

Étude de l'immunisation expérimentale du lapin par *Cladosporium trichoides*, Emmons 1952 (Champignon dématié)

par l'utilisation de méthodes de précipitation en gélose
(Ouchterlony et immuno-électrophorèse)

par A. AGBAVOH * et B. RAULT

[Laboratoire de Parasitologie et Zoologie appliquée (Professeur J.-M. DOBY)
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie F 35 - Rennes]

Résumé

Les auteurs, en utilisant les méthodes de précipitation en gélose (Ouchterlony et immuno-électrophorèse), ont pu obtenir, avec le sérum de lapins immunisés selon la méthode de Freund, des électrophorégrammes révélant jusqu'à 13 fractions d'anticorps lorsque ce sérum est opposé aux antigènes correspondant à l'agent d'immunisation.

L'évolution dans le temps du degré d'immunisation, révélé par le nombre d'arcs sur les immuno-électrophorégrammes successifs, a pu ainsi être précisée.

Par ailleurs, les auteurs ont pu comparer les réactions immunologiques chez le lapin respectivement immunisé artificiellement avec diverses formes d'antigènes et inoculé avec le germe vivant.

Summary

The authors, using double diffusion in agar gel (Ouchterlony and immuno-electrophoretic methods), obtained electrophoregrams showing up to 13 precipitating fractions between sera of rabbits immunized by Freund technic and homologous antigen prepared from *Cladosporium trichoides* strains.

Evolution of immunisation degree in the time was like this stated precisely, according to the number of precipitins gradually appearing in the sera of these rabbits.

In an other way, the authors made a comparison between artificial immunization by antigen injections and immunization by living germ inoculation.

* A titre posthume.

En 1911, à Florence, Banti découvrit ce qui semble être le premier cas de cladosporiose cérébrale. L'agent de cette mycose fut dénommé *Torula bantiana* par Saccardo en 1912. Par la suite, un certain nombre d'autres cas de mycoses du système nerveux central de l'homme, dont plusieurs avec isolement d'un champignon identique ou très proche du germe précité, fut signalé. A la suite du cas observé par Bindford et coll. en 1952, le germe isolé fut décrit en détail par Emmons qui le situa dans le genre *Cladosporium* sous le nom de *Cladosporium trichoïdes*.

Actuellement, on connaît environ 25 cas de cladosporiose cérébrale humaine répartis dans le monde entier. A quelques très rares exceptions près, c'est sous la nouvelle dénomination de *Cladosporium trichoïdes* que les germes en cause, observés sur coupes et parfois isolés, ont été placés.

La pauvreté morphologique de ces germes, qui ont été bien souvent malheureusement étudiés sur les seules coupes anatomo-pathologiques, fait qu'un doute peut naître quant à leur identité spécifique réelle. Ce doute peut persister même quand les germes ont pu être isolés des tissus et être étudiés d'une façon plus précise en cultures, car leur morphologie, alors à peine plus riche que sur coupes, ne présente aucun caractère de valeur vraiment spécifique.

Un autre problème se pose. En effet, d'autres espèces appartenant au même genre *Cladosporium*, à la morphologie également très pauvre, *Cladosporium carrionii* Tréjos 1954 et *Cladosporium wernecki* Parreiras-Horta 1921 par exemple, ont été isolées de mycoses superficielles ou parfois profondes, mais de tissus autres que nerveux.

Ces germes isolés des tissus nerveux d'une part, des tissus non nerveux d'autre part, morphologiquement très proches, sinon identiques, appartiennent-ils à une seule et même espèce ayant évolué biologiquement différemment ou bien y a-t-il plusieurs germes avec relations constantes entre l'espèce et le tropisme pour un tissu donné ?

A la suite de l'observation, en 1961, d'un nouveau cas dans l'Ouest de la France avec isolement de la souche en cause (Doby-Dubois et coll., 1962), nous avons pensé que l'étude de la structure antigénique par les méthodes si analytiques de la double diffusion en gélose (Ouchterlony et immuno-électrophorèse) nous permettrait peut-être de savoir d'une part si tous les germes isolés de l'encéphale appartenaient à une seule et même espèce de *Cladosporium*, d'autre part si les souches neurotropes et non neurotropes étaient bien spécifiquement différentes.

