

Institut de Médecine Légale et Sociale de l'Université, Lille, Boulevard Painlevé.

Une nouvelle méthode de lecture de la réaction précipitante en Médecine Légale*.

De

Professeur M. MULLER (Lille).

Depuis 1946, nous expérimentons, dans mon Institut, une nouvelle méthode de lecture de la réaction précipitante qui nous a donné des résultats que nous considérons comme des plus intéressants.

Pour la préparation de nos anti-sérums nous avons donné la préférence à la technique de Dalla Volta qui consiste à injecter dans le péritoine du lapin une suspension de globulines obtenue par précipitation chimique au sulfate d'ammonium et à l'acide acétique. Cet antigène ainsi préparé peut se conserver longtemps sous une couche de toluol. Pour l'usage nous injectons 1 gr d'antigène réduit en poudre et émulsionné dans 20 cm³ de sérum physiologique. Six jours après, nous faisons une injection intra veineuse de dix centigrammes d'antigène en suspension dans 5 cm³ de sérum physiologique. Nous saignons le lapin le lendemain ou le surlendemain. Nous obtenons de la sorte des sérums dont le titre précipitant est le cent millième le plus souvent. Les pertes de lapins sont peu fréquentes. Les résultats sont sensiblement constants. Je n'insiste pas sur les précautions techniques habituelles de la saignée et de la décantation du sérum. Toutes ces opérations doivent être faites de façon absolument aseptique. Le sérum recueilli est conservé en ampoules en verre neutre, scellées, et placées à la glacière. Le taux précipitant s'abaisse avec le vieillissement du sérum, mais il reste, malgré tout, parfaitement utilisable, comme je vous le montrerai tout à l'heure.

La technique habituelle de la réaction précipitante jusqu'ici employée en France consistait à placer dans un tube fin, une certaine quantité d'antisérum puis à déposer avec précaution, à la pipette, au dessus de ce premier liquide, la solution de la tache suspecte dont le P_H avait été préalablement vérifié. Il apparaît de la sorte vous le savez, un anneau blanc de précipitation à la limite de séparation des 2 liquides. Cette technique a l'avantage de donner des résultats immédiats. Mais elle est parfois de lecture difficile. Elle est délicate. Enfin, la méthode des sérums précipitants expose à des erreurs graves, car un antisérum surtout s'il a un taux précipitant élevé n'est pas absolument spécifique. Sa spécificité est une spécificité antigénique et non pas une spécificité d'espèce.

* Vortrag, gelegentlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin in München 1952.

C'est la raison pour laquelle nous avons pensé modifier cette technique et ralentir la réaction. Nous avons appliqué à la Médecine Légale une technique préconisée par OUDIN, un élève de l'Institut Pasteur de Paris, pour des recherches dans un autre domaine. Elle consiste essentiellement à solidifier l'antisérum.

Ne voulant pas utiliser les substances gélifiantes préconisées par OUDIN nous avons fait divers essais et finalement nous avons arrêté notre choix sur la gomme acacia. Il faut n'utiliser qu'une gomme acacia très pure. Nous faisons dissoudre à chaud 2 gr de gomme acacia dans 50 cm³ de sérum physiologique, nous alcalinisons légèrement ce mélange de façon à avoir un p_H neutre.

Nous obtenons ainsi une solution à 4% de gomme acacia qui en se refroidissant se prend en masse. Nous obtenons ainsi un support neutre pour la réaction antigène anticorps, support qui se présente sous l'aspect d'une gelée incolore, transparente, qui permet de ralentir et de fixer la réaction des sérums précipitants.

Pour l'usage, nous opérons comme suit : Dans un petit tube à hémolyse, nous versons quelques gouttes d'un mélange à parties égales de solutions de gomme acacia et d'antisérum. La quantité de gomme acacia a été calculée de façon à ce que même dilué de moitié par le sérum précipitant, le mélange reste demi-solide à + 2° centigrade. Il suffit alors de verser au dessus du mélange gélifié, sans aucune précaution spéciale, la solution d'albumine à étudier. On voit alors apparaître, dans le gel, sous la limite de séparation des deux milieux deux zones opaques très fines séparées par une zone claire lorsque la solution d'albumine placée au dessus est de même nature que celle ayant servi à préparer le lapin. Il suffit ensuite de replacer le tube ainsi préparé, à la glacière à - 2° et d'observer ce qui se passe. Ces zones opaques vont en s'épaississant et en s'intensifiant. Revu le lendemain, le tube présente 3 ou 4 zones d'opacité décroissante et nettes.

