenues, non à partir de bactéries intactes, mais à partir de bactéries dégradées par l'action d'enzymes bactériophagiques, ou de sphéroplastes bactériens. La comparaison de la structure antigénique des fractions ainsi obtenues et de la composition d'un surnageant S_2, doit en principe permettre de constater une modification de ces structures, par disparition d'antigènes de parois ou reliés à la paroi.

Dans le cas de sphéroplastes, en effet les enveloppes de ces formes bactériennes sont réduites en principe à la membrane cytoplasmique.

L'action sur des bactéries des bactériophages ou de leurs enzymes, permet de rechercher la libération de fractions identiques à celles obtenues par broyage mécanique ; elle permet également d'observer une disparition éventuelle de certaines fractions ou l'apparition de fractions antigéniques nouvelles.

On voit donc quel était l'intérêt d'étudier sur Mycobacterium phlei l'action de ces deux procédés biologiques qui, à priori, dégradent de manière spécifique la paroi bactérienne.

I - OBTENTION DE SPHEROPLASTES ET ETUDE DE LA COMPOSITION ANTIGENIQUE DU LYSAT DE SPHEROPLASTES DE MYCOBACTERIUM PHLEI

La formation d'organismes sphériques à partir des bactéries est un phénomène connu depuis les travaux de FISCHER et KLIENENBERGER NOBEL, consacrées à ces formes nommées formes L, protoplastes, sphéroplastes. Tous ces éléments sont caractérisés par une lésion de la paroi qui rend les bactéries plastiques et sensibles aux modifications des pressions osmotiques.

On distingue théoriquement, les protoplastes des sphéroplastes par le fait que les premiers sont totalement dépourvus de paroi et ne sont pas susceptibles de réversion vers la forme bactérienne alors que, chez les seconds, il persisterait des fragments de paroi, permettant le retour vers la forme bactérienne. Les formes sphériques que nous avons obtenues, ont été qualifiées de sphéroplastes, car il est difficile d'affirmer l'absence de résidus de paroi, bien que les observations que nous avons faites en microscopie électronique n'aient pas permis de révêler la présence de structures rappelant la paroi. Il était donc intéressant d'étudier la composition antigénique du lysat de ces sphéroplastes.

La plupart des espèces bactériennes peuvent être transformées en sphéroplastes sous l'action d'agents les plus divers. Cependant, peu de travaux ont été consacrés à l'obtention de sphéroplastes de mycobactéries ; la lenteur de culture de ces microorganismes et les difficultés techniques, dues à la formation d'agrégats bactériens, expliquent le petit nombre de

recherches sur ce sujet. Si des auteurs comme MATTMAN et coll. (59) décrivent l'obtention de forme L sur de simples milieux sans addition de produits inducteurs, d'autres comme THACORE (121) et SATO (89) obtiennent des sphéroplastes au moyen de substances transformantes.

C'est en nous inspirant de ces dernières recherches que nous avons pu mettre au point une technique d'obtention des sphéroplastes.

1) Modalités d'obtention de sphéroplastes de Mycobacterium phlei

Différents essais préliminaires, portant sur l'influence des milieux de culture (milieux liquides de Sauton et de Dubos) et sur le rôle de l'agitation, nous ont permis de choisir les modalités expérimentales suivantes;

- les cultures sont réalisées sur milieu liquide de Sauton réparti en fioles de 750 ml, susceptibles d'être directement centrifugées.
- l'ensemencement de ces fioles est effectué à partir d'une culture sur milieu solide de Coletsos en boites de Roux.
- le culot de centrifugation des milieux liquides est alors porté sur le milieu inducteur.

Nous avons essayé différents types de milieux, supports de l'induction, de façon à obtenir le rendement maximum en sphéroplastes.

a) Trois milieux inducteurs ont été testés

α / Le milieu liquide de Dubos

phosphate monopotassique	:	1	g
phosphate disodique	:	3,1	g
asparagine	:	2	g
citrate de fer ammoniacal	:	0,05	g
sulfate de magnésie	:	0,01	g
bactopeptone	:	5	g
H_2O q.s.p.	:	1000	ml

A ce milieu, est ajoutée stérilement une solution de fraction V d'albumine bovine à la concentration finale de 10 g pour 1000 ml de milieu.

β / Milieu SP_2

Ce milieu, de pH 7,2, est habituellement employé pour obtenir des sphéroplastes d'E. coli :

Bacto tryptone	:	12	g
extrait de levure Difco	:	4	g
PO_4H_2 K	:	2	g
PO_4H K_2	:	18	g
peptone	:	10	g
H_2O q.s.p.	:	1000	ml

γ / Milieu de Dubos modifié

Milieu de Dubos sans fraction V, auquel on ajoute :

Casaminoacides Difco	: 90 mg/100
$CaCl_2$	: 1 mg/100
Nicotinamide	: 2 mg/100
Glutathion	: 90 mg/100
$MgCl_2$	: 4 mg/100

Des études comparatives nous ont montré que ce dernier milieu était le plus favorable à l'induction des sphéroplastes.

Nous avons procédé à l'étude des substances transformantes capables d'induire la formation de sphéroplastes.

b) Substances transformantes

Trois types de substances classiquement utilisées pour l'induction de sphéroplastes ont été employés : le glycocolle, le chlorure de lithium, le lysozyme. La présence de ces trois produits est indispensable à la transformation des mycobactéries : une seule d'entre elles ne donne aucun résultat et l'association de deux de ces substances ne conduit qu'à un faible taux de sphéroplastes.

Nos constatations sont identiques à celles de SATO et coll. (89). Par contre, nous n'avons jamais pu obtenir de résultats positifs par l'action de la cyclosérine, qui a été préconisée par MATTMAN (59).

Inducteurs				Sphéroplastes rendement en %
LiCl	de 0,01	à	0,1 p. 100	0
Glycocolle	de 0,1	à	3 p. 100	0
Lysozyme	de 0,005	à	0,01 p. 100	0
Glycocolle LiCl			3 p. 100 0,1 p. 100	1
Glycocolle Lysozyme			3 p. 100 0,01 p. 100	50
Glycocolle LiCl + Lysozyme			3 p. 100 0,1 p. 100 (0,005 p. 100 (0,01 p. 100 (0,02 p. 100	 10 80 5
Glycocolle Lysozyme + LiCl			3 p. 100 0,01 p. 100 (0,01 p. 100 (0,05 p. 100 (0,1 p. 100	 0 10 75
LiCl 0,1 Lysozyme 0,01 + Glycocolle			(1 p. 100 (2 p. 100 (3 p. 100 (4 p. 100 (5 p. 100 (10 p. 100	10 50 80 10 0 0

TABLEAU VI

Formation de sphéroplastes de Mycobacterium phlei sur milieu liquide de Dubos modifié, contenant différents inducteurs utilisés seuls ou en association.

c) Milieu d'induction choisi pour ces études

Ces essais ont permis de choisir la technique suivante. Après quatre jours de culture agitée à 30°C, les fioles de préculture sont centrifugées 20 minutes à 600 g. Le culot de centrifugation est inoculé dans le milieu d'induction, milieu liquide de Dubos modifié, auquel sont ajoutées les substances transformantes :

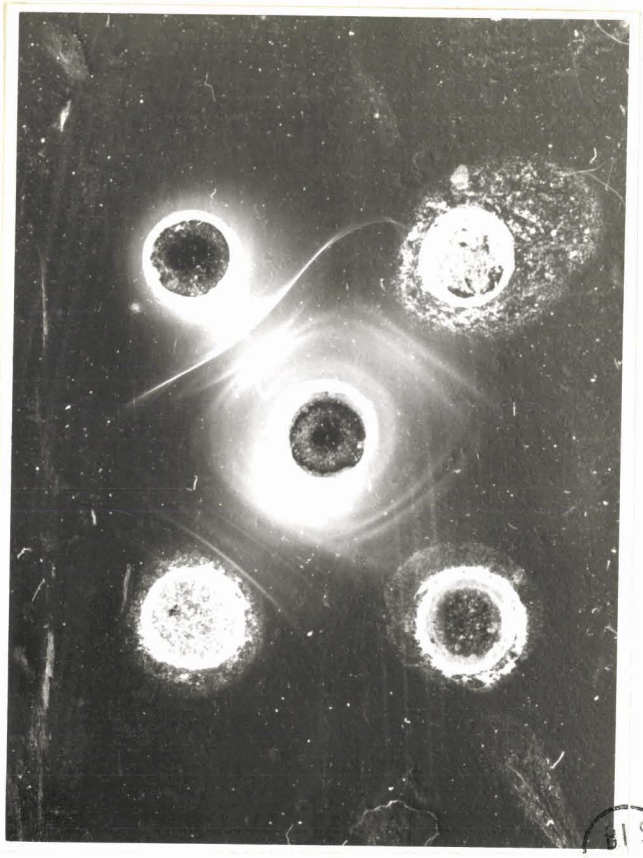
LiCl	:	0,1 p. 100
Lysozyme	:	0,01 p. 100
Glycocolle	:	3 p. 100

et du saccharose à la concentration finale 0,5 M.

La transformation est faite dans des fioles d'une contenance de 500 ml, contenant 250 ml de milieu ; l'incubation à 30°C est prolongée pendant cinq jours. Les sphéroplastes sont séparés des bactéries par décantation en tubes pendant 30 minutes ; ils se trouvent dans le surnageant qui est recueilli par aspiration puis centrifugé à 400 g, pour récupérer le matériel cellulaire.

2) Résultats

Les premiers sphéroplastes se forment dans les milieux de culture 48 heures après le début de l'induction. A ce moment leur diamètre est inférieur à 2 µ ; vers le troisième jour apparaissent des formes de dimensions intermédiaires, d'environ 3 µ. Puis vers le cinquième jour, au moment de la transformation maximum, on observe l'apparition de formes plus volumineuses, d'un diamètre d'environ 5 µ.



BIS LILLE

Sphéroplastes de Mycobacterium phlei

aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°6

Sphéroplaste de Mycobacterium phlei

Il s'agit ici d'une forme de 3 µ environ où les structures internes ne sont pas trop altérées.

On note la disparition quasi complète de la paroi

BUS LILLE

Sphéroplaste de Mycobacterium phlei
aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°6 bis

Sphéroplaste de Mycobacterium phlei

Il s'agit ici d'une forme de 5 µ de diamètre. On note la disparition de la paroi et des structures cytoplasmiques considérablement altérées.

0.2 µ

Nous avons constaté que les formes de petites dimensions sont toujours groupées en amas, mélangées à des bactéries encore intactes, tandis que les formes d'un diamètre de 5 µ sont toujours isolées. L'étude de leur structure en microscopie électronique (photographie n° 6 représentant une forme d'un diamètre de 3 µ), montre que la couche amorphe enveloppant la paroi a disparu et que seule persiste la membrane cytoplasmique entourée d'un reste de paroi. Le noyau conserve son aspect fibrillaire en amas, sans altération apparente ; par contre, le cytoplasme prend une allure granulaire et vacuolaire.

Les formes géantes ont des structures internes beaucoup plus altérées ; le matériel nucléaire diffuse dans toute la cellule et la structure granulaire du cytoplasme est très accentuée(photographie n° 6 bis). Nous n'avons observé aucune structure rappelant les mésosomes dans ces sphéroplastes, alors que ces formations sont constamment présentes dans les cellules bactériennes de Mycobacterium phlei.

3) Structure antigénique des sphéroplastes

Le culot de sphéroplastes ainsi recueilli par centrifugation est lavé dans du tampon Tris $MgCl_2$ saccharosé. Les sphéroplastes sont lysés ensuite par une solution de Brij 58 à une concentration finale de 1 p. 100, ceci à la température de 0°C pendant une heure. Le lysat est ensuite lavé trois fois avec du tampon Tris $MgCl_2$ pH 7,2 ; ce culot de centrifugation est utilisé en réaction d'Ouchterlony. La

Structure antigénique d'un lysat de sphéroplaste de

Mycobacterium phlei en réaction d'Ouchterlony

godet central : Immun-sérum anti S 12.000 g

godets supérieurs
- gauche : S 12.000 g
- droit : lysat de sphéroplaste

godets inférieurs
- gauche : lysat de sphéroplaste
- droit : lysat dilué au 1/100

On note la présence dans le lysat d'un antigène B (Ag R) arc très fin situé près du godet.

