

Sur le rôle des lipoides en
immunologie. - Fonction
fixatrice et capacité modifica-
trice des lipoides. - Vaccins
lipoidiques

PAR LES
Drs. VITAL BRAZIL et J. VELLARD

(Note préliminaire présentée à l'Académie Nationale de
Médecine de Rio de Janeiro, Le 15 Juillet 1927)



— 1927 —

Escolas Profissionais do Lyceu Coração de Jesus
S. PAULO

Sur le rôle des lipoides en
immunologie. - Fonction
fixatrice et capacité modifica-
trice des lipoides. - Vaccins
lipoidiques

PAR LES
Drs. VITAL BRAZIL et J. VELLARD

(Note préliminaire présentée à l'Académie Nationale de
Médecine de Rio de Janeiro, Le 15 Juillet 1927)



(Travail de l'Institut de Butantan)

SUR LE RÔLE DES LIPOIDES EN IMMUNOLOGIE. FONCTION FIXATRICE ET CAPACITÉ MODIFI- CATRICE DES LIPOIDES. VACCINS LIPOIDIQUES.

PAR LES DRS. VITAL BRAZIL ET J. VELLARD.

(Note préliminaire présentée à l'Académie Nationale de Médecine de
Rio de Janeiro, Le 15 Juillet 1927).

Depuis la découverte de la sorothérapie, le problème de l'immunité naturelle ou acquise a été l'objet de nombreux travaux, visant à en préciser le mécanisme et à faire progresser les méthodes immunologiques.

La nature protéique de toutes les substances capables de jouer de rôle d'antigène, la relation étroite des anti-corps avec certaines fractions du serum sanguin, ainsi que l'ensemble des propriétés physico-chimiques de ces anti-corps ont pendant longtemps fait considérer les phénomènes d'immunité comme une propriété exclusive des substances protéiques. Quelques biologistes notamment Ivar Bang, Forssmann, Hans Much, avaient cependant émis l'opinion qu'un autre groupe de substances d'ailleurs très hétérogènes, appelées lipoides par Overton, en raison de leur solubilité dans les dissolvants ordinaires des graisses, pouvait jouer un rôle notable dans la défense de l'organisme et Ivar Bang avançait même que l'importance biologique des lipoides ne le cède en rien à celle des proteides. Des travaux récents, ayant pour but principal l'étude de l'hémolyse et de la réaction de fixation de complément ont de nouveau appelé l'attention sur ces substances.

Depuis quelques années, l'un de nous (Vital Brazil), cherchant à expliquer l'influence favorable du serum normal en certains états pathologiques, eût l'idée d'es-

sayer séparément les différentes fractions du serum, et verifia ainsi, avec la colloboration de plusieurs cliniciens, l'action favorable non seulement des lipoides de seruns normaux, mais aussi des lipoides extraits des organes internes.

Ces observations conduisirent à la préparation des seruns hormoniques, de l'hormo gravidique et des extraits hormonisés, tous doués de propriétés anti-toxiques marquées.

Afin d'établir ces faits sur une base expérimentale et de préciser le rôle des lipoides dans la défense de l'organisme, nous avons entrepris de longues et nombreuses recherches, que nous résumerons dans cette note préliminaire après avoir fait une rapide synthese des principaux travaux antérieurs.

Historique

Les premières observations sur la valeur biologique des lipoides sont d'Overton et de Meyer, confirmées plus tard par Nicloux, montrant que les lipoides, particulièrement abondants à la périphérie des cellules de certains organes, surtout des centres nerveux, absorbent en grande proportion les anesthésiques dans lesquels ils sont solubles; cette affinité spéciale des lipoides expliquerait l'action particulière des anesthésiques sur les centres nerveux, et sous le nom de théorie d'Overton-Meyer a été appliquée depuis à diverses autres substances toxiques.

L'importance biologique des lipoides s'est beaucoup accrue à la suite de l'expérience classique de Wassermann et K. Takaki, consistant dans la neutralisation in vitro de la toxine tétanique par une émulsion de substance cérébrale, attribuée par Landsteiner, Loewe et Takaki et par presque tous les auteurs suivants, à l'exception de Marie et Tiffenau et de leurs disciples Laroche et Grigault à la fixation de la toxine par les lipoides cérébraux. La toxine diphtérique d'après différents auteurs, entre autres Laroche et Grigault, de Waele, Dold et Unger mann, serait au contraire activée par les lipoides, particulièrement ceux du groupe des phosphatides.

L'étude de l'hémolyse a démontré le rôle important que les lipoides exercent sur ce phénomène. Ainsi, se

basant sur le fait que le venin de cobra (*Naja tripudians*) ne détermine l'hémolyse qu'en présence de traces de lécithine (formation d'un complexe, Kobra — lécithide de Kyes et Sachs), divers auteurs, tels que Kyes, Sachs, Noguchi, Reicher, ont été conduits à penser que la lécithine, et les phosphatides en général, jouent un rôle analogue dans l'hémolyse provoquée par le serum.

Dernièrement Belfanti et ses collaborateurs, reprenant cette étude de l'activation de l'hémolyse par les lipoides, ont attribué à ce mécanisme, une série de phénomènes hémorragiques observés dans différents états pathologiques, comme le purpura, la variole, la septicémie hémorragique, etc.

La cholestérine et ses éthers possèdent au contraire un rôle antagoniste de la lécithine, empêchant l'action hémolytique de la saponine ou du venin de *Naja*, même en présence de lécithine; cette observation a été l'origine de divers procédés de dosage de la cholestérine (Peretz, Boidin, Handies). C'est à la présence de composés cholestérisés à la périphérie des hématies (Priban) qu'a été attribuée la résistance des hématies à l'action lytique (Wright). De là vient l'importance toujours plus grande des lipoides dans la réaction de Wassermann et les autres réactions de fixation de complément, réactions « purement lipotropiques » suivant l'expression de Noguchi, et l'emploi dans la totalité des techniques actuelles de sero-diagnostic de la Syphilis d'un antigène non spécifique, de nature lipoidique, extrait de différents organes par l'alcool, l'éther ou l'acetone.