Ces méthodes ont en effet déjà permis d'élucider de nombreux problèmes de ce genre (1).

Il était par ailleurs intéressant de rechercher si des réactions immunologiques pouvaient être valablement mises au point permettant un diagnostic précoce de ce groupe d'affections très graves, dont l'étiologie le plus souvent ne se révèle malheureusement que *post-mortem*.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à l'étude de l'immunisation

(1) Notamment entre les mains de l'équipe du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Lille, du Professeur J. Biguet, que nous tenons à remercier ici pour l'aide et les conseils qu'il nous a prodigués à l'occasion de ce travail.

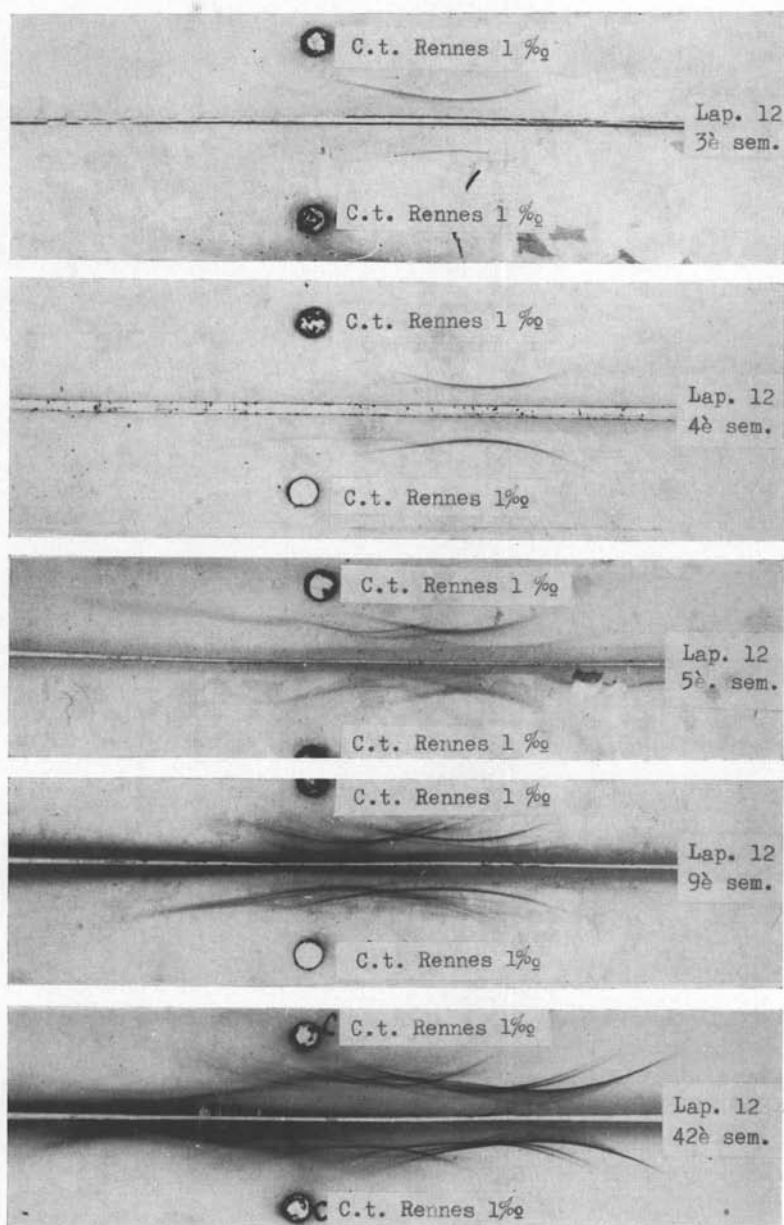


FIG. 1. — Ordre d'apparition des arcs en fonction du temps chez le lapin n° 17 (anti-*Cladosporium trichoides* souche Rennes antigène 1 %))