PHOTOGRAPHIE N°7

structure antigénique du lysat de sphéroplastes est montrée sur la photographie n° 7. La réaction antigène/anticorps est faite entre un immun-sérum anti S_2 (surnageant S_2 débarrassé de paroi) et le lysat de sphéroplastes.

On constate uniquement la présence des fractions antigéniques de type B et la présence d'une fraction antigénique de type A. Dans ces fractions se situent donc obligatoirement des antigènes de la membrane cytoplasmique.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des lysats bactériophagiques.

II - ETUDE DU LYSAT BACTERIOPHAGIQUE DE MYCOBACTERIUM PHLEI

L'action des bactériophages sur les bactéries se traduit par la destruction partielle de la paroi bactérienne. Classiquement, l'action des enzymes bactériophagiques est comparable à celle du lysozyme ; il s'agit d'une action spécifique et limitée à certaines structures déterminées de la paroi. Le résultat de l'action de ces bactériophages sur les mycobactéries est la disparition de toute structure organisée dans la bactérie. Pour obtenir le lysat bactériophagique de Mycobacterium phlei, nous nous sommes adressés au phage B_2 spécifique de ce germe.

1) Préparation du lysat bactérien

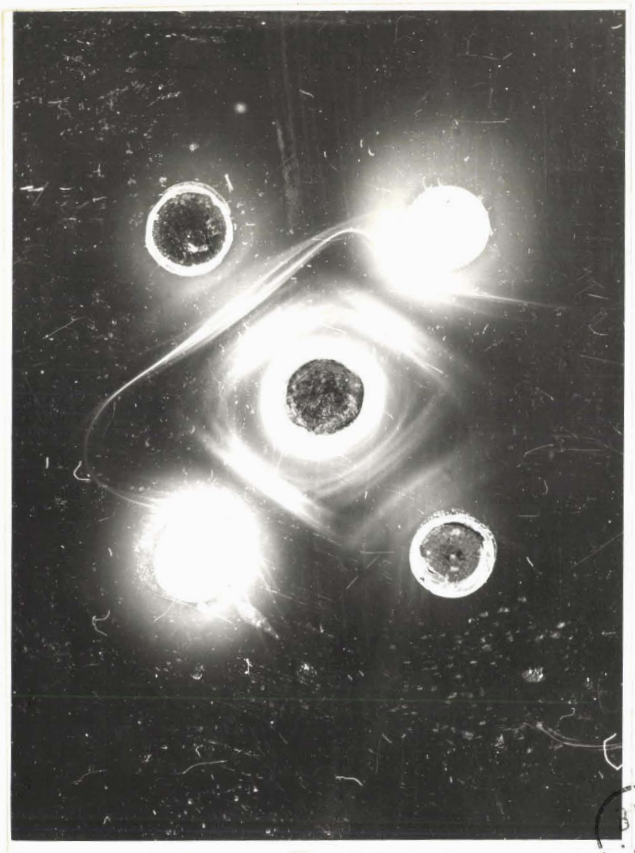
Le milieu utilisé pour l'obtention des bactériophages aussi bien que du lysat bactérien est le suivant :

Heart infusion broth (Difco)	:	25 g
Bacto peptone (Difco)	:	10 g
Cl_2Ca	:	0,11g
glycérine	:	40 ml
H_2O distillée q.s.p.	:	1000 ml

ajuster à pH 7

Ce milieu a été employé sous forme liquide ou gélosée (à 15 g d'agar) ou semi-solide (à 8,1 g d'agar). Pour obtenir le stock de bactériophages, on mélange 0,5 ml d'une suspension de ces derniers à la concentration de 10^5 unités par ml, à 0,5 ml d'une suspension de 10^7 germes par ml. Le mélange est ajouté à 4 ml de milieu semi-solide, maintenu à 40°C et coulé sur une boite de Petri contenant le même milieu solide. Après 48 h d'incubation à 37°C, on ajoute 5 ml de milieu liquide et on recueille sur une tarlatane l'ensemble milieu liquide, milieu semi-solide. Après filtration, on centrifuge 30 minutes à 1.500 g puis on termine par une filtration sur membrane Millipore de 0,25 µ.

On obtient ainsi la suspension de bactériophages qui est titrée et dont on contrôle la stérilité.



Structure antigénique d'un lysat bactériophagique de Mycobacterium phlei

godet central : Immun-sérum anti S 12.000 g

godets supérieurs
- gauche : S 12.000 g
- droit : lysat bactériophagique

godets inférieurs
- gauche : lysat bactériophagique
- droit : lysat dilué au 1/100

On note la présence dans le lysat d'un antigène B (Ag R) arc très fin situé près du godet.

PHOTOGRAPHIE N°8

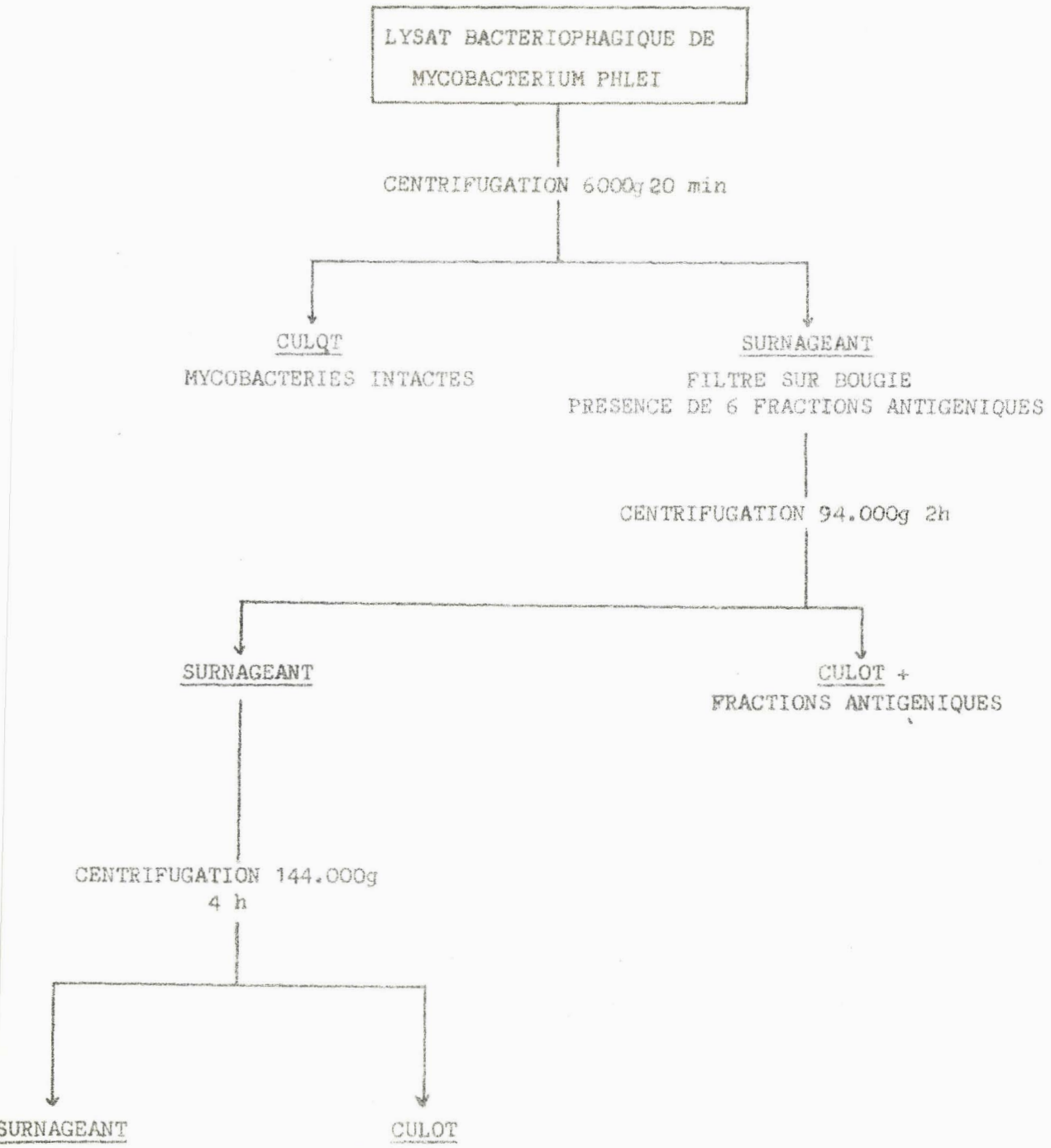
2) Obtention du lysat bactériophagique

On procède tout d'abord à une culture à 37°C de Mycobacterium phlei pendant 40 h. A ces bactéries en phase de croissance, on ajoute ensuite des particules bactériophagiques à la concentration finale de 10^5 particules par ml. Après un contact de 17 h, on sépare les bactéries intactes par une centrifugation à 6.000 g pendant 20 minutes.

3) Etude de la structure antigénique du lysat

Après filtration du lysat puis concentration par lyophilisation, nous avons étudié sa structure antigénique par rapport à un immun-sérum anti-surnageant 12.000 g. La photographie n° 8 montre que dans le lysat bactériophagique on peut mettre en évidence 6 fractions antigéniques, 4 arcs de type A et 2 arcs de type B. Il convenait de rechercher s'il n'existait pas d'interaction immunologique entre les bactériophages et les composants antigéniques du lysat. Nous avons alors procédé à la séparation des particules bactériophagiques et des antigènes bactériens.

La concentration en particules phagiques du lysat fut d'abord titrée par la technique des plages. Le lysat fut ensuite centrifugé à 94.000 g pendant 2 h. Dans le culot se trouvaient les fractions antigéniques et dans le surnageant les bactériophages. L'absence de particules bactériophagiques dans le culot 94.000 g a été contrôlée au microscope électronique ; l'absence de plages de lyse provoquée par ce culot, a



SEPARATION DANS UN LYSAT BACTERIOPHAGIQUE DES PHAGES

ET DES ANTIGENES BACTERIENS

TABLEAU VIII

également été vérifiée.

Le surnageant 94.000 g a été centrifugé ensuite à 114.000 g pendant 4 h, et dans le culot de cette centrifugation la présence de particules bactériophagiques a été contrôlée en microscopie électronique, et par numération des particules on retrouve la même concentration en particules que dans le filtrat initial.

L'analyse immunologique du culot contenant les bactériophages a montré l'absence de réactions croisées entre les particules bactériophagiques et l'immun-sérum anti-surnageant 12.000 g.

L'ensemble de la séparation des antigènes résultant de la lyse bactériophagique et des bactériophages eux-mêmes, a été résumée sur le tableau VIII. Ceci nous a donc permis de montrer que les antigènes trouvés dans le lysat bactériophagique résultait bien de l'action des enzymes viraux et qu'il n'y avait aucune relation immunologique entre les virus et l'immun-sérum S_2.

III - CONCLUSION

La comparaison des spectres antigéniques des lysats de sphéroplastes et du lysat bactériophagique est intéressante à étudier. On constate dans les deux lysats la persistance des fractions antigéniques de type B. Ces fractions "B" ne sont donc pas en relation avec la paroi, puisqu'on les retrouve intactes à la fois dans les sphéroplastes et le lysat bactériophagique. Ces fractions antigéniques

doivent donc être rattachées, soit au contenu cytoplasmique, soit plutôt à la membrane cytoplasmique. Nous verrons ultérieurement qu'il a été possible de démontrer que ce type d'antigènes était bien relié à la membrane cytoplasmique (ou au mésosome). Les fractions antigéniques de type C, qui ne sont retrouvées ni dans les sphéroplastes, ni dans les lysats phagiques, doivent être rattachées à la paroi.