En plus de leur rôle de fixation, et de neutralisation ou d'activation de diverses substances toxiques, certains lipoides agiraient sur divers microorganismes, surtout les protozoaires, plus faiblement sur les bactéries. Neufeld, Ficker, Vetrano, Mandelbaum ont signalé l'action lytique de divers lipoides sur les pneumocoques, meningocoques, certains staphylocoques et *B. typhi*; les spores charbonneuses elles mêmes pourraient être détruites, selon l'opinion de Mario Segale. L'affinité de la lécithine pour la tuberculine et pour le *B. tuberculeux* a été étudiée par Calmette, Massol et Guérin et par Lemoine et Gérard.

Lemoine et Gérard, Laroche et Grigault font dépendre le degré de résistance d'un organisme aux agents infectieux à sa richesse, plus ou moins grande en lipoides, ou plus exactement en composés cholestérisés: chez les arthritiques, il y a excès de cholestérine, et hypocholestérisémie chez les tuberculeux, d'où les résultats fa-

vorables obtenus par les deux premiers auteurs de l'emploi des lipoides biliaires, sous le nom de paratoxine, dans le traitement de la tuberculose pulmonaire, observation comparable à celle toute récente de Freymuth; Chauffard, Laroche et Grigault, ont dosé la cholestérine du sang au cours de divers états pathologiques, notant dans les infections aiguës hypocholestérinémie initiale, suivie d'une augmentation notable de ce lipode qui peut atteindre le double du chiffre normal au moment de la défervescence, quand l'organisme domine l'infection. Ces premiers travaux ont suscité de nombreuses observations postérieures, (Hartmann, Peretz, etc.) qui ont nettement confirmé ce rôle important des lipoides dans la défense de l'organisme. L'action des lipoides serait principalement anti-toxique d'où leur augmentation très marquée dans les toxémies et leur abondance particulière dans le tissu lymphoïde, les amygdales, la prostate et même les leucocytes (Wright).

Parmi les travaux récents, nous citerons à part ceux de Cesar Piazza; dans le but d'obtenir un corps doué de propriétés à la fois antitoxiques et antiseptiques, Piazza a préparé sous le nom de phéno-lipoides, toute une série de produits, à l'aide de lipoides organiques de diverses origines (extrait étheré ou alcoolique de jaune d'oeuf, de cerveau, lécithine, cholestérine) en combinaison avec des phénols (acide phénique, guaiacol, naphthol); ces corps, véritables combinaisons chimiques, indissociables en leurs composants d'origine, réuniraient les propriétés anti-toxiques des lipoides à la forte action stérilisante des phénols, non seulement *in vitro*, comme *in vivo*; leur action anti-septique a été vérifiée expérimentalement par F. Aliquó dans la septicémie provoquée par le staphylocoque pyogène doré, par A. Carini avec le micrococque de Bruce, et par G. Antinori avec le diplococque de Fraenkel. Dans la clinique, Piazza, V. Guercio, Bruno Kriss auraient obtenu des résultats très satisfaisants dans les infections grippales avec localisations pulmonaires et A. Noto dans les infections puerpérales. Franco aurait observé expérimentalement un effet curatif et préventif marqué contre la toxine tétanique, mais ses conclusions ont été contestées par Plinio Bardella pour qui les phéno-lipoides seraient dépourvus d'action *in vivo* sur la toxine tétanique. Malgré les critiques sérieuses dont elles sont passibles en différents points, les recherches de Piazza constituent une contribution très importante à l'étude thérapeutique des lipoides.

Poussant plus loin leurs recherches sur ce sujet, quelques auteurs ont recherché dernièrement les relations pouvant exister entre les lipoides et les anti-corps, et si les lipoides, soit par eux mêmes, soit associés aux albuminoides, possèdent une fonction antigénique. H. Much avait déjà vérifié que les lipoides étaient capables de provoquer la formation d'anti corps spécifiques, et qu'il était plus difficile d'obtenir des anticorps avec des lipoides purs ou des albuminoides purs qu'avec un mélange de lipoides et d'albuminoides à poids moléculaire élevé. Les travaux de Kürt Meyer, de Dienes et Schoenheit, de Thiele et Embleton, de Fürth et Aronson, ont montré la possibilité d'obtenir des anti-corps spécifiques en relation aux lipoides du B. tuberculeux, et plus récemment Nègre et Boquet ont, avec des résultats encourageants, appliqué ces lipoides dans le traitement de la tuberculose. Le pouvoir antigénique des lipoides de B. typhi a été étudié par Zurukzoglu, celui des lipoides de B. coli, de staphylococques, de B. typhiques A et B par A. Schachenmeier. Sachs et ses collaborateurs, Klopstock et Weil, dans de récentes et importantes contributions ont élucidé le rôle antigénique des lipoides, montrant la possibilité d'obtenir chez le lapin, par injection d'un mélange de serum et lécithine ou cholestérine, un serum permettant de déceler au moyen des réactions de fixation de complément ou de floculation, jusqu'à 1/100 de milligramme du lipode correspondant, réaction strictement spécifique et plus sensible que les méthodes d'analyse chimique.

Doer et Hallauer ont signalé l'augmentation du pouvoir antigénique de divers antigènes normaux par contact in vitro avec des lipoides rénaux (erythrocytes, serums hétérologues, bactéries non sporulées — résultats négatifs avec des bactéries sporulées) et la possibilité d'obtenir des anti-corps en relation à un mélange de lipoides et d'autres substances normalement dépourvues de pouvoir antigénique (auto-serum, peptone de White). D'après Kizo Yamamoto l'addition de cholestérine aux antigènes favorise la formation d'anticorps.