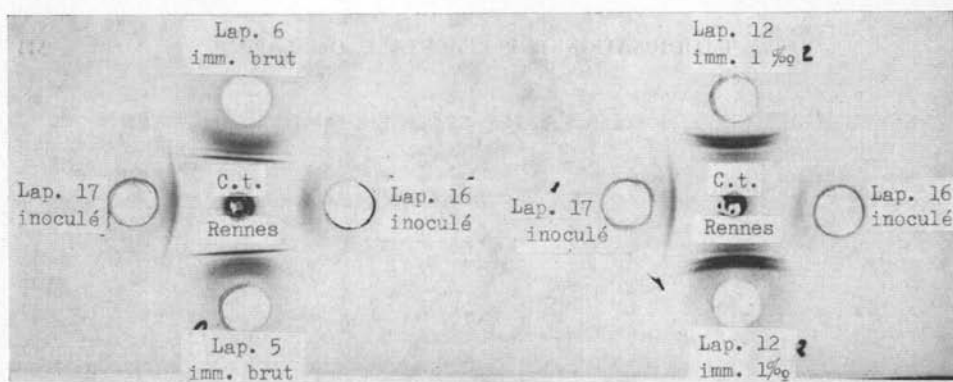


FIG. 2

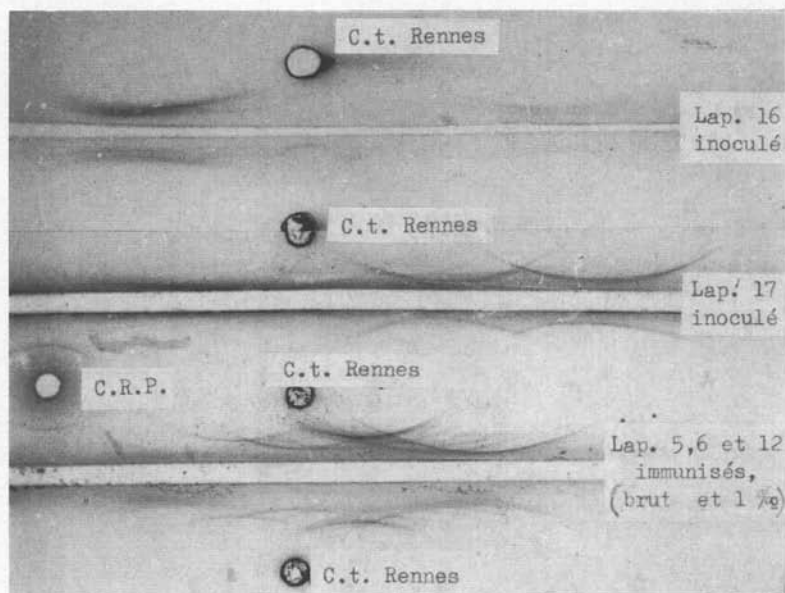


FIG. 3

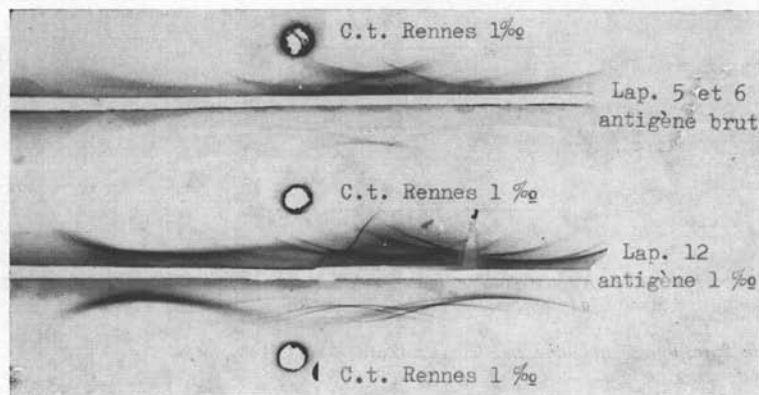


FIG. 4

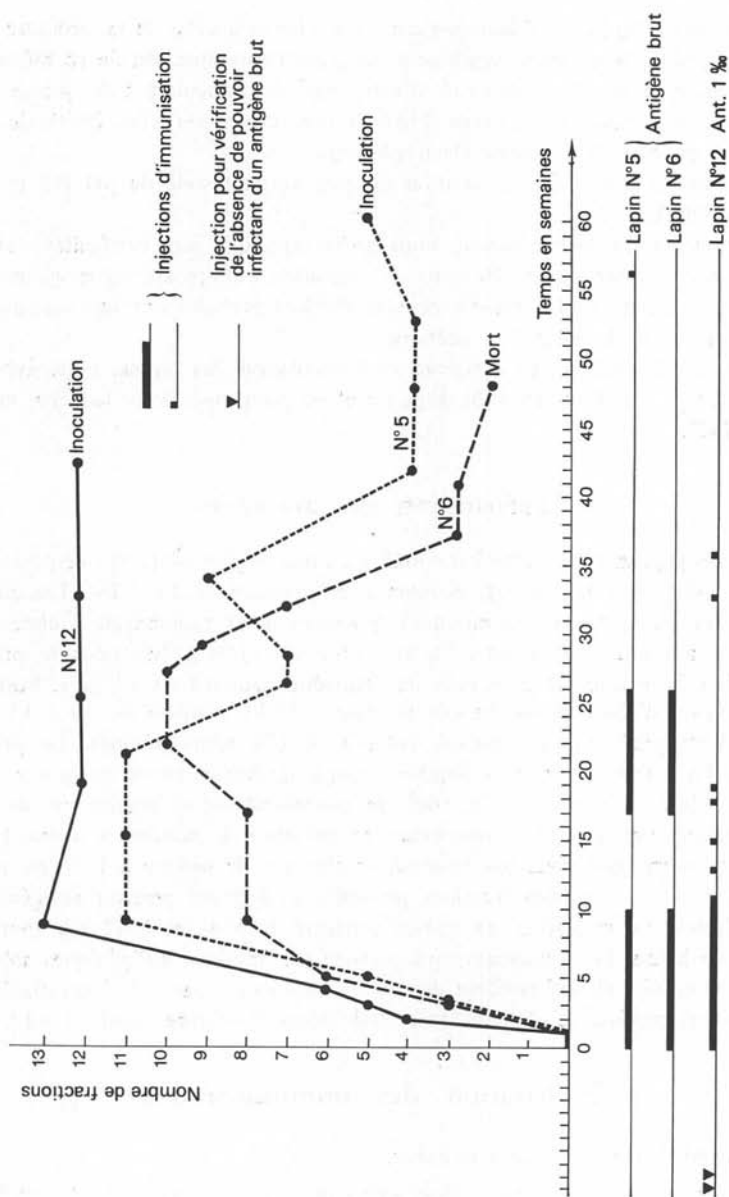


FIG. 2 et 3. — Réactions de double diffusion comparées entre lapins immunisés avec antigène et lapins inoculés avec *Cladosporium trichoides*

FIG. 4. — Comparaison des diagrammes immuno-électrophorétiques entre un lapin anti-antigène brut et un lapin anti-antigène 1 % (au maximum de leur immunisation)

expérimentale du lapin par *Cladosporium trichoïdes* et à celle de la structure antigénique de ce germe. Nous avons également comparé l'immunisation de ce même animal, obtenue par injection d'antigène tué, d'autre part par inoculation du germe vivant.

Nous avons utilisé la méthode d'Ouchterlony et ses variantes (méthode d'Abelev et Svetkov) et celle de l'immuno-électrophorèse.

Nous avons employé une solution tampon véronal sodé de pH 8,2 et de force ionique 0,1 m.A.