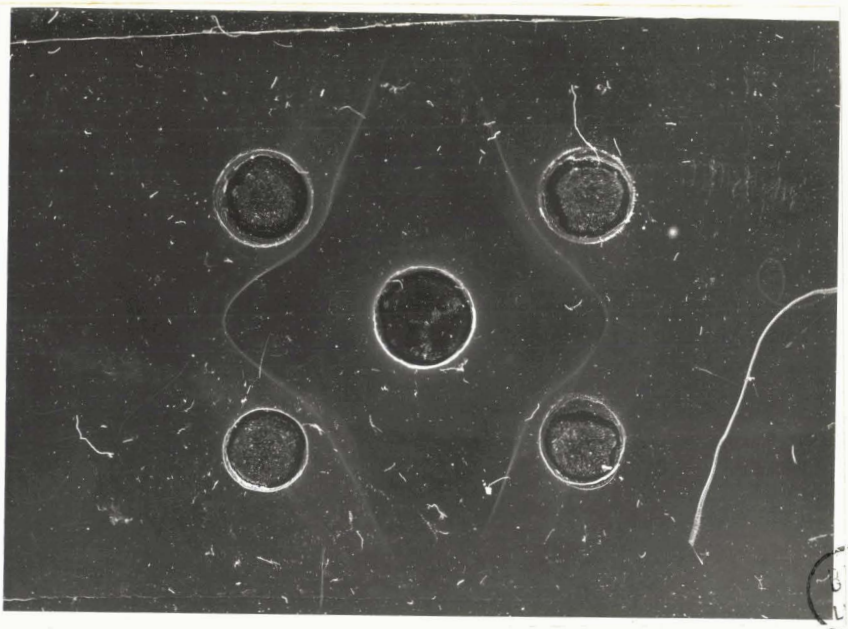
CHAPITRE V

ETUDE D'UN ANTIGENE ISOLE

Nous avions remarqué au cours des études préliminaires que nous avions faites sur la structure antigénique des différentes mycobactéries, qu'il y avait des communautés antigéniques, notamment parmi les antigènes de type B. C'est pourquoi nous nous sommes attaché à l'étude d'un antigène de ce type, pensant ainsi pouvoir appliquer les conclusions tirées de l'étude d'un antigène à l'ensemble des mycobactéries.

L'antigène que nous avons choisi d'étudier est l'antigène B_3 dénommé R pour la commodité de l'exposé. Cet antigène est obtenu à partir du surnageant S_2 fractionné par gradient de centrifugation en saccharose, puis par gel filtration sur Sephadex, comme il a été décrit au chapitre précédent. Cette technique nous permet d'obtenir une fraction immunologiquement pure comme le font apparaître les photographies n° 9 et 10.

La première d'entre elles montre une réaction d'immunoprécipitation entre l'immun-sérum anti S_2 et l'antigène R, la deuxième une réaction entre l'immun-sérum préparé avec l'antigène R et le même antigène. Ces deux réactions indiquent la présence d'un seul arc de précipitation ; ces réactions ont été faites avec différentes concentrations d'antigènes



Réaction d'Ouchterlony

godet central : Immun-sérum anti S 12.000 g

godets périphériques : Ag R

PHOTOGRAPHIE N°9

Electrophorèse en gel de polyacrylamide agarose
(technique d'Uriel) de l'antigène R

PHOTOGRAPHIE N°11

et d'anticorps. De même, une réaction entre l'immun-sérum spécifique de l'antigène R et le surnageant S_2 ne fait apparaître en réaction d'Ouchterlony qu'un arc de précipitation. Nous ne pouvons pas prouver par ces réactions de précipitation en gélose, qu'il s'agit d'une fraction chimiquement pure, mais simplement que nous avons affaire à un antigène isolé, donc à une fraction immunologiquement pure. Il faut noter que nous trouvons également par une autre technique, une fraction isolée. En effet, nous avons pu contrôler par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose, que cet antigène R ne présentait qu'une bande après migration de 180 min sous une tension de 11 volts/cm (photographie n° 11).

Il y a donc bien concordance entre les résultats immunologiques et les résultats de migration en gel de polyacrilamide.

Il est à noter que cette concordance entre les résultats immunologiques et les résultats de migration en gel de polyacrylamide se retrouve également pour la fraction 24 obtenue par gradient de centrifugation, cette fraction étant le point de départ du fractionnement de l'antigène R. Cet antigène ayant été isolé en quantité suffisante, nous avons pu procéder alors à son étude.

La première recherche qui s'imposait était de savoir s'il s'agissait d'un antigène spécifique du genre Mycobacterium ou de l'espèce Mycobacterium phlei, ou même d'un antigène commun à d'autres genres bactériens. Ce point déterminé, il était intéressant de connaître l'emplacement dans la cellule de cet antigène. Les résultats obtenus par l'étude préalable de la structure antigénique permettaient

déjà de se faire une idée des relations de cet antigène avec la cellule. L'étude du lysat phagique, résultant de l'action de bactériophages sur des bactéries intactes, avait permis de montrer que l'antigène R persistait dans le lysat phagique, ce qui impliquait que cet antigène n'avait guère de chance d'être une partie intégrante de la paroi. Ce point était confirmé par l'étude des sphéroplastes dont l'examen en microscopie électronique indique la disparition quasi complète de la paroi. Les lysats de sphéroplastes montrent également la persistance de l'antigène R. Il semble donc que cet antigène doive être plus en relation avec la membrane cytoplasmique, le mésosome, ou le cytoplasme qu'avec la paroi. L'étude de la composition chimique de cet antigène devrait également permettre de confirmer ou non la présence de composants spécifiques de la paroi comme l'acide muramique ou ses précurseurs. Le dernier point que nous nous proposons d'étudier est le rôle immunologique de cet antigène. Si on introduit cet antigène dans un organisme, quel phénomène immunologique va-t-il développer, quel sera son pouvoir protecteur éventuel.

I - ETUDE DE LA COMMUNAUTE ANTIGENIQUE AVEC D'AUTRES BACTERIES

Après avoir isolé un complexe macromoléculaire antigéniquement pur, il était intéressant de savoir s'il était possible de retrouver cette fraction chez d'autres mycobactéries ou d'autres genres bactériens. Six espèces de mycobactéries ont été testées en vue d'y retrouver cet

antigène :

- Mycobacterium bovis (var. B.C.G.)
- Mycobacterium kansasii
- Mycobacterium avium
- Mycobacterium minetti
- Mycobacterium smegmatis
- Mycobacterium scrofulaceum

Ces souches ont été cultivées de façon identique à celle employée pour Mycobacterium phlei, culture agitée sur milieu de Sauton. Les bactéries recueillies ont été traitées de telle sorte que l'on puisse obtenir comme pour Mycobacterium phlei des antigènes solubles et particulaires.

Les mycobactéries soumises au cryobroyage sont centrifugées 4 h à 12.000 g pour séparer les parois des antigènes solubles et particulaires. Des immun-sérums ont été préparés avec les antigènes solubles, particulaires et les parois des différentes mycobactéries, ceci avec une technique identique à celle déjà proposée pour Mycobacterium phlei. Ces immun-sérums ont servi à étudier les communautés antigéniques existant entre l'antigène R extrait de Mycobacterium phlei et les différentes espèces de mycobactéries. La réaction d'immuno-diffusion d'Ouchterlony a été utilisée pour mettre en évidence des communautés antigéniques.

On a retrouvé la fraction antigénique R chez toutes les mycobactéries étudiées. D'un autre côté on a employé l'immun-sérum préparé à partir de l'antigène R pour faire des réactions immunologiques croisées entre cet immun-sérum spécifique et les différentes fractions isolées

PRESENCE DE L'ANTIGENE "R" CHEZ DIFFERENTES MYCOBACTERIES

PLANCHE N° 1

1 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium phlei (godets périphériques).

2 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium segmatis (godets périphériques).

3 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium minetti (godets périphériques).

4 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium kansasii (godets périphériques).

5 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium aquae (godets périphériques).

6 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium avium (godets périphériques).

2

3

4

5

6

PRESENCE DE L'ANTIGENE "R" CHEZ DIFFERENTES MYCOBACTERIES

PLANCHE N° 2

7 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium scrofulaceum (godets périphériques).

8 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium bovis (var. B.C.G.) (godets périphériques).

9 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium xenopei (godets périphériques).

10 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti Ag R (godet central) et le surnageant 12.000 g de Mycobacterium phlei (godets périphériques).

11 : Réaction de précipitation entre l'immun-sérum anti S 12.000 g de Mycobacterium phlei (godets inférieurs) et différentes fractions bactériennes situées dans les godets supérieurs, on trouve de gauche à droite :

Escherichia coli (S 12.000 g)
Nocardia pellegrino (S 12.000 g)
Mycobacterium phlei (fraction 24)

des diverses mycobactéries. Cette fois aussi, les réactions se sont montrées positives comme le montrent les planches n° 1 et 2.

Nous avons pu montrer que cette fraction se retrouvait chez toutes les mycobactéries et se comportait à l'ultracentrifugation préparative comme l'antigène R de Mycobacterium phlei. On trouve toujours en effet cet antigène R, quelque soit son origine, dans le surnageant 12.000 g et dans la fraction 24 du gradient de densité.

Il est donc certain que cet antigène R est un antigène commun à toutes les mycobactéries et le fait qu'il s'agisse d'un antigène membranaire peut expliquer ceci. Nous avons cherché également, par des méthodes identiques, à retrouver cet antigène chez différentes espèces bactériennes éloignées des mycobactéries, comme :

- Escherichia coli
- Bacillus subtilis
- Pseudomonas aeruginosa

et chez des espèces proches des mycobactéries, comme :

- Nocardia asteroïdes
- Nocardia pellegrino

Nous n'avons trouvé aucune communauté antigénique entre l'antigène R et les différentes fractions extraites de ces germes. Il s'agit donc d'un antigène spécifique des différentes mycobactéries étudiées. Il est intéressant de noter que nous n'avons pu montrer son existence chez des Nocardia et notamment Nocardia pellegrino qui sont les bactéries les plus proches des mycobactéries.

En conclusion, on peut donc affirmer que cet antigène est commun aux différentes mycobactéries, qu'on le retrouve toujours dans les mêmes fractions et que, de plus, il semble spécifique du genre Mycobacterium.

Ce point était important à démontrer. Toutes les propriétés, caractéristiques démontrées pour cet antigène, seront en effet valables pour n'importe quelle mycobactérie saprophyte ou pathogène ; notamment les propriétés immunologiques éventuelles pourront s'appliquer à tous les espèces mycobactériennes.

II - LOCALISATION DE CET ANTIGENE DANS LA CELLULE

Le développement de méthodes immunologiques en tant que moyen d'investigation cytologique en microscopie électronique, a permis la détermination de l'emplacement de structures au niveau macromoléculaire, ce qui n'était pas réalisable au préalable. Ces méthodes sont basées sur le principe de la réaction antigène-anticorps, cette réaction étant visualisée par le marquage de la molécule d'anticorps par des molécules ayant des structures caractéristiques en microscopie électronique. Ces techniques à base immunologique peuvent donc être appliquées au positionnement dans une cellule de n'importe quelle structure se comportant comme antigène ou haptène. Cette méthode bénéficie ainsi de la grande spécificité de la réaction antigène-anticorps mais elle pose deux sortes de problèmes :

- le marquage des anticorps
- la réaction antigène-anticorps sur coupe

Différentes substances ont été utilisées pour le couplage avec l'anticorps : la ferritine par SINGER (105), l'uranium par STERNBERGER (110), le mercure par PEPE (77), l'iode par MEKLER (64). Enfin plus récemment on a pensé à fixer sur l'anticorps une enzyme qui permette ensuite par son action sur un substrat coloré de mettre en évidence l'anticorps (4).