La hauteur des anneaux semble variable et leur intensité d'opacité va en décroissant. Les jours suivants d'autres anneaux se forment encore toujours plus bas dans la zone des anticorps et la hauteur finale du précipité devient ainsi considérable.

La conservation en glacière empêche toute altération microbienne et facilite l'apparition des zones opaques.

Il semble que l'on puisse admettre avec OUDIN qu'il existe dans le sérum humain autant de substances antigéniques que nous décelons de zones opaques dans l'antisérum, leur répartition étant fonction, sans doute, de la vitesse de diffusion respective des molécules supports des antigènes et des anticorps.

Cette réaction peut être photographiée. En outre en mesurant la hauteur totale de la réaction et en connaissant le temps d'apparition des bandes on peut appliquer la loi donnée par OUDIN :

$$\frac{h}{\sqrt{t}} = \text{constante.}$$

En répétant l'opération sur plusieurs lectures étagées dans le temps, on peut obtenir une courbe dont l'aspect régulier prouve l'exactitude de la réaction.

Il serait trop long de reproduire ici tous les schémas d'expériences entreprises à partir de cette réaction. Vous trouverez le détail de ces recherches dans le rapport que j'ai rédigé pour le Congrès de Médecine Légale de Bruxelles en juin dernier qui sera publié in extenso, dans les *Acta Medicinæ Legalis*.

Je vous donnerai simplement les conclusions auxquelles nous avons abouti mes élèves et moi.

La concentration du gel en gomme d'acacia a une certaine importance. Celle-ci doit être comprise entre 4 pour cent et 5,6%. Nous avons toujours utilisé la solution à 4%.

La consistance du support varie avec la température ambiante.

Les anneaux apparaissent plus vite à la température ordinaire.

Il se forme alors immédiatement un premier anneau puis des flocculats tombent au fond du tube, et le gel s'opacifie progressivement.

La température optima est celle de -25-4°. Le retard d'apparition de la réaction varie de 30 secondes à 8 minutes. Les anneaux prennent progressivement leur aspect définitif.

La quantité d'antisérum mélangée au gel est importante à considérer. Il y a intérêt à préparer un gel aussi concentré que possible en anti-sérum. Ce qui nous paraît le plus maniable et donnant des réactions les plus nettes est un mélange à parties égales (20 gouttes de gel, 20 gouttes de sérum).

L'étude des réactions sur gel de dilutions progressives du sérum à étudier nous a permis d'obtenir en maintenant l'observation un temps suffisant des réactions positives alors que depuis longtemps la réaction ordinaire sur antisérum liquide n'était plus positive. La méthode utilisée a donc le mérite supplémentaire de rendre la réaction plus sensible en mettant en évidence un précipité infime qui passerait inaperçu en milieu liquide ordinaire.

Nous avons étudié également l'influence des phénomènes dits de zone dans la réaction précipitante. On sait en effet qu'un excès d'antigène ou un excès d'anticorps est capable d'empêcher la réaction.

Il y a soit inhibition de la réaction, soit redissolution du précipité dès sa formation.

L'expérience nous a montré que nos essais, qui correspondent à la pratique médico-légale courante, se situent donc, sinon exactement au point d'équivalence, du moins en dedans des deux zones muettes de la réaction. Nous ne risquons donc pas de rencontrer de phénomènes de zone dans la gamme des proportions utilisées par nous.

Nous avons enfin étudié la spécificité. Pour cela nous avons opéré comme tous les expérimentateurs à l'aide des réactions croisées. Nous nous sommes aperçus alors que nos sérums anti-humain, anti-bœuf, anti-mouton, anti-cheval, anti-porc étaient rarement spécifiques, c'est à dire qu'ils donnaient presque toujours un anneau de précipitation.

