

99

146

## MISE AU POINT D'UNE RÉACTION D'HEMAGGLUTINATION PROTÉINIQUE POUR LA PESTE

par R. NEEL et M. BALTAZARD (\*).

(Institut d'Etat des Sérums et Vaccins d'Hessarek (Institut Bazi)  
et Institut Pasteur de l'Iran.)

La multiplicité des réactions sérologiques dans la peste et le nombre considérable des travaux qui leur ont été consacrés [1, 2] montrent qu'aucune d'elles n'est pleinement satisfaisante et que leur valeur pratique est limitée, en dehors des applications expérimentales.

L'agglutination, malgré les difficultés auxquelles on se heurte dans la préparation de suspensions homogènes et stables, reste toujours la réaction de base. La fixation du complément, depuis l'emploi de la fraction IA [3] comme antigène par Chen, Quan et Meyer [4], est devenue la méthode de choix, mais sa sensibilité n'est pas supérieure à celle des autres tests, en particulier de l'agglutination.

Récemment Amies [5], puis Chen [6], ont montré que l'hémagglutination de Keogh, North et Warburton [7] était applicable à la peste. Mais nous estimons, à la suite de recherches sur la valeur pratique comparée de quelques réactions sérologiques (travail en cours de rédaction), que cette méthode n'est pas encore entrée dans le domaine pratique et que, pour de nombreuses raisons, elle est très inférieure aux deux techniques précitées. D'ailleurs, de par son principe même (adsorption de substances antigéniques de nature polysidique), il semble logique qu'il en soit ainsi, étant donné ce que nous savons de la nature de l'antigène pesteux.

Tous les travaux modernes ont en effet montré que les fractions purifiées, antigéniques et immunisantes de *Pasteurella pestis* sont des protéines, parfois associées à une faible proportion de polysaccharides, selon le procédé adopté pour l'extraction et la purification [3, 5, 8].

Cherchant à mettre au point, pour la détection des anticorps

(\* Manuscrit reçu le 9 septembre 1953.)

chez les rongeurs résistants à la peste, une réaction de haute sensibilité, nous avons pensé utiliser la modification apportée par Boyden [9] à la réaction d'hémagglutination de Keogh. On sait que cet auteur, grâce au tannage préalable des hématies, parvient à fixer sur celles-ci des antigènes de nature protéinique et les rend ainsi agglutinables par les antisérums correspondants. Pour l'antigène tuberculeux, Boyden [9] (puis Grabar, Boyden et coll. [10]) a mis ainsi en évidence une réaction d'hémagglutination protéinique plus sensible, mais d'interprétation plus délicate que la classique réaction de Middlebrook et Dubos [44].

Nous disposons d'autre part d'un antigène pesteux purifié, la fraction IA [3], dont le professeur K. F. Meyer avait bien voulu, lors de sa venue à Téhéran, nous remettre un lot important. Cet antigène avait de plus l'avantage d'être totalement inactif dans l'hémagglutination polyosidique, comme Chen [6] l'a signalé et comme nous l'avons nous-mêmes constaté.

#### A. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

La technique de la réaction est dans ses grandes lignes celle de Boyden [9]. Une seule modification importante y a été apportée, le remplacement de la sédimentation spontanée des hématies à la température du laboratoire ou à +4° par une centrifugation modérée et courte.

1° **MATÉRIEL ET RÉACTIFS.** — 1° *Verrerie.* — N'utiliser que des tubes à hémolyse de 10 à 11 mm de diamètre intérieur, à fond régulièrement hémisphérique, tout tube présentant des irrégularités dans la fabrication devant être rejeté. Cette double condition est nécessaire pour obtenir une bonne sédimentation et une réémulsion facile du culot.

Ces tubes, en verre neutre, devront être très propres; après immersion dans le mélange sulfo-chromique de Küss, ils seront très soigneusement lavés à l'eau courante puis bidistillée pour éliminer toute trace d'acide. L'observation de ces précautions peut influencer considérablement sur la sensibilité de la réaction.

2° *Eau distillée.* — Ne se servir dans la préparation des réactifs et de l'eau physiologique que d'eau bidistillée afin d'éliminer les traces de cuivre qui pourraient fausser la réaction [12].

3° *Produits chimiques.* — Purs.

4° *Eau physiologique.* — A 9 p. 1 000 de chlorure de sodium.

5° *Hématies de mouton.* — Prélèvement aseptique et conservation à +4° en solution d'Alsever modifiée [13], à raison de 100 ml de sang pour 120 ml de liquide conservateur. Utiliser après trois jours et jusqu'à deux semaines.

#### Solution d'Alsever :

Glucose . . . . .	2,05 g
Citrate trisodique . . . . .	0,80 g
Chlorure de sodium . . . . .	0,42 g
Eau distillée . . . . .	100 ml

Ajuster à pH 6,4 avec une solution d'acide citrique à 10 p. 100.  
Stériliser à 115° pendant vingt minutes ou par filtration.