Käte Frankenthal, recherchant la relation des lipoides avec les autres composants du serum sanguin, a observé que dans le fractionnement des serums de diverses origines, par le sulfate d'ammonium ou l'électrodialyse, les lipoides accompagnent généralement la fraction globulinique, n'ayant rencontré qu'une seule exception avec un serum humain syphilitique. Après ce rapide aperçu sur les travaux d'autres auteurs, qui montre bien l'intérêt

croissant soulevé par les lipoides, dans le monde scientifique, nous allons rapporter nos propres recherches sur le rôle des lipoides dans les phénomènes d'immunité.

Etude expérimentale des lipoides.

Définition et préparation — Quand nous avons voulu définir exactement le terme «lipuide» nous nous sommes trouvés dans un grand embarras; non seulement les différents auteurs qui se sont occupés de ce sujet ne sont pas d'accord sur ce que l'on doit entendre par «lipuide», mais il est même très difficile de trouver une formule verbale permettant la définition précise de substances aussi variables et de propriétés si diverses. Les chimistes, avec Abderalden ne considèrent généralement comme lipoides que des graisses phosphorées, les phosphatides dont la lécithine est le type; mais à côté de ces phosphatides, souvent associées avec eux, existent un grand nombre de substances s'en rapprochant par leurs caractères communs de solubilité et les accompagnant dans les différents procédés d'extraction; les unes sont des alcools, comme la choléstérine, d'autres des corps mal définis comme le protagon, certaines sont combinées à des sucres, comme les cérebrosides ou à des protéides comme les lécitalbumines, sans que l'on puisse déterminer s'il s'agit de simples mélanges ou de combinaisons définies. Les méthodes d'analyse chimique, longues et délicates ne permettent que d'établir une division générale de ces corps dont peu d'entre eux ont pu être individualisés; même ceux qui ont été le mieux étudiés et caractérisés, comme la lecithine offrent des variations si grandes, qu'il faut admettre pour un même lipuide, diverses variétés, possédant suivant leur origine des propriétés différentes, telles les nombreuses lécithines jusqu'ici préparées.

Aussi, d'accord avec Ivar Bang et la plupart des biologistes, nous prendrons le terme «lipoides» dans son acception la plus large, considérant comme tels toutes les substances extraites des liquides organiques ou des organes, solubles dans l'alcool et l'éther sulfurique. Au point de vue pratique pour obtenir toujours le même produit, il est indispensable d'employer toujours la même matière première et de suivre toujours la même méthode d'extraction; le même organe avec le même procédé d'extraction fournit toujours le même lipuide, tandis que les lipoides varient sensiblement d'un organe à l'autre.

Les produits obtenus par les méthodes ordinaires sont extrêmement complexes et impurs, exigeant pour leur purification l'emploi d'une série de dissolutions et d'évaporations successives, dans le but d'éliminer autant que possible les substances étrangères ou inactives.

Propriétés générales des lipoides.

Les lipoides existent en plus ou moins grande quantité dans tous les tissus de l'organisme. Nos premières recherches ont porté naturellement sur les lipoides du milieu sanguin, ou plus exactement du serum normal. Ayant extrait par l'alcool et l'éther, sans leur faire subir de purification, les lipoides du serum normal de boeuf, nous avons réalisé les expériences préliminaires suivantes, expériences fondamentales qui ont servi de base à toutes nos études postérieures; pour ces premières recherches, nous avons utilisé la toxine diphtérique et le venin de cascavel — *Crotalus terrificus* — deux toxines facilement dosables et dynamisables, se prêtant ainsi admirablement à cet essai. Pour la toxine diphtérique, nous avons laissé en contact «in vitro» pendant 24 ou 48 heures, des doses variables de toxine et de lipoïde, injectant ensuite au pigeon ces différents mélanges. Nous avons ainsi vérifié que 100 milligrammes de lipoides neutralisaient nettement 100 minimas mortelles; que 200 milligrammes n'empêchaient pas l'action locale de la toxine, mais évitaient la mort de l'animal, mais que des doses plus fortes de mélange lipoïde et toxine déterminaient la mort d'autant plus rapidement que la dose injectée était plus élevée.

Avec le venin de cascavel, nous avons fait une expérience analogue, laissant en contact pendant trois heures des doses variables de venin avec une dose fixe de lipoïde ne dépassant pas 20 milligrammes, afin de faciliter les injections endoveineuses au pigeon. Nous avons ainsi vérifié que 20 milligrammes de lipoides neutralisent complètement 5 millièmes de milligrammes de venin, dose équivalente à 5 minimas mortelles.

Ces expériences initiales établissent donc de modo certain la propriété des lipoides de fixer en certaines circonstances aussi bien la toxine diphtérique que le venin crotalique; et fait important, cette fixation n'obéit pas à une règle de proportion directe, mais il existe un optima de fixation dans les différents mélanges.

Nous avons ensuite répété ces expériences avec des lipoides extraits du serum normal d'autres espèces animales, obtenant des résultats presque identiques avec ceux du cheval, un peu plus faibles avec ceux du serum normal de porc non purifié par suite de sa teneur élevée en matières grasses étrangères.

Aspect des lipoides du serum. Les lipoides du serum après avoir été raffinés présentent une consistance pâteuse, et une couleur brun jaune; ils sont facilement solubles dans l'éther sulfurique, presque insolubles dans l'alcool absolu, insolubles dans l'eau avec laquelle ils forment des suspensions très fines; ils donnent la réaction de la cholestérine (Grigault Liebermann) et de la lécithine (molybdate d'ammonium); leur rendement est faible, ne dépassant pas 3 grammes par litre.