Pour l'immuno-électrophorèse, nous avons appliqué aux extrémités des plaques une différence de potentiel de 20 volts, la migration s'effectuant en moyenne pendant 5 heures. Les lames, après lavages, ont été révélées par une solution aqueuse de vert de Lissamine à 1 % en milieu acétique.

Pour la préparation des antigènes et l'inoculation des lapins, nous avons utilisé la souche isolée à Rennes en 1961 à partir d'une pièce opératoire (souche, notre référence R. 145).

Préparation des antigènes

Le champignon a été cultivé sur milieu liquide et glucosé (2 %) et peptoné (1 %) de Sabouraud-Langeron pendant un mois à température de 24 à 26°. Les cultures de *C. trichoïdes*, relativement thermophiles, poussent assez rapidement à cette température. Elles sont filtrées et lavées. Le mycélium est alors utilisé pour la préparation de l'antigène dit « brut » et pour celle de l'antigène standard dit « 1 ‰ ». Pour cela, le champignon est d'abord broyé en eau distillée, à froid, pendant de 10 à 15 minutes, avec un homogénéiseur à couteaux rotatifs (40.000 tours/minute). Le produit est lyophilisé. La poudre grise ainsi obtenue, broyat de mycélium et de spores, constitue l'antigène « brut ». Reprise au mortier de porcelaine, cette poudre est de nouveau broyée énergiquement pendant une heure en présence de poudre de verre. Le broyat est remis en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 1 ‰, ce qui amène la solubilisation de certaines fractions protéidiques à grand pouvoir antigénique.

Le liquide est centrifugé en milieu réfrigéré à + 4° et à 12.000 tours/minute pendant une heure. Le surnageant, qui contient les fractions antigéniques solubles, est séparé et est ensuite dialysé pendant de deux à trois jours contre de l'eau distillée changée à plusieurs reprises. L'adialysat, lyophilisé, donne l'antigène standard « 1 ‰ ».

Préparation des immuns-sérums

a) Immunisation par injections d'antigène.

Pour ce travail, préliminaire, trois lapins ont été immunisés : deux avec l'antigène brut, et un avec l'antigène 1 ‰ (respectivement lapins n° 5 et 6 de notre expérimentation et lapin n° 12).

Le procédé utilisé pour l'immunisation de ces trois lapins a été celui préconisé par Freund (1937), avec adjuvants immunologiques : lanoline, bacilles de Koch tués

et huile de paraffine. Pour la préparation de notre solution injectable d'antigène, nous avons adopté la méthode préconisée par Biguet et coll. depuis 1959 :

— 10 mg d'antigène sont dissous dans quelques gouttes d'eau distillée stérile dans un petit mortier de porcelaine. Cette solution est absorbée par de la lanoline pure stérile. On émulsionne ensuite dans une quantité suffisante d'huile de paraffine pure stérile. Pour la première injection immunisante (et pour celle-là seulement), on ajoute deux à trois gouttes d'une suspension de B.C.G. tués par ébullition à 100° pendant une heure (utilisation d'ampoules périmées de B.C.G. de l'Institut Pasteur). 2 ml de cette solution sont injectés à chaque lapin chaque semaine en sous-cutané au niveau du dos et des flancs. Les réactions immunologiques de ces lapins sont suivies de semaine en semaine sur le sang prélevé par aspiration au niveau de la veine marginale de l'oreille.

Résultats.

1° LAPINS N° 5 ET 6 IMMUNISÉS AVEC L'ANTIGÈNE BRUT.

Chacun de ces lapins a subi deux séries d'injections, l'une de la première à la dixième semaine, l'autre de la dix-septième à la vingt-cinquième semaine (cf. graphique).

Une semaine après la première injection, aucun anticorps n'était encore révéla- ble par les méthodes précitées dans le sérum de ces deux lapins. Les premiers anticorps apparurent à la fin de la troisième semaine, se révélant sous la forme de trois arcs en position anodique.

Le nombre des fractions objectivables continua à s'élever rapidement, dépassant la dizaine huit semaines après la première immunisation.