Ces différentes modalités doivent toutes répondre à certains critères communs. Il faut évidemment que la molécule choisie soit aisément repérable en microscopie électronique. La liaison entre le marqueur et l'anticorps doit être suffisamment stable pour supporter les techniques de préparation, d'inclusion et le choc du flux électronique. Les techniques de couplage ne doivent pas dénaturer le site anticorps et une vérification de la réactivité de l'anticorps sera toujours nécessaire après le couplage du marqueur et de l'anticorps.

Le deuxième type de problème qui se pose est celui de la pénétration de l'ensemble anticorps-marqueur dans la cellule. En fait, quelque soit le marqueur utilisé, il semble difficile d'admettre qu'il puisse y avoir pénétration d'une molécule d'anticorps à travers une paroi bactérienne, la molécule Ig G ayant un poids moléculaire de 150.000, ceci en ne tenant pas compte du poids moléculaire du marqueur.

Cette technique ne peut donc être utilisée que pour mettre en évidence des antigènes de surface. On peut certes faire des réactions sur coupes après fixation et inclusion, certains l'ont préconisé mais nos propres essais ont montré que cette technique est inutilisable dans ces conditions, du fait de la fixation non spécifique de la ferritine

sur la coupe. Il nous semble que la seule possibilité de réaliser ces réactions serait de travailler sur des coupes obtenues à l'ultramicrotome à congélation.

En ce qui concerne l'antigène R, les premiers résultats nous ayant donné l'impression qu'il s'agissait d'un antigène de membrane, nous avons fait réagir directement le couple anticorps-marqueur sur un mélange paroi-membrane. Nous avons choisi comme marqueur celui qui nous semblait à priori l'un des plus commodes pour le repérage en microscopie électronique : la ferritine. De plus, cette technique semblait devoir nous poser un minimum de problèmes techniques. Depuis que nous avons entrepris ce travail, la technique utilisant les enzymes semble avoir résolu, au moyen de la glutaraldéhyde (4) le problème du couplage enzyme-anticorps, mais elle ne semble pas atteindre la finesse de repérage de la ferritine.

Nous exposerons successivement dans ce chapitre les modalités techniques utilisées et les résultats obtenus. Le premier type de problème qui se posait était celui de l'obtention d'immunoglobulines. Pour que la conjugaison soit possible, il est en effet indispensable d'utiliser des sérums possédant des taux élevés en globulines spécifiques. Si le sérum contient des anticorps qui ne sont pas utiles dans la réaction, il est essentiel de les éliminer. Pour ces raisons, il est préférable d'utiliser une fraction globulinique spécifique, d'où l'intérêt de l'emploi d'une méthode de fractionnement qui nous permet d'obtenir directement la fraction Ig G contenant les précipitines. Avant donc de

décrire les techniques de conjugaison, il faut au préalable discuter du choix d'une technique de fractionnement des immunoglobulines.

1) Technique de fractionnement des immunoglobulines

Différentes méthodes ont été employées pour fractionner les immunoglobulines destinées au marquage par la ferritine. Nous avons étudié ces fractionnements en fonction de deux critères :
- la constance et la fidélité du fractionnement ; qualité de retrouver à chaque fractionnement les précipitines dans des proportions identiques,
- la non dénaturation des précipitines vérifiée en réaction d'Ouchterlony en contrôlant le nombre de fractions précipitées pour un sérum donné.

Nous nous sommes adressés aux trois méthodes classiquement utilisées : méthode de fractionnement par le sulfate de sodium, par le sulfate d'ammonium et par l'éthanol.

a) Technique de fractionnement au sulfate de sodium (109)

Le sérum est dilué dans son volume d'une solution de ClNa à 8,5 p. 1000. On ajoute ensuite 2,04 g de $SO_4 Na_2$ anhydre par 10 ml de sérum dilué. Le précipité recueilli par centrifugation est ensuite redissous dans une solution de ClNa (8,5 p. 1000) et les globulines sont de nouveau précipitées. La précipitation est recommencée une troisième fois de la même façon ; finalement le précipité d'immunoglobulines est

dialysé contre de l'eau courante, puis contre une solution de NaCl à 8,5 p. 1000.

b) Méthode de fractionnement au $SO_4(NH_4)_2$ (36)

On précipite cinq fois de suite par une solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$ deux volumes de sérum pour un volume de solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$. On termine comme précédemment par une dialyse.

c) Méthode de fractionnement à l'éthanol

Pour le fractionnement des immunoglobulines, nous avons adopté une modification de la technique de COHN proposée par NICOL pour le fractionnement des immunoglobulines de lapin (69).

Le sérum est dilué avec trois volumes d'eau distillée et le pH est ensuite ajusté àpH 7,7 avec un tampon phosphate 0,05 M. La solution est refroidie à 0°C et de l'alcool à 50 p. 100 refroidi à - 20°C est ajouté lentement sous agitation jusqu'à obtention d'une concentration finale de 20 p. 100 en alcool. La température durant cette addition est maintenue aux environs de - 5°C. On obtient un précipité qui est recueilli par centrifugation. Ce premier précipité contient toutes les immunoglobulines, lesquelles sont mises en suspension dans une solution de NaCl 0,2 M maintenue à 0°C. Le pH de cette solution est ensuite ajusté à 5,2 par addition de CH_3 COOH 0,5 M ; puis on

ajoute de l'éthanol pour avoir une concentration finale de 10 p. 100.

On obtient à nouveau un précipité et un surnageant. Dans le surnageant on retrouve les Ig G, dans le précipité les Ig A et les Ig M. Les seules immunoglobulines qui nous intéressent étant les Ig G puisqu'elles comportent les précipitines, nous ne développeront que ce fractionnement.

Le surnageant est amené lentement à un pH de 7,4 par addition de $PO_4 HNa_2$ 0,5 M. De l'alcool à 95 p. 100 refroidi à - 20°C est ajouté ensuite jusqu'à obtention d'une concentration de 25 p. 100. On obtient ainsi des Ig G qui sont recueillies par centrifugation et ensuite soumises à une dialyse contre de l'eau courante puis contre une solution de NaCl à 9 p. 1000.

d) Discussion

Par la méthode de précipitation en gélose, nous avons vérifié qu'après fractionnement toutes les précipitines qui restaient présentes.

Il en a été ainsi avec les techniques au sulfate de sodium ou d'ammonium, mais nous avons souvent été géné par l'inconstance quantitative des résultats. Par contre, avec la technique de précipitation à l'alcool, nous avons pu obtenir une grande régularité dans nos résultats, aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. La critique qui est faite généralement à ce type de technique utilisant

la précipitation à l'alcool est l'altération des immunoglobulines. Le fait que nous retrouvions après traitement le même nombre de précipitines qu'avant le fractionnement, montre que cette technique peut être considérée comme valable. Un autre argument en faveur de la précipitation à l'alcool est le fait que nous ne désirions obtenir que les Ig G, les Ig A et les Ig M ne contenant aucune précipitine. Or seule la technique de COHN permet un fractionnement vraiment sélectif des différents types d'immunoglobulines.

Cet ensemble de faits nous a amené à retenir la technique de fractionnement à l'alcool adapté au sérum de lapin pour l'obtention des immunoglobulines utilisées dans la technique de marquage à la ferritine.

2) Techniques de conjugaison

Nous avons utilisé comme marqueur la ferritine, utilisée par SINGER dès 1959. Certes, le reproche que l'on a fait à cette molécule est d'avoir un poids moléculaire très élevé et ainsi d'empêcher la pénétration de l'anticorps dans les cellules. Si le problème peut se discuter en ce qui concerne la cellule animale, pour la cellule bactérienne le poids moléculaire de l'immunoglobuline est déjà suffisant pour empêcher toute pénétration. On ne pourra donc utiliser ces techniques que pour des antigènes de surface (parois-membranes). Par contre, la technique à la ferritine reste toujours la

seule qui présente un marquage fin en microscopie électronique.

Le problème préalable posé par la ferritine est sa purification. La ferritine est en effet extraite de la rate de cheval et les produits commerciaux ne sont jamais tout à fait débarrassés de débris cellulaires.

a) Purification de la ferritine

Cette purification est conduite de la façon suivante. La solution concentrée de ferritine brute est amenée à une concentration finale de 1 à 2 p. 100 avec une solution de sulfate d'ammonium à 2 p. 100. On ajoute ensuite une solution de sulfate de cadmium à 20 p. 100 jusqu'à obtention d'une concentration finale de 5 p. 100 en sulfate de cadmium. Le mélange est ensuite placé 2 h à 4°C puis centrifugé 30 min à 1000 g. Après élimination du surnageant, les cristaux de ferritine qui se trouvent dans le culot sont redissous par le sulfate d'ammonium à 2 p. 100 ; on centrifuge ensuite 1 h à 3000 g pour éliminer les débris cellulaires qui se trouvent encore mélangés à la ferritine.

Ce cycle de purification est répété plusieurs fois de suite jusqu'à ce que l'examen microscopique final ne révèle plus que des cristaux de ferritine à l'exclusion de tout débris cellulaire.

Les cristaux de ferritine purifiée doivent être ensuite débarrassés du sulfate de cadmium. Pour ce faire, la ferritine est

d'abord dissoute dans du sulfate d'ammonium à 2 p. 100, puis précipitée par du sulfate d'ammonium à 50 p. 100 de saturation finale. On centrifuge pour éliminer le surnageant et on recommence ainsi trois fois de suite. Le précipité final est remis en suspension dans un peu d'eau distillée stérile avant d'être dialysée pendant une nuit contre de l'eau courante puis contre du tampon phosphate 0,05 M à pH 7,5 pendant une nuit également. Finalement la solution de ferritine est stérilisée par passage sur filtre Millipore de 0,25 µ. La solution de ferritine ainsi préparée est alors utilisable pour être conjuguée avec l'immunoglobuline.

b) Conjugaison

Le problème de la conjugaison du marqueur est l'un des problèmes qui reste toujours le plus difficile à résoudre. En effet, la technique utilisée doit permettre la fixation du marqueur de façon stable sans que les propriétés immunologiques (c'est-à-dire de réaction avec l'antigène) soient inhibées. De nombreuses techniques ont été proposées, chaque auteur ayant travaillé avec la ferritine proposant la sienne ; les techniques utilisées peuvent être groupées en deux types :

- méthode en deux temps : conjugaison de la ferritine avec la molécule de liaison, puis entre ferritine, associée à la molécule de liaison, et l'immunoglobuline,
- méthode en un temps : mise en présence de la ferritine, de la molécule