Lipoides extraits des organes et d'autres produits organiques. Nous avons étendu nos recherches aux lipoides hépatiques, cérébraux, biliaires, et à ceux du lait, extraits par notre procédé et à deux lipoides commerciaux, l'ovo lecithine de Merck et la cholestérine de Kahlbaum et de Merck. Ces deux produits ont été utilisés sans aucun traitement; les autres lipoides ont été purifiés suivant la même technique que les lipoides du serum afin d'éliminer toutes les graisses inactives.

Lipoides hépatiques. — Les lipoides hépatiques raffinés de diverses origines (mammifères ou ophidiens) possèdent des propriétés analogues et se rapprochent beaucoup des lipoides du serum; leur aspect physique est identique, leur coloration seulement plus obscure; ils présentent les mêmes caractères de solubilité, donnent avec une grande intensité la réaction de la lécithine et contiennent près de 5 % de cholestérine. Leur rendement est généralement élevé, de 100 à 300 grammes pour un foie de boeuf.

Lipoides biliaires — Les lipoides biliaires, raffinés, ont l'apparence d'une pâte visqueuse, jaune clair, devenant obscure avec le temps, d'odeur aromatique; très solubles dans l'alcool et l'éther ils s'émulsionnent avec difficulté dans l'eau; très riches en cholestérine dont ils contiennent 50 %, ils sont presque dépourvus de lécithine. Leur rendement est très faible, variant de 400 à 500 milligrammes par litre de bile (de boeuf).

Les lipoides cérébraux se présentent sous l'aspect d'une pâte sèche jaune claire; très solubles dans l'éther,

assez peu dans l'alcool, ils forment avec l'eau des émulsions blanches très fines; ils contiennent une forte proportion de cholestérine, 33 %, et de lécithine.

Tolérance des animaux de laboratoire pour les lipoides. — Les lipoides raffinés ne possèdent pas d'action toxique et les animaux en supportent sans accident par injection sous cutanée ou intramusculaire des doses de plusieurs grammes; non raffinés ils déterminent parfois, au point d'injection, des nodosités se caséfiant par la suite, identiques à celles signalées par Gaehlinger et Tilman. Les injections endoveineuses de lipoides du serum, du foie ou du cerveau sont également bien tolérées, à condition, d'être faites lentement et suffisamment diluées; les injections endoveineuses de lipoides biliaires déterminent presque toujours des embolies mortelles.

Action des lipoides d'origine hépatique.

L'importance fonctionnelle du foie, se traduisant par la répercussion des intoxications et des infections sur cet organe, répercussion accompagnée presque toujours de phénomènes de dégénérescence graisseuse, observée de mode particulièrement constant chez nos animaux immunisés contre les venins et contre les toxines, nous a conduit à nous occuper plus spécialement de l'étude des lipoides hépatiques.

Les premières expériences réalisées avec ces lipoides, extraits par le même procédé employé pour obtenir les lipoides du serum mais sans être raffinés, ne nous ont donné que des résultats médiocres très inférieurs à ceux des lipoides du serum. Mais après l'élimination des graisses étrangères, nous avons obtenu un produit parfaitement comparable, sinon identique, à celui extrait du serum normal, tant par son aspect physico-chimique que par ses propriétés anti-toxiques.

Cette identité d'action, confirmée par de nombreuses expériences, nous autorise à penser que la presque totalité des lipoides existant dans la circulation sont d'origine hépatique; on doit ainsi ajouter aux nombreuses et multiples fonctions du foie, une autre fonction — *la fonction lipoidique* — de grande importance dans la défense de l'organisme contre les intoxications et les infections.

Action des lipoides hépatiques sur les toxines.

Pour établir l'action des lipoides d'origine hépatique sur différentes toxines et venins, nous avons fait varier toutes les conditions expérimentales, étudiant l'action de contact *in vitro*, l'action préventive et l'action curative. Chaque toxine ou venin se comporte de mode caractéristique, mais les faits généraux sont communs à tous.

Neutralisation in vitro — Ces expériences ont été réalisées, en laissant en contact pendant un certain temps des quantités variables de lipoides et de toxine ou venin, et en les injectant ensuite à des animaux sensibles. Les lipoides, en contact avec les toxines ou les venins, en neutralisent l'action toxique; cette neutralisation n'est pas directement proportionnelle au poids de lipoides, ni au temps de contact. Ainsi un poids A de lipoides neutralise après une heure de contact une dose C de toxine diphtérique, mais après 3 heures de contact neutralise seulement 1, 7 C de toxine et 2, 8 C après 6 heures; en fixant le temps de contact, on vérifie de même que dans le même temps A de lipoides neutralise C de toxine, mais 3 A ne neutralisent que 2 C de toxine, 5 A seulement 2, 6 C et 12 A à peine 5 C de toxine.

Certaines toxines et venins sont rapidement neutralisés en proportions relativement élevées; d'autres nécessitent un contact plus prolongé; pour toutes, dans, des conditions expérimentales analogues, existe un poids optima de lipoides particulier à chaque toxine, au dessous duquel la neutralisation est beaucoup moins marquée, tandis que des doses beaucoup plus fortes, ne déterminent qu'une petite augmentation de la dose de toxine neutralisée.

Action curative et préventive. — Injectés séparément quelque temps avant la toxine ou le venin, les lipoides exercent une action préventive très faible et passagère, difficile à mettre en évidence chez les animaux de laboratoire. Cette action ne se traduit généralement que par la survivance plus ou moins grande des animaux traités sur les témoins (toxine diphtérique); avec le venin crotalique, facile à dynamiser, les lipoides injectés préventivement peuvent protéger le pigeon contre l'injection postérieure de deux ou trois minimas mortelles.