Si l'on réunit d'ailleurs les sérums correspondant à plusieurs prélèvements étalés dans le temps, il est alors même possible, dans certaines conditions favorables, d'atteindre le nombre maximal de 13. Ce maximum semble d'ailleurs atteint dès la dixième semaine.

La reprise des injections d'immunisation de la dix-septième à la vingt-sixième semaine ne se traduisit pas par une augmentation du nombre des fractions objectivées. Au contraire même, le nombre de celles-ci commença à diminuer irrégulièrement avant même la fin de cette seconde série pour revenir, aux environs de la quarantième semaine, à de trois à quatre. Le lapin n° 6 mourut spontanément aux environs de la cinquantième semaine ; il ne présentait alors plus dans son sérum que deux fractions objectivables. Le lapin n° 5, dont le nombre de fractions d'anticorps se maintint à quatre jusqu'à la cinquante-troisième semaine, reçut alors une injection unique supplémentaire la cinquante-sixième semaine. L'action de ce « rappel » ne fut pas suivie immunologiquement, l'animal ayant été inoculé avec le germe vivant en vue d'une autre expérimentation à la soixantième semaine.

2° LAPIN N° 12 IMMUNISÉ AVEC L'ANTIGÈNE 1 ‰

Ce lapin avait subi une dizaine de semaines avant le début de cette série deux injections consécutives de 5 mg d'antigène brut, sans adjuvant aucun, simplement en

suspension dans du sérum physiologique, ce qui avait eu pour but de savoir si le germe pouvait rester infectant après sa transformation en antigène. Ces deux injections furent immunologiquement sans résultat, aucune fraction d'anticorps n'ayant pu être mise en évidence dans la dizaine de semaines qui suivit.

Ce lapin fut donc alors soumis à une série d'injections avec antigène standard 1 %, avec adjuvants, pendant onze semaines consécutives. Par la suite, il subit quelques injections isolées (quatre de la treizième à la dix-neuvième semaine et deux de la trente-troisième à la trente-sixième semaine).

Comme pour les deux lapins précités, un délai de deux semaines fut nécessaire pour l'objectivation des premières fractions.

Bien qu'il soit difficile de juger sur les réactions d'un seul animal, il est possible que les deux injections d'antigène seul antérieures à cette série aient été à l'origine d'une certaine sensibilisation, bien que n'ayant pas été suivies d'effets immunitaires. En effet, le nombre des fractions d'anticorps révélées s'éleva plus vite chez ce lapin que chez les deux autres, atteignant le chiffre de treize dès la huitième semaine et se maintenant par la suite à un chiffre sensiblement constant, jusqu'à la quarante-troisième semaine, moment où cet animal fut alors inoculé par voie intra-veineuse avec une suspension de cultures pour une autre expérimentation.

Il est possible également, compte tenu du caractère souvent très différent de la réaction immunitaire d'un animal à un autre, qu'il s'agisse là d'une réaction purement individuelle.

b) Immunisation par inoculation expérimentale du germe vivant et comparaison des résultats obtenus par immunisation avec antigène.

L'immunisation par la technique de Freund, si elle permet l'apparition rapide et en nombre élevé des différentes fractions d'anticorps, est une technique toutefois très artificielle. Nous avons donc recherché s'il existait un certain parallélisme entre l'immunisation ainsi obtenue et celle résultant de l'inoculation de germes vivants.

Deux lapins (n° 16 et 17) ont donc été inoculés par voie intra-veineuse avec quelques mg de cultures sporuleuses de la souche de Rennes.

Le lapin n° 16 est mort 128 jours après l'inoculation. La dissection a permis de trouver dans le mésentère de petits kystes parasitaires ainsi que plusieurs abcès au niveau du cerveau. L'examen direct du pus prélevé a révélé la présence d'éléments mycéliens. La rétroculture à partir de fragments de cerveau a permis d'isoler le champignon à l'état pur.

Le lapin n° 17 est mort au bout de 148 jours. Ici aussi, les cultures ont permis l'isolement du germe à partir du cœur et du poumon notamment.