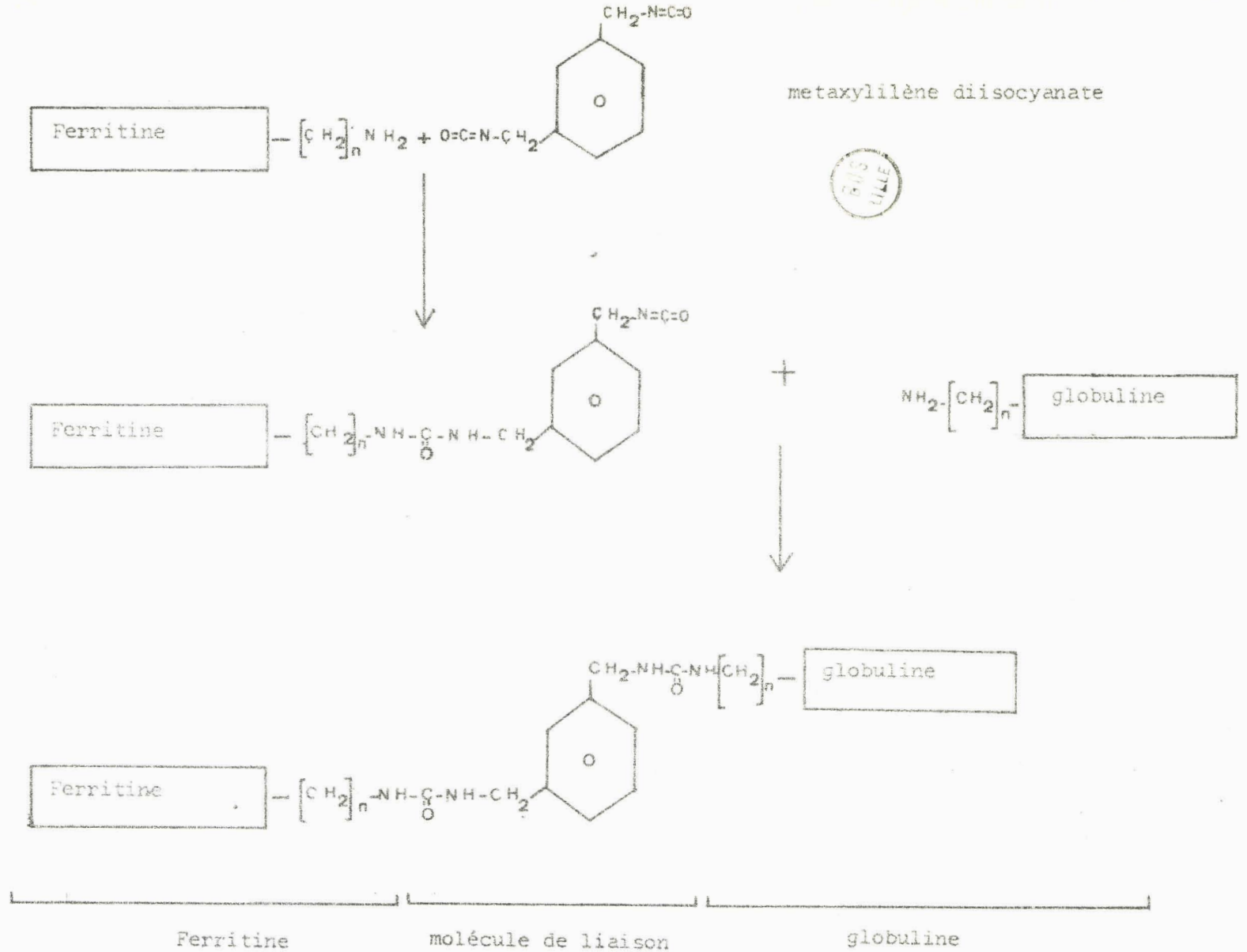
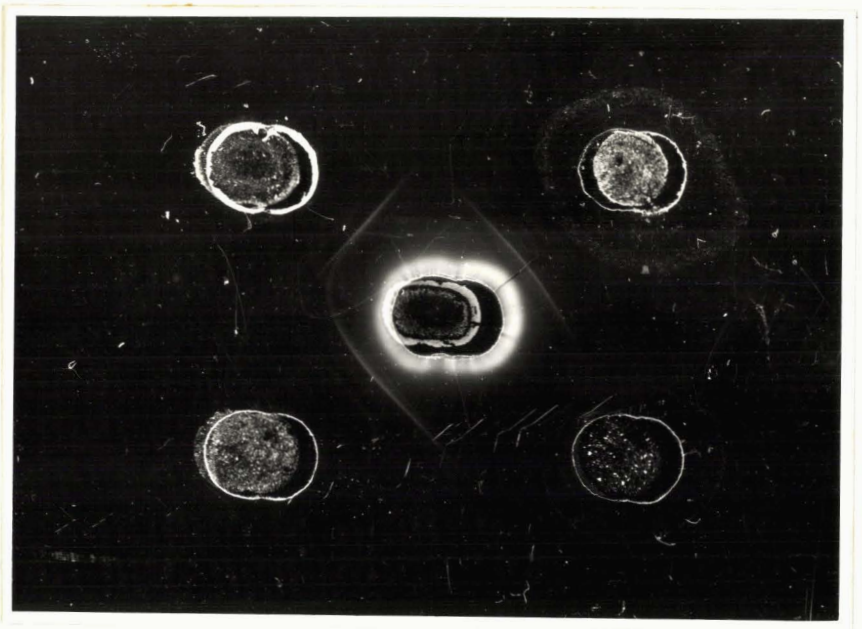


TABLEAU N° IX

Fixation de la ferritine sur une molécule d'immunoglobuline



Réaction d'Ouchterlony entre l'Ag R et l'immun-sérum correspondant conjugué ou non à la ferritine

godet central : Ag R

godets supérieurs
- gauche : immunoglobuline conjugée à la ferritine
- droit : immunoglobuline

godets inférieurs
- gauche : immunoglobuline conjugée au toluène diisocyanate
- droit : ferritine + toluène diisocyanate

PHOTOGRAPHIE N°12

de liaison et de l'immunoglobuline.

Le principe de la méthode est donc toujours le même, une molécule sert de liaison entre la ferritine et l'immunoglobuline. Nous donnons sur le tableau IX le principe de la réaction avec le métaxylylène diisocyanate. Différents composés ont été proposés comme molécule de liaison :

- le métaxylylène diisocyanate
- le toluène diisocyanate
- le pp' difluoro mm' dinitrophénylsulfone
- le toluène 2 isocyanate 4 isothiocyanate
- la benzidine diisocyanate

Nous avons choisi d'étudier trois intermédiaires :

- le métaxylylène diisocyanate (104)
- le toluène 2,4 diisocyanate (105)
- le pp' difluoro mm' dinitrodiphénylsulfone (119)

Les deux premiers ayant été proposés par SINGER et le troisième par RAM.

Les premier choix à faire était celui de la molécule intermédiaire ; en effet, il faut , après conjugaison, que la molécule d'immunoglobuline possède encore les propriétés immunologiques des précipitines.

Nous avons testé les trois produits en ce qui concerne leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la réaction de précipitation antigène-anticorps. Les différents essais nous ont montré que le toluène diisocyanate donnait les meilleurs résultats. La photographie n°12 montre qu'après contact avec le toluène diisocyanate, l'immunoglobuline a gardé ses propriétés de précipitine.

Les études faites ensuite sur les modalités de fixation de la ferritine sur la molécule intermédiaire puis le couplage avec l'immunoglobuline, nous ont amené à utiliser la technique suivante : la ferritine cristallisée est lavée deux fois dans un tampon borate 0,1 M à pH 9,5, ceci à 0°C ; puis on prépare avec ce même tampon une solution de ferritine à 15 mg/ml.

Il apparait que le tampon borate donne les meilleurs résultats pour la réaction, les tampons phosphates étant plutôt inhibiteurs. C'est pourquoi toute la réaction de couplage se fait en présence de tampon borate.

A 5 ml de solution de ferritine, on ajoute 0,1 ml de toluène diisocyanate. On agite vigoureusement à 0°C pendant 30 min tout en ajoutant lentement le toluène diisocyanate. Après 30 min on centrifuge à 200 g pendant 30 min à la température de 4°C.

Ce premier temps de contact est important, car il peut se produire une polymérisation au cours de cette réaction et l'on obtient alors un magma brunâtre surmonté d'un surnageant impropre à toute réaction. Après centrifugation, le surnageant brun clair est séparé et gardé 1 h à 4°C pour que la réaction se poursuive.

Les Ig G sont dissoutes dans le tampon borate 0,1 M NaCl M pH 9,5 à la concentration de 15 mg/ml. On ajoute finalement à volume égal les deux solutions de ferritine et d'immunoglobuline ; ces deux solutions sont mises en contact une nuit à 4°C sous agitation douce.

Après ce temps de contact, on sépare par centrifugation de 2 h à 105.000 g les immunoglobulines marquées des immunoglobulines non marquées.

Le culot de centrifugation est repris ensuite dans le même volume de départ de tampon Tris - Mg. La solution est alors prête pour le marquage. Si on a pu se débarrasser d'une partie des immunoglobulines libres, il reste de la ferritine libre que l'on peut éliminer par électrophorèse en gel de polyacrylamide, mais les pertes en immunoglobulines conjuguées sont alors trop importantes.

Nous avons préféré utiliser la solution telle quelle, la ferritine libre ne perturbant pas la réaction comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

3) Résultats

La fixation de la molécule de ferritine sur les anticorps étant réalisée, il fallait déterminer la modalité de réaction antigène-anticorps. On a d'abord essayé de réaliser des réactions sur coupes après fixation à la glutaraldéhyde et inclusion dans le glycolmethacrylate. L'action des anticorps marqués à la ferritine n'a donné aucune réaction caractéristique sur ces coupes. Il semble que la ferritine se place au hasard sur la coupe par simple phénomène électrostatique. De plus, la fixation du matériel par la glutaraldéhyde seule, si elle n'altère pas les sites antigéniques, ne permet pas ensuite de distinguer nettement les différentes structures bactériennes.

Action de la ferritine libre sur un mélange de parois
et de membranes
aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°13

Action de la ferritine libre sur un mélange de parois et de membranes.

On constate que sur cette préparation la ferritine se répartit au hasard.

0 ,25 µ
m
fe

Les premiers résultats acquis sur l'emplacement de l'antigène R permettait de supposer qu'il était associé à la membrane cytoplasmique. Ceci nous permettait d'espérer une réaction positive si nous faisions agir notre complexe anticorps-ferritine sur un mélange de parois et de membranes. Il nous fallait au préalable vérifier si nous n'avions pas de fausses réactions engendrées par la ferritine ou par des anticorps marqués autres que ceux correspondant à l'antigène R.

Nous avons d'abord mis en contact la ferritine libre avec un mélange de parois-membranes. Sur la photographie n° 13 nous pouvons examiner le résultat de cet essai. On peut voir des molécules de ferritine dispersées dans toute la préparation, mais nullement fixées sur une structure particulière.

Ce point était important à souligner, il montre qu'il n'y a pas de fixation non spécifique de la ferritine sur les membranes ou les parois.

Un deuxième essai consiste à vérifier si nous n'avions pas de fausses réactions données par des anticorps non spécifiques. On a isolé les immunoglobulines Ig G d'un lapin non immunisé, immunoglobulines sur lesquelles nous avons fixé de la ferritine. On a procédé ensuite à une réaction avec un mélange parois et membranes qui donne un aspect identique au précédent, c'est-à-dire des molécules de ferritine dispersées dans toute la préparation, ou encore des amas de ferritine sans aucune signification. Ces deux séries de témoins étant réalisées, on pouvait alors

Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-parois
sur un mélange de parois et de membranes
Aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N° 14

Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-parois
sur un mélange de parois et de membranes.