Cette action protectrice s'affaiblit rapidement et progressivement à mesure que l'intervalle entre l'injection

endoveineuse des lipoides et l'injection intramusculaire du venin est plus considérable; elle est surtout marquée avec un intervalle d'une heure entre les deux injections; avec un intervalle de trois heures, l'animal présente des symptômes mais se rétablit; avec six heures d'intervalle on n'observe plus qu'une certaine survivance sur les témoins.

L'injection de lipoides faite quelques minutes après celle du venin crotalique peut également sauver l'animal; mais après un plus grand intervalle, elle n'exerce aucune influence sur la marche de l'intoxication.

Action modificatrice des lipoides.

Quand on laisse en contact pendant longtemps, de plusieurs semaines à plusieurs mois, des lipoides et des toxines ou venins, on observe un phénomène, différent de la simple fixation, aboutissant à la complète transformation des toxines ou venins en produits atoxiques, avec la conservation de leur pouvoir immunisant. Cette action modificatrice des lipoides ne peut être confondue avec la simple action fixatrice dont nous avons parlé antérieurement, par ce qu'elle ne se produit que dans des circonstances différentes et des conditions spéciales.

Dans la simple fixation existe un point optima de saturation des lipoides par les venins et les toxines, au delà du quel on n'observe plus de fixation quelque prolongé que soit le temps de contact. Au contraire dans l'action modificatrice une quantité relativement insignifiante de lipoides atténue et transforme lentement et progressivement la substance toxique jusqu'à la complète transformation en toxoïde. L'absence d'eau et des conditions favorables de température sont nécessaires pour observer cette action modificatrice qui aboutit finalement à la formation d'un produit de propriétés différentes de celles des éléments entrant dans sa composition; ainsi les lipoides primitivement très solubles dans l'éther, perdent complètement cette propriété une fois combinés avec les substances toxiques.

Un autre fait nous a conduit à établir une distinction entre l'action fixatrice et l'action modificatrice; certains lipoides d'action fixatrice très marquée peuvent en effet ne posséder que des propriétés modificatrices faibles ou presque nulles.

Action sur les bactéries.

Dans la littérature n'existent que peu de travaux sur l'action des lipoides sur les bactéries, et la plupart d'entre eux se bornent à signaler l'action lytique des lipoides sur différents germes, gonococques, meningococques, staphylococques et B. typhique. Un travail de M. Segale (Pathologica Vol. II. 1910) sur l'action bactéricide des lipoides sur la bactérie charbonneuse mérite une mention spéciale, bien que l'on ne puisse en accepter sans restriction les conclusions: se basant principalement sur le fait de n'avoir pas obtenu la mort d'animaux inoculés avec des cultures de B. anthracis laissées en contact avec des lipoides et de n'avoir pas non plus réussi à cultiver de nouveau sur gélose les germes ainsi traités, Segale conclue que les propres spores charbonneuses sont détruites par les lipoides. Mais l'un et l'autre de ces faits peuvent être observés avec la conservation de la vitalité des spores, comme nous avons eu l'occasion de le constater.

En étudiant l'action des lipoides sur le B. anthracis, nous avons en effet vérifié que ceux ci ne détruisent pas la vitalité des spores, mais modifient simplement la virulence des cultures tout en conservant le pouvoir antigénique. Cette modification de la bactérie charbonneuse est beaucoup plus difficile à obtenir que celle des toxines ou des venins, dépendant entièrement des conditions dans lesquelles sont traitées les cultures et du temps de contact.

Les résultats obtenus avec le B. anthracis — disparition de la virulence, conservation du pouvoir antigénique et transmission héréditaire de ces propriétés — rappellent de très près ceux obtenus par Calmette et ses collaborateurs avec le B. tuberculeux cultivé en milieu bilingue; il est possible que l'atténuation de la vaccine B.C.G. soit due à l'action lente des lipoides biliaires. Les expériences que nous avons entreprises pour vérifier cette hypothèse et étudier l'action modificatrice des lipoides sur les autres germes ne nous permettent pas encore de tirer des conclusions définitives à ce sujet.

Action d'autres lipoides.

Nous avons étudié en plus de l'action des lipoides hépatiques et du serum normal, dont nous venons de par-

ler, celle des lipoides cérébraux, des lipoides biliaires, des lipoides du lait, de l'ovo lécithine de Merck et de la cholestérine de Merck et de Kahlbaun.

L'action fixatrice des lipoides cérébraux sur la toxine tétanique est égale à celle des lipoides hépatiques, mais est très faible ou presque nulle sur les venins ophidiens. Leur action modificatrice est également nulle sur les toxines avec lesquelles nous les avons essayés, et nous n'avons pas réussi à préparer avec ces lipoides les vaccins obtenus avec les lipoides hépatiques.

Les lipoides biliaires ont une action fixatrice beaucoup plus énergique que les lipoides du foie ou du serum, tant en relation aux toxines qu'aux venins. Nous vérifions actuellement leur action modificatrice.

Les lipoides du lait sont complètement inactifs.

L'ovo lécithine de Merck possède un pouvoir fixateur plus élevé que les lipoides hépatiques sur les toxines et les venins; son action modificatrice est faible et incomplète.

Nous n'avons étudié que l'action modificatrice de la cholestérine de Merck ou de Kahlbaum, sans obtenir aucun resultat appréciable; la difficulté de préparer avec cette substance une suspension fine et homogène nous a empêché d'en vérifier l'action fixatrice.

Valeur des lipoides en thérapeutique et immunologie.

La transformation des toxines microbiennes et des venins en substances complètement atoxiques et l'atténuation de la virulence des bactéries sous l'influence modificatrice des lipoides, en même temps que la conservation du pouvoir immunisant des substances toxiques et des germes atténués, établit sur une base sûre l'importance des lipoides en thérapeutique et en immunologie.