Ces deux lapins furent immunologiquement suivis par prises de sang régulières. Les premières fractions ont été révélées au bout de dix à quinze jours. En tout, de six à sept arcs ont pu être mis en évidence chez le lapin n° 16, de huit à neuf chez le lapin n° 17.

Dans le sérum du lapin n° 16, nous avons remarqué très tôt l'apparition d'une fraction cathodique très épaisse faite de trois à quatre arcs parallèles. Cet ensemble de

fractions n'a pas été retrouvé chez le lapin n° 17, chez qui les autres arcs sont par contre mieux dessinés et plus nombreux.

Il ne semble donc pas que ce soient entièrement les mêmes fractions d'anticorps qui soient apparues chez les deux lapins. En effet, la position est différente d'une part ; d'autre part, lorsque nous avons réuni leurs sérums et opposé ce mélange à un antigène de *Cladosporium trichoïdes*, nous avons alors obtenu onze arcs.

Il est difficile de conclure sur un aussi petit nombre d'animaux inoculés, les variations individuelles dans les réactions immunologiques se manifestant d'ailleurs particulièrement dans le comportement de ces deux animaux.

Si on compare les immuno-électrophorégrammes de ces lapins à ceux des lapins précités immunisés artificiellement, selon la technique de Freund, avec la même souche de *C. trichoïdes* de Rennes, on constate que la fraction cathodique trouvée chez le lapin n° 16 se retrouve chez les lapins artificiellement immunisés, mais seulement au bout de plusieurs mois d'immunisation.

Nous avons par ailleurs constaté qu'il existe, chez les lapins inoculés, une fraction anodique rapide qui semble ne pas avoir d'équivalent chez les lapins immunisés.

L'immunisation artificielle permet par contre de faire apparaître des fractions plus nombreuses que par l'inoculation.

À côté de ces différentes fractions, en a été révélée une, aspécifique, de type substance X ou anti-C, distincte de la substance C, puisque l'arc de précipitation obtenu est insoluble dans une solution de citrate de sodium à 5 %.

Bibliographie

- BANTI (G.), 1911. — Sopra un caso di oidiomiocosi cerebrale. *Atti Acc. Med. Fis. Fiorentina*, 49, in Borelli, 1960.
- BIGUET (J.), HAVEZ (R.) et TRAN VAN KY (P.), 1959. — Les possibilités d'application aux champignons de la méthode d'Ouchterlony et de l'immunoélectrophorèse. *C.R. Acad. Sc.*, 249, 895.
- , —, —, 1959. — Les possibilités d'application aux champignons pathogènes de la méthode d'Ouchterlony et de l'immunoélectrophorèse. Résultats encourageants d'une première tentative concernant l'étude de *Candida albicans*. *Mykosen*, 2, 115.
- BINDFORD (C. H.), THOMPSON (R. K.) et GORHAM (M. E.), 1952. — Mycotic brain abscess due to *Cladosporium trichoïdes*, a new species. Report of a case, with mycologic report by Emmons (C. W.). *Amer. J. Clin. Path.*, 22, 535.
- BORELLI (D.), 1960. — *Torula bantiana* agente di un granuloma cerebrale. *Rev. di Anat. Patol. e Oncol.*, 17, 615.
- DOBY-DUBOIS (M.), CHEVREL (M.-L.), DOBY (J. M.) et ROBERT (Y.), 1962. — Abscès mycosique cérébral humain par *Cladosporium trichoïdes*. *Ann. de Parasit. Hum. et Comp.*, 37, 644.
- EMMONS (C. W.). — Cf. BINDFORD (C. H.) et coll., 1952.
- FREUND (J.), CASALS (J.) et HOSMER (E. P.), 1963. — *Proc. Soc. Exper. et Med. Biol.*, 1937, 37, 509, in Halpern.
- HALPERN (B.), 1963. — *L'antigénicité*. Collection Inst. Pasteur, Paris.
- SACCARDO (P. A.), 1912. — *Torula fungine Bantiana*. *Ann. Mycol.*, 12, 320.