On distingue la répartition de la ferritine autour des parois

BUS LILLE

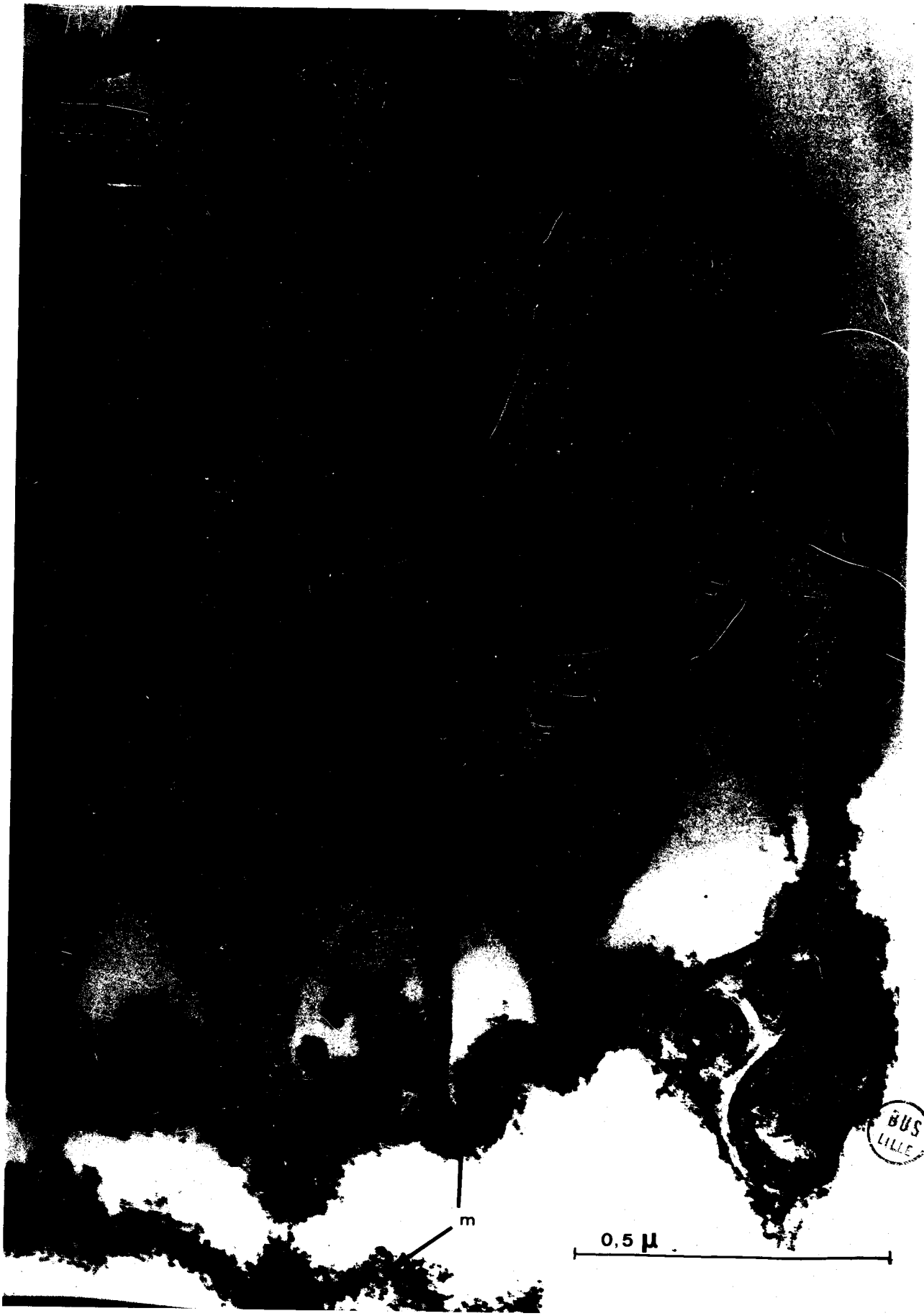
Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-antigène R
sur un mélange de parois et de membranes
Aspect ultrastructural

PHOTOGRAPHIE N°15

Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-antigène R sur un mélange de parois et de membranes

On distingue la fixation de la ferritine sur des membranes isolées comme dans le bas de la photographie, ou à l'intérieur de parois.

m = membranes



BUS
LILLE

Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-antigène R
sur un mélange de parois et de membranes
Aspect ultrastructural

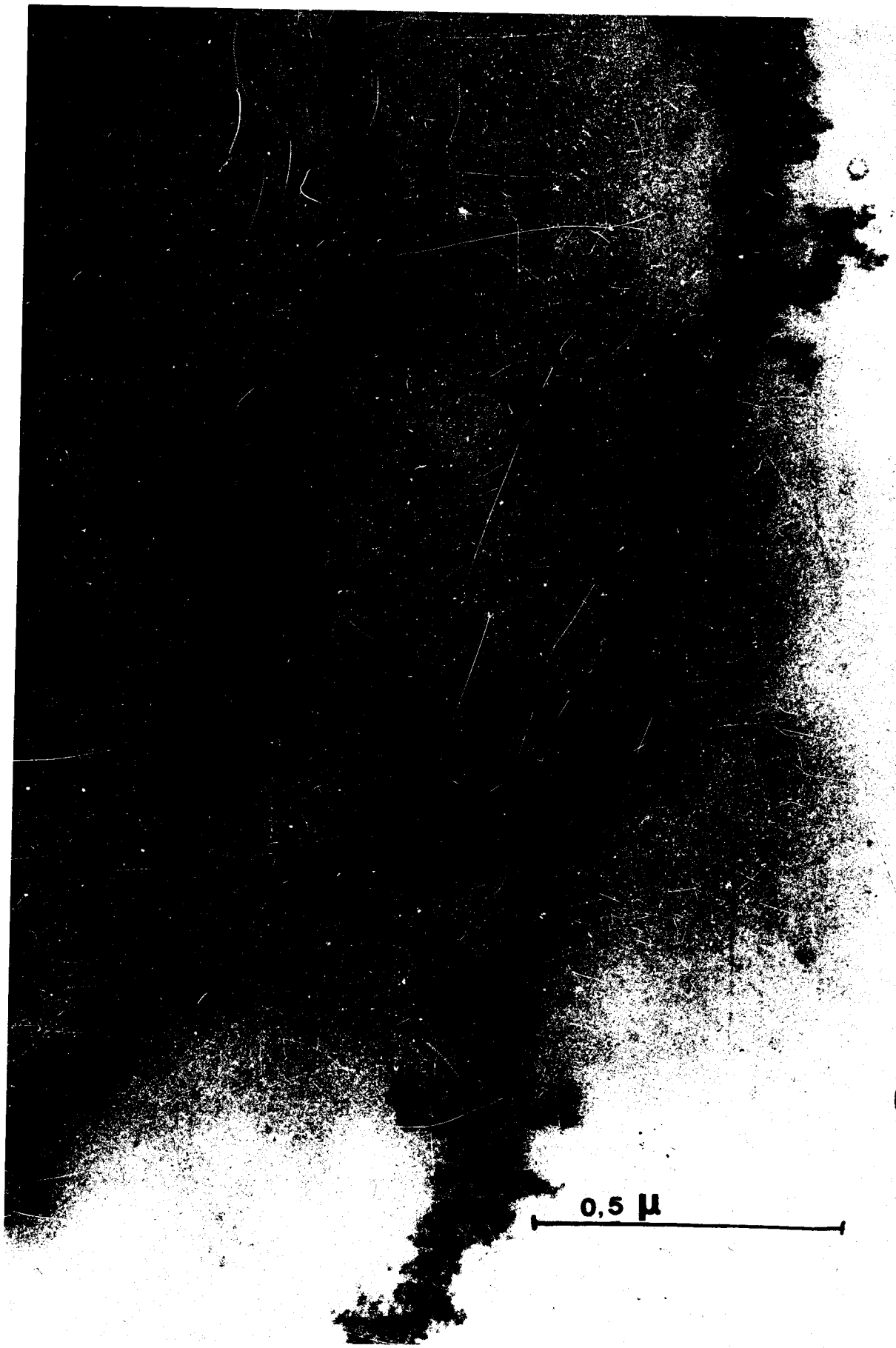
PHOTOGRAPHIE N° 16

Action de la ferritine conjuguée à un immun-sérum anti-antigène R sur un mélange de parois et de membranes

Il s'agit ici de membranes isolées. On distingue nettement la fixation de la ferritine sur celles-ci.

m = membranes

fe = ferritine



BUS LILLE

effectuer la réaction avec l'anticorps spécifique de l'antigène R.

Nous avons réalisé cette réaction antigène-anticorps sur la suspension initiale résultant de la centrifugation à 12.000 g du broyat bactérien. Cette suspension qui contient des débris de parois et de membranes est diluée au 1/50ème dans un tampon Tris Mg, puis traitée par la DNase pour éliminer le DNA restant dans la préparation. A 4 ml de la suspension précédente, on ajoute 0,8 ml d'une solution de désoxyribonucléase ; on laisse incuber 1h 30 à 30°C, puis on centrifuge 10 min à 5.000 g. Le culot est lavé ensuite dans le tampon Tris Mg, centrifugé de nouveau, puis remis en suspension dans 4 ml de tampon Tris Mg.

On procéde enfin au contact avec les anticorps marqués à la ferritine.

Aux 4 ml de suspension membranes-parois, on ajoute 1 ml de la solution d'anticorps marqués. On laisse en contact une nuit à 37°C. On termine cette réaction par une centrifugation de 15 min à 8.000 g suivie de deux lavages dans le tampon Tris Mg. Le culot est ensuite fixé et inclus selon la technique décrite précédemment.

Les photographies n° 14, 15 et 16 représentent les résultats obtenus avec cette technique. La photographie n° 14 montre une réaction entre un sérum préparé avec des antigènes de parois ; on voit nettement la ferritine se placer au niveau de la paroi. La photographie n° 15 visualise l'action d'un immun-sérum anti-antigène R marqué à la ferritine sur un mélange de parois et de membranes ; on distingue nettement dans le bas de la plaque la fixation de la ferritine sur des membranes. Ceci

est encore plus net sur la plaque n° 16 qui nous montre des molécules de ferritine fixées sur une membrane isolée, il s'agit ici vraisemblablement d'un morceau de mésosome. La réaction antigène-anticorps avec l'immun-sérum anti R a donc lieu au niveau des membranes.

On peut certes pas conclure avec ce seul argument que l'antigène R que nous avons isolé est un constituant de la membrane cytoplasmique ou du mésosome ; mais, dans le chapitre précédent, nous avions déjà démontré que cet antigène ne pouvait pas être rattaché à la paroi, car il restait présent aussi bien chez les sphéroplastes et après l'action des bactériophages. Un autre argument est le fait que la composition chimique de la membrane cytoplasmique ne révèle pas de composant classique de la paroi, comme l'acide muramique ou l'acide diaminopimélique.

La microscopie électronique, avec la technique de marquage à la ferritine, apporte donc l'argument décisif. Cet antigène R n'est pas le constituant unique de la membrane cytoplasmique, mais il en fait sûrement partie.

III - ANALYSE CHIMIQUE(*)

Après avoir étudié l'emplacement de l'antigène R dans la cellule bactérienne, il était intéressant de connaître la composition chimique de la fraction antigénique isolée.

Cette étude a été faite avec un matériel dont nous avons montré la pureté immunologique et contrôlé la pureté par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Il n'est cependant pas possible d'affirmer qu'il s'agit d'une protéine chimiquement pure, puisque seule l'ultracentrifugation analytique pourrait le préciser.

L'antigène R a une structure glycopeptidique composée d'environ 65 p. 100 de protéines et 35 p. 100 d'oses.

La composition en acides aminés a pu être établie à l'auto-analyseur d'aminoacides "Technicon" après une hydrolyse de 18 h à 110°C par de l'HCl 6N. Ceci nous a permis de déterminer la composition moyenne suivante, exprimée en micromoles :

Lysine	74,5
Histidine	23
Arginine	80
Acide aspartique	118
Thréonine	73
Sérine	65
Acide glutamique	120
Proline	54

(*) Nous tenons à remercier très sincèrement le Professeur LEDERER et Monsieur PETIT pour la réalisation de cette étude chimique.

Glycocolle	160
Alanine	133
Valine	95
Methionine	11
Isoleucine	58,5
Leucine	106
Tyrosine	22
Phenylalanine	34
Norleucine	21

On ne peut affirmer l'absence de cystéine, l'hydrolyse chlorhydrique ne permettant pas de retrouver cet acide aminé.

Il s'agit là d'une composition moyenne, l'analyse ayant été faite sur plusieurs préparations différentes d'antigènes ; analyse qui nous a toujours montré une composition et une répartition des différents acides aminés très proches d'un échantillon à l'autre. Ce point est important car il souligne la constance de notre méthode de fractionnement.

La composition en oses de l'antigène R a été établie par un dosage de sucres neutres à l'orcinol qui nous a donné la quantité totale d'oses ; ensuite une chromatographie, après hydrolyse, dans le solvant acétate d'éthyle pyridine eau (8-2-1) nous a permis de préciser au moins la présence de deux sucres : le glucose et le ribose.

Il est a noter que cet antigène ne semble pas contenir de fraction lipidique, ce qui pourrait être en contradiction avec les résultats obtenus par l'étude de la structure membranaire. Il faut rappeler qu'il ne s'agit pas ici de la composition chimique de la

membrane cytoplasmique ou du mésosome, mais bien de la composition d'une fraction antigénique que nous pensons "reliée" à la membrane cytoplasmique. Il faut préciser qu'il n'a été trouvé dans cet antigène aucun "marqueur" de la paroi comme l'acide muramique ou l'acide diaminopimélique, ceci nous confirme le fait que l'antigène R est bien relié à des structures membranaires.