Cette action modificatrice des lipoides permet de préparer des vaccins de pouvoir immunisant élevé, protégeant les animaux avec une, deux ou plusieurs injections contre des doses élevées de toxines ou de venins correspondants. Les conditions présidant à la formation de ces vaccins, de même que leurs propriétés sont particulières à chaque substance antigénique. Quelques uns sont obtenus avec la plus grande facilité, d'autres exigent un temps beaucoup plus long.

Quelques uns peuvent avec une seule injection, protéger contre des fortes doses de substances toxiques correspondantes, tandis que d'autres exigent pour produire le même effet deux ou plusieurs injections. Les différentes espèces animales ne réagissent pas non plus de mode uniforme à l'action des différents vaccins. Ainsi le chien, également sensible aux venins crotalique et bothropique, s'immunise beaucoup plus facilement avec le vaccin crotalique qu'avec le vaccin bothropique, tandis que le contraire s'observe avec le lapin. Il y a toujours une relation directe entre la quantité de vaccin reçue et la solidité et la durée de l'immunité acquise. L'immunité nécessite pour s'établir un délai plus ou moins long suivant les vaccins et les animaux en expérience. De mode général, on peut cependant établir comme délai moyen pour l'établissement d'une immunité solide, deux ou trois semaines après la dernière application de vaccin. Nos expériences ne nous autorisent pas actuellement à fixer la durée de cette immunité, qui doit être variable suivant les vaccins et les espèces animales.

Nous pouvons seulement affirmer que des animaux immunisés contre les venins ophidiqes et la toxine diphtérique ont conservé le même degré d'immunité pendant six mois, nous continuons nos vérifications dans le but de déterminer la limite de la durée de cette immunité. Quand la quantité de vaccin est faible, faible est également le degré de l'immunité qui s'atténue sensiblement dès la fin du second mois.

Les vaccins lipoidiques offrent encore un grand intérêt pour l'immunisation rapide et sans danger des animaux producteurs de serums thérapeutiques. Avec l'emploi de vaccins ophidiqes, on peut obtenir des serums actifs en moins de deux mois, alors que par les méthodes ordinairement employées quatre mois au minimum sont nécessaires.

Les propriétés immunisantes de ces vaccins sont très stables, et n'ont pas été altérées après un an de permanence à l'action de la lumière et à la température du laboratoire.

Les lipoides extraits des serums anti-toxiques ne sont pas plus actifs que ceux du serum normal; la richesse lipoidique du serum des animaux immunisés est près d' $1/4$ à $1/2$ supérieure à la normale, montrant ainsi la valeur des lipoides dans la défense de l'organisme.

Vaccins lipidiques.

Vaccin crotalique. — Comme nous l'avons déjà dit, les lipoides d'origine hépatique et ceux du serum normal fixent de mode appréciable le venin crotalique, par contact in vitro; leur action prolongée dans des conditions spéciales et favorables, modifie progressivement le venin jusqu'à le transformer en un produit atoxique, doué cependant de valeur immunisante très élevée. Avec une seule injection de vaccin ainsi préparé on peut protéger sûrement le cheval contre l'injection de 1/2 goutte de venin frais de crotale, dose capable de tuer sept lapins, et de mode incomplet contre une goutte du même venin, les animaux se rétablissant généralement après avoir présenté des symptômes accusés. Toutes les espèces animales sont faciles à immuniser avec ce vaccin; nous avons pu vacciner le chien, le mouton, le cheval, le mulet, le lapin, et le cobaie. Après trois injections, le serum d'un mouton neutralisait 0,1 de milligramme de venin crotalique par c.c., dose équivalente à 100 minimas mortelles pour le pigeon, et le mouton ainsi immunisé résistait à l'injection de trois gouttes de venin frais.

Nous avons employé, avec plein succès, le vaccin crotalique pour immuniser les animaux producteurs de serum anti-crotalique, soit en utilisant exclusivement le vaccin, soit en commençant l'immunisation avec le vaccin et en la continuant ensuite avec le venin pur. En suivant l'un ou l'autre de ces procédés, nous avons obtenu des serums actifs en 4 à 6 semaines.

Par application répétée de vaccin sur la peau scarifiée nous avons pu immuniser solidement le lapin et le chien.

Vaccin bothropique. — Préparé avec le venin de *Lachesis lanceolatus*).

Le venin de *Lachesis lanceolatus*, comme tous les venins du même genre, diffère essentiellement de celui de *Crotalus terrificus*; il détermine la mort rapide des petits animaux, même avec des doses voisines de la minima mortelle, par coagulation intravasculaire. Les animaux plus volumineux, à moins d'employer la voie veineuse, succombent avec une survivance de quelques heures dans une seconde phase d'incoagulabilité sanguine en présentant des hémorragies généralisées provoquées par l'action protéolytique intense de ce venin.

La fixation de ce venin par les lipoides est moins accentuée que celle du venin crotalique, par suite de la

difficulté de fixer les coagulines, et un délai minimum de six heures est nécessaire pour neutraliser deux minimas mortelles par voie veineuse pour le pigeon; dans les mêmes conditions, une minima mortelle par voie intramusculaire n'est pas complètement neutralisée, l'animal succombant avec une certaine survivance sur le témoin. Les doses relativement élevées de ce venin nécessaires pour obtenir la mort expliquent cette différence apparente entre le venin bothropique et le venin crotalique; mais en considérant non pas le nombre de minimas mortelles mais le poids brut de venin, on vérifie au contraire que le venin bothropique est fixé en proportion un peu plus élevée que le venin de crotale.