Nous avons cherché s'il n'existait pas entre une réaction homologue et une réaction hétérologue des différences dans le temps d'apparition des anneaux que le ralentissement de la réaction mettrait mieux en évidence. Cette idée a pu être vérifiée. Il existe en effet une marge très sensible, en moyenne une vingtaine de minutes, entre l'apparition de la réaction dans le tube homologue et dans les tubes hétérologues. Mais étant donné qu'il n'y a pas une constance absolue dans les réactions il nous semble imprudent de nous baser sur un tel test pour affirmer que le sérum étudié correspond exactement à l'antisérum de base.

Nous avons alors opéré autrement. Préparant nos réactions sur gel d'acacia (sérum anti-humain par exemple et dilutions au millième de sérums divers hétérologues et homologues) nous avons effectué nos lectures à la fin des 24 premières heures dans certaines séries et à la fin du 4^e jour dans les autres. Il est certain que nous avons, là, un procédé beaucoup plus sûr, le tube homologue présentant à la fin du 1^{er} jour et mieux encore à la fin du 4^e jour un aspect très différent des anneaux des tubes hétérologues.

De ces recherches qui demandent encore beaucoup de travail pour être précisées et mises en application, découlent un certain nombre de conclusions préliminaires.

La spécificité scientifique rigoureuse d'un antisérum est un fait de hasard. Mais contrairement à ce qui a été dit parfois, l'extrême sensibilité d'un antisérum n'est pas incompatible avec sa spécificité. Nous pensons, en outre, étant donné les difficultés de mettre en évidence la spécificité par les méthodes anciennes, que l'étude de la réaction précipitante sur anti-sérum gélifié est susceptible de nous apporter des éléments nouveaux soit par l'appréciation du retard dans l'apparition de la zone d'opacification, soit dans la lecture de la réaction en présence d'une dilution donnée du sérum antigène, soit enfin dans la combinaison d'une lecture tardive en présence d'une dilution plus ou moins étendue de l'antigène.

Nous pensons en tout cas que lorsque l'on passera à l'application pratique de ces méthodes ce qui nous paraît souhaitable, on ne pourra

se contenter de faire une seule réaction dans un seul tube entre un anti-sérum humain par exemple et une macération de la tache suspecte. Il faudra systématiquement présenter la macération de la tache si l'abondance du matériel le permet, au moins aux anti-sérums courants des animaux domestiques. C'est davantage par la comparaison des réactions précipitantes que par l'étude d'une réaction déterminée que l'on aboutira à des conclusions correctes. A moins cependant que l'étude expérimentale des anneaux superposés ne permette des précisions différentes. S'il est vrai comme certains auteurs l'ont soutenu que chaque anneau correspond à la précipitation d'un antigène spécial, il ne paraît pas impossible que l'on dénombre dans les antigènes d'une dilution d'un sérum inconnu des groupes antigéniques et même des antigènes séparés.

Il peut devenir possible, même, de les identifier soit par l'aspect et l'épaisseur de l'anneau, soit plus simplement par la place qu'ils occupent dans le tableau de la réaction, comme on identifie actuellement des raies spectrales.

Nous ferons remarquer enfin que la méthode reste valable avec des antisérums vieillis ayant perdu une partie importante de leur valeur précipitante. C'est ainsi qu'un sérum anticheval préparé en Septembre 1948 nous a donné en Mai 1952 les très belles réactions que je vous projette ici.

Cette méthode, bien que nous la travaillions depuis sept ans n'est encore qu'à son début. Néanmoins elle nous paraît offrir à la Médecine Légale un champ d'applications très vastes qui s'amplifiera encore au fur et à mesure des progrès de l'immuno-chimie.

Il est certain que lorsque nous serons capable de fractionner de façon rigoureuse les globulines et les éléments de celles-ci nous trouverons plus facilement les moyens de perfectionner nos techniques. Dès à présent, celle-ci nous est apparue de nature à offrir aux chercheurs un immense champ de travail.

Prof. M. MULLER, Institut de Médecine Légale et Sociale, Lille (Frankreich),
Boulevard P. Painlevé.