En ce qui concerne la composition en acides aminés, si nous comparons les chiffres que nous avons obtenus avec ceux proposés par ENGELMAN pour les membranes de Mycoplasma laydlawii (1967, Congrès sur les membranes biologiques), nous constatons des résultats identiques sauf pour les points ci-après nommés. Pour l'arginine et le glycocolle les taux que nous avons trouvés sont trois fois plus élevés, pour l'alanine et l'acide glutamique une fois et demi plus élevés ; d'autre part, nous trouvons des acides aminés aromatiques comme la phenylalanine et la tyrosine, absents dans l'étude d'ENGELMAN. Il s'agit là d'une première ébauche de résultats. Cette étude devra être complétée et poursuivie, notamment en ce qui concerne la composition en oses et osamines.

IV - ETUDE IMMUNOLOGIQUE

Après avoir étudié la structure chimique de cet antigène, il était intéressant d'étudier quel était son rôle immunologique proprement dit, c'est-à-dire quels phénomènes immunologiques pouvait-il

engendrer lorsqu'il était introduit dans un organisme.

Il était intéressant également de comparer le pouvoir immunologique engendré par l'antigène R isolé avec le pouvoir immunologique engendré par des parois solubilisées. Notre étude a porté essentiellement sur les phénomènes d'immunité spécifique et non spécifique.

1) Immunité non spécifique

Il avait déjà été démontré par certains auteurs comme BIOZZI (6) puis FOX (20,21) que des injections de Mycobacterium phlei à des animaux pouvaient entraîner une résistance non spécifique à l'infection par certains germes. Nous avons repris ces expériences en immunisant des cobayes avec, d'une part l'antigène R, d'autre part avec des parois solubilisées.

a) Immunisation par l'antigène R membranaire

Des lots de cinq cobayes d'un poids de 400 g environ ont reçu pendant quatre semaines par voie intradermique des injections hebdomadaires d'antigène R à la dose de 1 mg d'antigène par injection, sous un volume de 0,50 ml, mélangé à 0,25 ml d'une solution d'alun de potassium, ajustée à pH 7.

Nous avons ensuite inoculé, après un temps de latence de dix jours, une suspension de Salmonella enteritidis récemment isolée.

Ce germe est cultivé pendant 12 h sur le milieu suivant :

Tryptone	20 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Hydrochlorure de thiamine	0,005 g
H_2O distillée q.s.p.	1 000 ml

milieu ajusté à pH 7,2

- Des doses de 10^7 germes en suspension dans un tampon Tris Mg et sous un volume de 0,5 ml ont été ensuite inoculées au cobaye par voie intra-péritonéale.

- Des lots de cobayes témoins ont reçu en même temps des doses identiques de germes sans antigène. Tous les cobayes témoins sont morts dans un délai variant de 6 à 8 jours.

- Les cobayes ayant reçu l'antigène et la suspension de germes sont morts dans un délai de cinq à six jours et dans certaines expériences ces chiffres ont été réduits à 48 h.

L'injection d'antigène R n'apporte donc aucune protection contre le développement de l'infection à Salmonella enteritidis, il semble même que, dans certains cas, il facilite cette infection.

b) Immunisation par des parois

Nous avons repris cette expérience mais en inoculant cette fois des parois bactériennes solubilisées dans le mélange urée - Brij.

Comme précédemment, des doses identiques d'antigènes ont été

employées dans des conditions analogues.

Des lots de cobayes ayant reçu l'antigène ainsi que des lots de cobayes témoins ont été inoculés avec des doses de 10^7 germes de Salmonella enteritidis. Tous les cobayes témoins sont morts dans un délai variant comme dans l'expérience précédente de six à huit jours.

Par contre, les cobayes ayant reçu les parois sont morts dans des délais variant de 12 à 14 jours. Il semble donc bien qu'il y ait eu acquisition par les cobayes vaccinés, d'une certaine résistance à l'infection par Salmonella enteritidis.

2) Immunité spécifique

Des expériences analogues ont été faites pour déterminer quel pouvait être le comportement de Mycobacterium tuberculosis inoculé chez des animaux ayant reçu au préalable, soit l'antigène R, soit des parois de Mycobacterium phlei solubilisées. Des cobayes ont donc été préparés avec des antigènes à des doses et dans des conditions identiques à celles précédemment décrites. Des lots de cinq cobayes reçoivent des doses de 1 mg d'antigène (exprimé en protéines totales) avec de l'alun de potassium comme adjuvant. Les injections se poursuivent durant quatre semaines à raison d'une injection par semaine. Ensuite, après un temps de latence de dix jours, les cobayes reçoivent Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$ par voie intraveineuse à raison de 3×10^4 germes par cobaye. Des lots de cobayes témoins ont reçu en même temps la même dose de germes.

a) Injection d'antigène R

L'injection d'antigène R n'a apporté aucune immunité protectrice chez les cobayes. En effet, à l'autopsie on a retrouvé sur les poumons le même nombre de lésions chez les cobayes ayant reçu l'antigène que chez les témoins. Il existe toutefois une différence importante, les lésions nodulaires sont plus marquées et étendues chez les cobayes immunisés.

L'injection de l'antigène R, au lieu de minimiser l'extension de la maladie tuberculeuse, semble favoriser le développement des lésions.

b) Injection de parois solubilisées

L'injection de parois solubilisées à des cobayes nous a apporté des résultats identiques. Le nombre de lésions est identique chez les cobayes immunisés et les cobayes témoins, mais les lésions sont plus importantes chez les cobayes immunisés.

Il semble donc qu'aussi bien l'injection d'antigènes membranaires que l'injection d'antigènes pariétaux de Mycobacterium phlei, n'apporte aucune protection chez le cobaye, mais qu'au contraire, elle favorise l'extension des lésions tuberculeuses.

CONCLUSION

Le but de notre travail a été de mettre au point les modalités d'obtention et de fractionnement des antigènes de Mycobacterium phlei puis d'en étudier la situation dans la cellule et éventuellement leur rôle.

1) La réalisation de cette recherche a nécessité au préalable

a) L'obtention de grandes quantités de germes dans des conditions rigoureuses de culture, grace à la mise au point d'unités de fermentation adaptées à la culture des mycobactéries.

b) Une étude précise de la structure de ces germes en microscopie électronique de façon à préciser l'emplacement des antigènes isolés dans la cellule bactérienne. Nous nous sommes plus particulièrement attaché à l'analyse de deux formations particulières de Mycobacterium phlei : le mésosome dont le volume est très important au sein du cytoplasme et la couche amorphe, responsable de l'agglutination des bactéries entre elles et de la résistance du germe aux agents physiques ou chimiques.

c) La mise au point de méthodes de broyage permettant l'obtention d'antigènes de mycobactéries, soit par cryobroyage, soit par l'emploi d'aluminosilicates de synthèse. Notre préférence s'est portée sur la seconde méthode qui est d'une réalisation simple et peut être utilisée pour le typage des mycobactéries.

2) Les broyats bactériens obtenus par les techniques précédentes ont servi à la séparation des différents constituants cellulaires

Nous avons réalisé la séparation des parois des antigènes solubles et particulaires par des centrifugations différentielles.

Les antigènes solubles et particulaires ainsi séparés ont été ensuite isolés par une méthode de fractionnement basée sur l'emploi successif de sédimentation en gradient de saccharose et de la gel filtration sur Sephadex. C'est l'utilisation de deux techniques faisant appel à des principes très différents qui ont permis la mise au point d'une méthode de séparation sélective et reproductible. La méthode des gradients par un partage préalable permet d'obtenir des groupements de trois ou quatre antigènes qu'il est possible ensuite de séparer sur Sephadex.

Nous avons pu recueillir ainsi des fractions antigéniques qui, par contrôle immunologique et par vérification en gel de polyacrylamide, se sont révélées isolées. Nous ne prétendons pas que cette technique permette d'avoir des complexes protéidiques à l'état pur, mais bien de fractionner des antigènes. Il est certain que pour l'obtention de

fractions chimiquement pures une étape terminale en électrophorèse de gel de polyacrylamide serait indispensable, mais diminuerait aussi considérablement le rendement déjà faible. En effet, les quantités d'antigène isolé ont toujours été peu importantes et la durée d'obtention d'une masse suffisante de matériel pour entreprendre l'étude d'un antigène, nous a posé de sérieux problèmes.

Parmi ces fractions isolées, l'une d'entre elles a été étudiée plus particulièrement, car nous avions précisé au préalable les relations de cet antigène avec les mycobactéries, autres que Mycobacterium phlei, ainsi qu'avec diverses bactéries.

3) L'étude de l'antigène isolé a permis de constater

a) qu'il est commun aux différentes espèces mycobactériennes étudiées,

b) qu'il est lié à la membrane cytoplasmique pour les raisons suivantes :

- les sphéroplastes de Mycobacterium phlei dépourvus de parois contiennent encore cet antigène,
- la dégradation des parois par des mycobactériophages spécifiques laisse persister l'antigène,
- la technique à la ferritine a été employée pour visualiser en microscopie électronique l'emplacement de l'antigène étudié (antigène R) . Des immun-sérums préparés avec l'antigène R ont été marqués à la ferritine. Un mélange de membranes et de parois a été mis en contact avec l'immun-sérum marqué et a permis de mettre en évidence la présence de ferritine autour

des membranes,

- l'absence dans la composition chimique de cet antigène de "marqueurs" de la paroi comme l'acide muramique ou l'acide diaminopimélique.

Il n'a toutefois pas été possible de préciser si cet antigène est une partie intégrante de la membrane ou s'il s'agit d'une fraction cytoplasmique très fortement liée à celle-ci.

c) Qu'il possède des propriétés immunologiques

L'injection d'antigène a une action aggravante sur l'infection bactérienne du cobaye par Salmonella typhi ou Mycobacterium tuberculosis. L'étude de ces propriétés fera l'objet d'une étude complémentaire.

Au cours de ce travail nous avons eu constamment comme idée directrice d'isoler des composants bactériens natifs et, pour suivre ce fractionnement, la méthode de choix est la constatation du maintien des propriétés antigéniques.