La transformation du venin bothropique en vaccin est deux ou trois fois plus rapide que celle du venin crotalique. L'action immunisante de ce vaccin est très énergique pour le lapin et le cobaie; une seule injection protège ces animaux après plusieurs semaines contre une goutte de venin pur et des lapins ayant reçu deux injections de vaccin résistent parfaitement à deux gouttes de venin. Chez tous les animaux d'expérience, nous avons vérifié que l'action nécosante locale est très atténuée, mais non entièrement abolie. Le mouton, le cheval, et le chien s'immunisent avec une certaine difficulté, exigeant un plus grand nombre d'injections et un certain délai, non inférieur à un mois pour que l'immunité s'établisse de mode certain.

En employant le vaccin bothropique, nous avons également réussi à obtenir en quelques semaines chez nos chevaux d'immunisation un serum anti-bothropique suffisamment actif.

Vaccin préparé avec le venin de Vipera Russellii. (Daboia)

Possédant une certaine quantité de venin de Vipera Russellii, nous avons jugé intéressant de vérifier l'action des lipoides sur le venin de cette espèce indienne, qui représente un type d'ophidiens différent de nos espèces indigènes, celui des Viperinae; les résultats que nous avons obtenus avec ce venin doivent logiquement pouvoir s'appliquer à celui des autres viperinae voisines.

Un contact de 6 heures est nécessaire pour neutraliser deux minimas mortelles par voie veineuse pour le pigeon; une minima mortelle par voie intramusculaire est neutralisée après une heure de contact. La transformation

du venin de Daboia en vaccin se fait avec la même facilité que celle du venin bothropique. L'immunité conférée par ce vaccin est également solide et aussi facile à obtenir.

Vaccin préparé avec le venin de Naja tripudians.

— L'étude de l'action des lipoides sur le venin de Naja est particulièrement intéressante, non seulement par ce qu'il s'agit d'une espèce appartenant à un groupe d'ophidiens très différents de ceux que nous avons étudiés jusqu'ici, celui des Colubridae, mais encore à cause des propriétés activantes souvent signalées de la lécithine sur ce venin — formation de Kobra-lecithid de Kyes-Sachs — et de l'action antagoniste de la cholestérine. Les lipoides hépatiques contenant entre autres éléments une proportion notable de ces deux substances pouvaient agir dans un sens ou dans l'autre sur les propriétés hémolytiques de ces venins, et leur action se répercuter sur la toxicité. Pour avoir une idée exacte de l'action probablement complexe des lipoides hépatiques sur ce venin de Naja, nous avons étudié en même temps l'action de l'ovo lécithine de Merck et des lipoides biliaires (au lieu de cholestérine pure, difficile à injecter) très riches en cholestérine et dépourvus de lécithine (réaction du molybdate d'ammonium négative).

Les premières expériences sur le pouvoir fixateur furent faites sur le pigeon; aussi bien par voie veineuse que par voie intramusculaire, les lipoides hépatiques, avec des doses neutralisant habituellement les autres venins étudiés, activent au contraire notablement le venin de Naja, les animaux succombant à des doses inférieures à la minima mortelle pour les témoins. Cette action activante est presque aussi marquée que celle de l'ovo lécithine de Merck. Les lipoides biliaires neutralisent au contraire après une heure de contact une minima mortelle par voie veineuse. Afin de vérifier l'action des doses élevées de lipoides, nous avons repris ces expériences avec le lapin, vérifiant que des doses très élevées de lipoides neutralisent l'action toxique du venin de Naja, tandis que des doses faibles l'activent; il existe une dose activante maxima au dessus de laquelle cette action s'affaiblit progressivement jusqu'à ce que domine l'action neutralisante. Nous poursuivons actuellement nos expériences en vue d'obtenir la neutralisation complète, afin de vérifier ensuite les propriétés immunisantes de ce vaccin modifié.

Vaccins arachnidiques

Nous avons étudié l'action des lipoides hépatiques sur les venins de deux espèces d'araignées, celui de *Lycosa raptoria*, d'action nécrosante locale, et celui de *Ctenus nigriventer*, d'action neuro-toxique et sur le venin d'une espèce de scorpion, le *Tityus bahiensis*. Par suite de la difficulté d'obtenir de grandes quantités de ces venins, nous nous sommes limités à étudier leur modification et leur transformation en vaccins sous l'influence des lipoides. Le venin de la *Lycosa raptoria* est rapidement atténué; au contraire de ce qui s'observe avec les venins ophidiens, il perd son action nécrosante, ne produisant plus ses effets locaux caractéristiques sur le derme.

Les venins de *Ctenus* et de *Tityus* sont un peu plus lentement modifiés. Le pouvoir antigénique de ces trois venins se conserve intégralement et nous avons pu, en employant les respectifs vaccins, raccourcir notablement la durée de l'immunisation des animaux producteurs de serums anti-arachnidiques. Le vaccin lycosique rend surtout de grands services, permettant d'injecter en peu de temps de fortes doses de venin sans le danger des ulcérations, difficiles à éviter quand on emploie le venin pur, et qui retardent l'immunisation.

Venin de Bufo marinus. (crapaud).

Au contraire de ce qui s'observe avec tous les venins jusqu'ici étudiés, les lipoides n'exercent aucune influence sur le venin de crapaud (*Bufo marinus*) dont les propriétés toxiques ne sont ni atténuées, ni activées, confirmant ainsi les profondes différences, déjà signalées, existant entre ce venin et ceux des ophidiens ou des arachnides. Les serpents recevant par voie gastrique une minima mortelle de ce venin, laissé en contact prolongé avec une forte dose de lipoides, succombent en même temps que les témoins ou avec une survivance insignifiante, due à l'absorption un peu plus lente du venin.

Vaccin diphtérique. — Le pouvoir fixateur des lipoides sur la toxine diphtérique est élevé et croît rapidement avec le temps. Il existe une dose optima de lipoides capable de fixer en un temps donné un certain nombre de minimas mortelles de cette toxine. Cette neutralisation est beaucoup moins accusée avec une quantité plus faible de lipoides tandis qu'une dose un peu supé-

rieure n'augmente pas l'action fixatrice; mais en exagérant la proportion des lipoides en relation à la toxine, nous avons observé un fait paradoxal, la diminution notable du pouvoir fixateur. Nous n'avons jamais observé l'activation de la toxine diphtérique signalée par quelques auteurs, Laroche et Grigault, de Waele, Dold et Ungermann.

L'action préventive des lipoides contre cette toxine par injection sous cutanée au cobaye et endoveineuse au pigeon est faible, se traduisant seulement par une certaine survivance sur les témoins.

La transformation complète de la toxine diphtérique en vaccin est longue; quand cette transformation est incomplète ou défectueuse, les animaux la recevant peuvent ne pas présenter de symptômes immédiats, mais succombent de 15 à 20 jours après la vaccination; quand, au contraire le vaccin est bien préparé, la tolérance est parfaite et deux ou trois injections suffisent pour protéger le cobaye pendant plusieurs mois contre des doses plusieurs fois mortelles de toxine.

Vaccin tétanique. — L'action des lipoides sur la toxine tétanique est particulièrement intéressante à étudier, à cause des travaux suscités par l'expérience classique de Wassermann, interprétée par la plupart des auteurs, entre autres Landsteiner, Loewe et Takaki par une action fixatrice des lipoides cérébraux sur la toxine tétanique; Marie et Tiffenau, Laroche et Grigault attribuent cependant aux protéides le rôle principal dans cette réaction.

Ces différents travaux nous ont conduit à étudier comparativement l'action des lipoides hépatiques et cérébraux sur cette toxine. Les lipoides hépatiques possèdent sur la toxine tétanique une action fixatrice plus faible que sur la toxine diphtérique, ne neutralisant après un contact de plusieurs heures que une ou deux minimas mortelles pour le cobaye. De même que pour la toxine diphtérique, il existe une proportion optima de lipoides, capable de neutraliser, en un temps déterminé une dose maxima de toxine, tandis que des proportions inférieures ou supérieures de lipoides se montrent moins actives. Les lipoides du cerveau nous ont donné des résultats sensiblement identiques à ceux du foie.

Nous avons obtenu la transformation rapide de la toxine tétanique en vaccin, réussissant à protéger avec

trois injections le cobaie contre plusieurs doses mortelles de toxine.

Vaccin dysentérique. L'action des lipoides sur la toxine dysentérique (Shiga) est beaucoup plus lente que sur les autres toxines étudiées jusqu'ici. L'action fixatrice est peu accentuée; la modification de la toxine est lente mais complète, exigeant seulement un contact assez prolongé, d'au moins quatre mois. Les propriétés immunisantes de ce vaccin sont très accentuées; une seule injection protège le lapin contre des doses plusieurs fois mortelles de toxine, tuant les animaux témoins en 24 heures. L'immunité s'établit 15 jours après l'injection de ce vaccin. Comme pour tous les vaccins, il y a une étroite relation entre la quantité de vaccin injectée et la solidité et la durée de l'immunité acquise.

Vaccin charbonneux. — Les lipoides hépatiques ne possèdent aucune action bactéricide sur le *B. anthracis*. Après un contact très prolongé les germes conservent toutes leurs propriétés culturales, se développant abondamment, quand ils sont de nouveau semés. Si la vitalité de la bactérie est conservée, sa virulence est au contraire profondément modifiée, s'atténuant progressivement jusqu'à disparaître après un temps plus ou moins long. Des animaux très sensibles comme le cobaie, peuvent recevoir des doses considérables sans présenter de signes d'infection. Cette atténuation de la virulence fixée par les spores se reproduit dans les cultures postérieures.

L'injection, deux ou trois fois répétée, de *B. anthracis*, devenus avirulents par contact prolongé avec les lipoides, protège le lapin contre l'inoculation de culture très virulente. La durée de l'immunité et la quantité de vaccin nécessaire pour protéger des animaux de plus grande taille n'ont pas encore été déterminées; mais les résultats obtenus montrent que les lipoides agissent sur la bactérie charbonneuse, de même manière que sur les toxines, permettant d'obtenir par le même procédé un vaccin actif.

Avec le vaccin ainsi préparé, nous avons également réussi à immuniser, le lapin par scarifications cutanées.

Conclusions

Résumant tout ce que nous avons dit, et appuyés sur une abondante documentation expérimentale qui sera publiée prochainement, nous pouvons conclure :

1.º) que les lipoides extraits du serum normal et du foie, après purification, possèdent les mêmes propriétés et agissent de même mode sur les toxines microbiennes, les venins et les bactéries, fixant et modifiant les premiers, atténuant la virulence des dernières.

2.º) que l'identité d'action des lipoides circulants et de ceux d'origine hépatique, montre une importante fonction du foie dans la défense de l'organisme contre les intoxications et les infections, au moyen de sa production de lipoides.

3.º) que dans l'action des lipoides sur les toxines et les venins, il faut distinguer deux phases: *celle de fixation*, dans laquelle les substances sont fixées par les lipoides, et *celle de modification* dans laquelle les lipoides les transforment complètement en produits atoxiques, doués de propriétés immunisantes.

4.º) que cette action modificatrice des lipoides permet d'établir une méthode générale de préparation de vaccins d'origine toxique, extrêmement féconde en pratique.

5.º) que l'action des lipoides sur la bactériodie charbonneuse, dont ils modifient profondément la virulence, permet de préparer un vaccin contre ce germe et autorise l'application de cette méthode à la préparation d'autres vaccins microbiens.