Alors que de nombreux travaux concernant la chimie des composants cellulaires mycobactériens ont été réalisés, aucun de ceux-ci n'a permis de déterminer la nature chimique d'une structure donnée. Notre travail doit permettre dans l'avenir, grace à l'isolement de quantités plus importantes d'antigène, de mener à bien l'étude chimique de constituants immunologiquement définis et structuralement localisés.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AFFRONTI L.F.
Amer. Rev. Tuberc., 1959, 79, 284

2 - ANDERSON R.J.
J. Biol. Chem., 1929, 83, 505

3 - ASSELINEAU J., CHOUCROUN N. et LEDERER E.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 5, 197

4 - AVRAMEAS S. et LESPINATS G.
C.R. Acad. Sci., 1967, 265, 1149

5 - BECK A.
J. Path. Bact., 1961, 82, 45

6 - BIOZZI G., STIFFEL C., HALPERN B.N. et MOUTON D.
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol., 1960, 5, 876

7 - BOJALIL L.F., GOMEZ-REYES A. et ZAMORA A.
Rev. Lat. Amer. Microbiol., 1963, 6, 27

8 - BOYDEN S.V.
J. Exp. Med., 1951, 93, 107

9 - BOYDEN S.V. et SORKIN E.
Ciba Foundation Symposium Experimental Tuberculosis, 1955, 144

10 - BOYDEN S.V. et SORKIN E.
J. Immunol., 1955, 75, 15

11 - BRODHAGE H.
Eng. Hyg., 1954, 28, 123

12 - BURTIN P. et KOURILSKY R.
Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 148

13 - CHARGAFF E. et SCHAEFFER V.
Ann. Inst. Pasteur, 1935, 54, 108

14 - CASTELNUOVO G., GAUDIANO A. et MORELLINI M.
Ann. Ist. Forlanini, 1960, 19, 190

15 - CASTELNUOVO G. et MORELLINI M.
Ann. Ist. Forlanini, 1962, 22, 1

16 - CASTELNUOVO G., DUNCAN M.E. et MORELLINI M.
Ann. Ist. Forlanini, 1962, 22, 145

17 - DANNENBERG A.M.
Bacteriol. Rev., 1968, 32, 85

18 - DUBOS R.J. et SCHAEDLER R.W.
J. Exptl. Med., 1957, 106, 703

19 - FONG J., SCHNEIDER P. et ELBERG S.S.
J. Exptl. Med., 1956, 104, 455

20 - FOX A.E., EVANS G.L., TURNER F.J., BLAUNSTEIN A. et SCHWARTZ B.S.
J. Reticuloendothelial Soc., 1964, 1, 359

21 - FOX A.E., EVANS G.L., TURNER F.J., SCHWARTZ B.S. et BLAUNSTEIN A.
J. Bacteriol., 1966, 92, 1

22 - GERNEZ-RIEUX Ch. et TACQUET A.
Progr. Expl. Tub., 1952, 5, 66

23 - GIMPL F. et WEISSFEILER J.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hong., 1962, 9, 174

24 - GOMEZ-ROYES A., BOJALIL L.F. et ZAMORA A.
Rev. Lat. Amer. Microbiol., 1963, 6, 41

25 - GRABAR P.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1952, 234, 889

26 - GREEN J.T.
Amer. Rev. Tuberc., 1958, 78, 226

27 - GRIFFITH A.S.
Tubercle London, 1925, 6, 417

28 - HAGIME S., JONE W.B. et KUBICA G.P.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1964, 90, 800

29 - HART P.D., SUTHERLAND I.A. et THUMS J.
Tubercle, 1967, 48, 201

30 - HECKLY R. et WATSON B.
Amer. Rev. Tuberc., 1951, 64, 602

31 - HEIDELBERGER M. et MENZEL A.
J. Biol. Chem., 1937, 118, 79

32 - HIRANO N. et SUSHICA K.
Jap. J. Microbiol., 1960, 4, 303

33 - JENSEN K.A., KLAER I. et LUNDBERG L.
Acta Path. et Microbiol. Scand., 1964, 61, 619

34 - JOSEPH K.
Berliner Tierärztl Wschr., 1909, 25, 847

35 - KANAI K. et YOUMANS G.P.
J. Bacteriol., 1960, 80, 615

36 - KENDALL H.E.
Cold Spring Harbor Symposia, 1938, 6, 376

37 - KNIKER W.T. et LABORDE J.B.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1962, 86, 107

38 - KOCHAN A.
Dissertation, Stanford University, 1958

39 - KURJINSKI J.B. et SNYDER M.L.
J. Bacteriol., 1961, 82, 632

40 - KWAPINSKI J.B.
Zbl. Bakt. Parasit. Inf. Hyg., 1966, 200, 80

41 - KWAPINSKI J.B.
J. Bacteriol., 1964, 88, 1211

42 - LAGERCRANTZ R.
Acta Path. Microbiol. Scandin., 1956, 38, 492

43 - LAIDLAW P. et BUDLEY H.
Brit. J. Exp. Path., 1925, 6, 197

44 - LARSON C.L., BELL J.F., LIST R.H., RIBI E. et WICHT W.C.
Bacteriol. Rev., 1963, 27, 341

45 - LIND A.
Thèse Université, Göteborg (Suède), 1961

46 - LHAND C.N. et PEACOCK D.B.
Ciba Foundation Symposium Experimental Tuberculosis, 1955, 163

47 - LOWRY O., ROSEBROUGH N., FARR L. et RANDALL R.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265

48 - LUFT J.H.
J. Biophys. Biochem. Ctyol., 1961, 9, 409

49 - LURIE M.B.
J. Exp. Med., 1942, 75, 247

50 - MACKANESS G.B.
Brit. Med. Bull., 1954, 10, 100

51 - MACKANESS G.B.
Amer. Rev. Tuberc., 1954, 69, 495

52 - MACKANESS G.B.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1968, 97, 337

53 - MAGNUSSON M.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1961, 83, 57

54 - MANKIEWICZ E.
Canad. J. Microbiol., 1958, 4, 565

55 - MARTOSH A., ESLAMI V. et ATWELL R.S.
Dis. Chest., 1962, 41, 624

56 - MASUCCI P., Mac ALPINE K. et GLENN J.
Amer. Rev. Tuberc., 1930, 22, 669

57 - MATHOIS H., SPADIUT H. et STÖCKL W.
Wien Tierärzl Msch., 1960, 47, 833

58 - MATSUAMOTO R.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 1960, 13, 139

59 - MATTMAN L.H., TUNSTALL L.H., MATHEWS W.W. et GORDON D.L.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1960, 82, 202

60 - MAXWELL K.W. et MARCUS S.
J. Immun., 1968, 101, 176

61 - MICKE H.
Z. Immun-forsh, 1966, 131, 1

62 - MIDDLEBROOK G. et DUBOS R.J.
J. Exp. Med., 1948, 88, 521

63 - MIDDLEBROOK G.
N.Y. Acad. Med., 1952, 28, 474

64 - MEKLER L.B., KLIMENKO S.M., DOBREZOV G.E., NAUMOVA V.K., HOFFMAN Y.P. et ZHDANOV V.M.
Nature, 1964, 203, 717

65 - MEYNELL G.G.
J. Path. Bact., 1954, 67, 137

66 - MORISAWA S., TANAKA A., SHOGIMA K. et YAMAMURA Y.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 252

67 - MUELLER J.H.
J. Exp. Med., 1926, 43, 9

68 - NASSAU E., SCHWABACHER H. et HAMILTON G.M.
Tubercle (Lond), 1964, 39, 103

69 - NICHOL J.C. et DEUTSCH H.F.
J. Amer. Chem. Soc., 1948, 80, 70

70 - NORLIN M., LIND A. et OUCHTERLONY Ö.
Excerpta Med., 1965, 96, 130

71 - NORLIN M.
Bull. Int. Un. Tuberc., 1966, 38, 29

72 - OLITSZKI A.L.
Path. Microbiol., 1967, 30, 433

73 - OUCHTERLONY Ö.
Progress in Allergy, 1958, V, 1

74 - PARLETT R.C. et YOUMANS C.P.
Amer. Rev. Tuberc., 1958, 77, 450

75 - PARLETT R.C.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1962, 98, 637

76 - PALMER C.E., SHAV L.W. et COMSTOCK G.W.
Amer. Rev. Tuberc., 1958, 77, 877

77 - PEPE F.A.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 11, 515

78 - PENSO G., CASTELNUOVO G. et MORELLINI M.
Ann. Ist. Forlanini, 1962, 22, 145

79 - PETITPREZ A., ROOS P. et TACQUET A.
J. Microscopie, 1967, 6, 229

80 - RAFFEL S.
J. Infect. Dis., 1948, 82, 264

81 - REGGIARDO Z.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1964, 90, 800

82 - RIBI E., LARSON C.L., LIST R. et WICH W.C.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1958, 98, 263

83 - ROOS P., GAUDIER B., TACQUET A. et GUILLAUME J.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1966, 17, 49

84 - ROOS P., GUILLAUME J. et TACQUET A.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1967, 18, 85

85 - ROOS P., TACQUET A., TISON F. et GUILLAUME J.
C.R. Acad. Sci., 1967, 264, 418

86 - ROOS P., GUILLAUME J., TACQUET A. et PLANCOT M.T.
Zeich. Immun. Allerg. Klin. Immunologie, 1969, 137, 236

87 - RYTER A. et KELLENBERGER J.
Nature forsch, 1958, 13b, 597

88 - RYTER A.
Bacteriol. Rev., 1968, 32, 39

89 - SATO H., BIENA B.B. et GREENBERG L.
Can. J. Microbiol., 1965, 11, 807

90 - SCHAEFER W.
C.R. Soc. Biol. Paris, 1935, 779, 59

91 - SCHAEFER W.
Ann. Inst. Pasteur, 1937, 58, 388

92 - SCHAEFER W.
C.R. Soc. Biol. Paris, 1939, 130, 968

93 - SCHAEFER W.
Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, 749

94 - SCHAEFER W.B. et REGGIARDO Z.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1963, 88, 111

95 - SCHAEFER W.
Bact. Proc., 1964, p.58

96 - SCHAEFER W.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1965, 92, 85

97 - SCHAEFER W.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1967, 96, 115

98 - SCHAEFER W.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1968, 97, 18

99 - SCHAEFER W.
Z. Immun forsch, 1955, 112, 57

100 - SEIBERT F.B. et GREEN J.T.
Amer. Rev. Tuberc., 1941, 42, 9

101 - SEIBERT F.B.
Amer. Rev. Tuberc., 1949, 59, 86

102 - SEIBERT F.B.
Amer. Rev. Tuberc., 1955, 71, 704

103 - SEIBERT F.B., MILLER E.E. et BUSENA V.
Amer. Rev. Tuberc., 1956, 73, 547

104 - SINGER S.S. et SCHICK A.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 519

105 - SINGER S.S. et Mac LEAN J.O.
Lab. Invest., 1963, 12, 1002

106 - SINGH L.M.
Indian J. Exp. Biol., 1966, 425

107 - STACEY M., KENT P. et NASSEAU E.
Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 146

108 - STACEY M.
Karger Ed., 1955, 6, 7

109 - STRAUSS A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 105, 184

110 - STERNBERGER L.A., DONATI E.J., CUCOLIS J.J. et PETRALI J.P.
Exp. Mol. Path., 1965, 4, 112

111 - SUBRAHMANYAN B., SINGHUI B.R. et VENKITASUBRAMANIAN T.A.
Indian J. Exp. Biol., 1964, 2, 156

112 - SUSHIDA K. et HIRANO N.
Jap. J. Microbiol., 1963, 7, 9

113 - SUTER E. et KIRSANOW E.M.
Immunology, 1950, 4, 354

114 - SUTER E.
J. Exp. Med., 1953, 97, 235

115 - TAKAHASHI Y., SASAKI A. et YAMOMOTO T.
C.R. Soc. Biol., 1960, 154, 1901

116 - TAKAHASHI Y. et ONO K.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1961, 83, 281

117 - TAKAHASHI Y.
Amer. Rev. Resp. Dis., 1962, 85, 708

118 - TARNOK I.
Z. Immun. forsch., 1963, 125, 243

119 - TAWDE S.J. et SRI RAM S.
Archives of Biochem. Biophys., 1962, 97, 429

120 - TENNET D. et WATSON D.
J. Immun., 1942, 45, 179

121 - THACORE H. et WILLET H .T.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 114, 43

122 - THURSTON J.R., RHEINS M. et HUSIWARA T.
Amer. Rev. Tuberc., 1956, 56, 563

123 - TSUMITA T., MATSUMOTO R. et MIZUNO B.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 1960, 13, 131

124 - WELLS A.Q. et WYLIES A.H.
Brit. J. Exp. Path., 1952, 33, 405

125 - WINZLER R.J.
"Methods of Biochemical analysis" D. Glick Ed., 1959, 279

126 - YONEDA M., FUKUI Y. et YAMANOUCHI T.
Biken. Journal, 1965, 8, 201

127 - YOUMANS A.S. et YOUMANS G.P.
J. Bacteriol., 1964, 87, 1346

128 - ZAMORA A., BOJALIL L.F. et GOMEZ-REYES A.
Rev. Lat. Amer. Microbiol., 1963, 6, 91

129 - ZAMPIERI A.
Rend. Acc. Naz. Lincei, 1959, 6, 109

130 - ZIPPER H. et PERSON P.
J. Bacteriol., 1966, 92, 1252

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE * Section de SCIENCES * LILLE

* * *