#### 6° Solutions salées tamponnées.

N° 1. Eau physiologique . . . . .	40 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{KH}_2$ à 0,15 M . . . . .	28 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ à 0,15 M . . . . .	Q. S. P. pH 6,4
N° 2. Eau physiologique . . . . .	40 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{KH}_2$ à 0,15 M . . . . .	12 ml
Solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ à 0,15 M . . . . .	Q. S. P. pH 7,2

7° *Solution d'acide tannique.* — « Acidum tannicum pur. lev. — Görlitz — Deutschland ». Solution en eau physiologique à 1 p. 15 000, à préparer extemporanément, les solutions diluées ne se conservant pas.

8° *Antigène.* — « Fraction IA — Lot 278-53-8 — Hooper Foundation, University of California — 10 novembre 1952 ». Solution en eau salée tamponnée à pH 6,4 titrant 0,750 mg/ml ou 1 mg/ml. Dissoudre soigneusement. Centrifuger et décanter pour avoir un liquide antigénique clair, à peine opalescent. Ne pas utiliser de tubes en matière plastique pour la centrifugation.

9° *Sérum de lapin normal.* — Après inactivation, faire une solution au 1/250 en eau physiologique.

10° *Immunsérums.* — Inactivation une demi-heure à 56°.

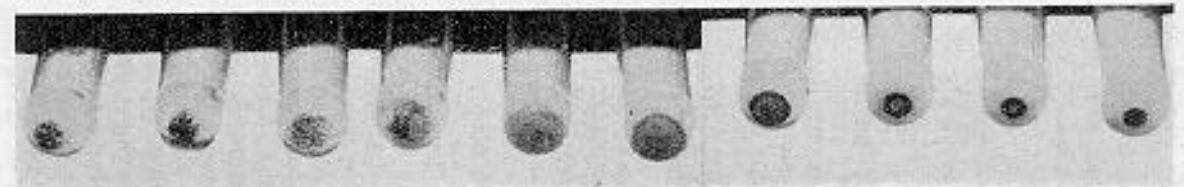
2° **TECHNIQUE DE LA RÉACTION.** — 1° *Lavage des hématies.* — Après séparation du liquide conservateur, laver trois fois à l'eau physiologique. Centrifuger à 2 000 t/m pendant dix minutes. Remettre les hématies en suspension en solution salée tamponnée à pH 7,2 au taux de 2,5 p. 100.

2° *Tannage des hématies.* — Mélanger un volume de suspension globulaire et un volume de solution tannique fraîche. Agiter et laisser en contact pendant dix minutes à la température du laboratoire. Laver une fois dans la solution salée tamponnée à pH 7,2. Centrifuger à 1 500 t/m pendant trois minutes. Remettre en suspension en eau physiologique sous le volume initial.

3° *Sensibilisation des hématies tannées.* — A un volume de la suspension d'hématies tannées, ajouter 4 volumes de la solution de fraction IA. Laisser en contact quinze minutes à la température du laboratoire. Laver une fois dans le sérum de lapin dilué au 1/250. Centrifuger à 1 500 t/m pendant trois minutes. Remettre en suspension dans ce même sérum sous le volume initial. On a ainsi une suspension globulaire à 2,5 p. 100.

FIG. 1. — Hémoagglutination par centrifugation.

Aspect de la réaction après lecture immédiate par agitation, puis sédimentation secondaire à + 5°. Sérum L. 1.

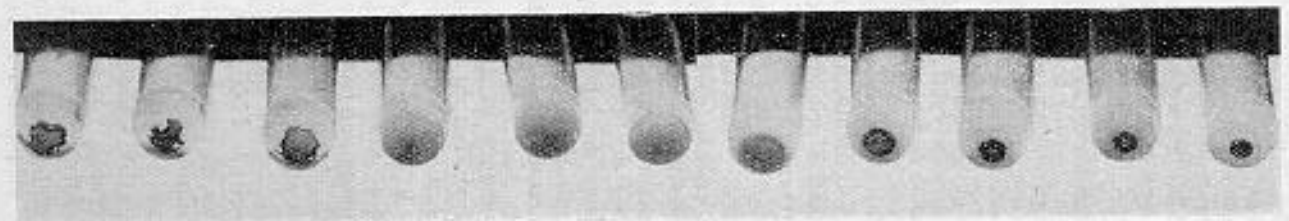


$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1\ 600}$	$\frac{1}{3\ 200}$	$\frac{1}{6\ 400}$	$\frac{1}{12\ 800}$	$\frac{1}{25\ 600}$	Témoin sérum normal.
Zone de réaction positive avec agglutinats.						Zone de réaction négative.			
++++	++++	++++	+++	++	+	0	0	0	0

FIG. 2. — Hémoagglutination par sédimentation primitive.

Même sérum que figure 1.

Aspect de la réaction après sédimentation primitive à la température du laboratoire pendant une nuit. Sérum L. 1.



$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1\ 600}$	$\frac{1}{3\ 200}$	$\frac{1}{6\ 400}$	$\frac{1}{12\ 800}$	$\frac{1}{25\ 600}$	Témoin sérum normal.	Témoin eau physiol.
Zone de réaction positive du type agglutinat.				Zone de réaction positive du type virus.		Zone de réaction négative.				
Présence d'agglutinats après agitation :										
++++	++++	+++	++	+	0	0	0	0	0	0

*N.B.* — Signalons que la température ambiante, au cours de tous nos essais, oscillait entre 28° et 32°.

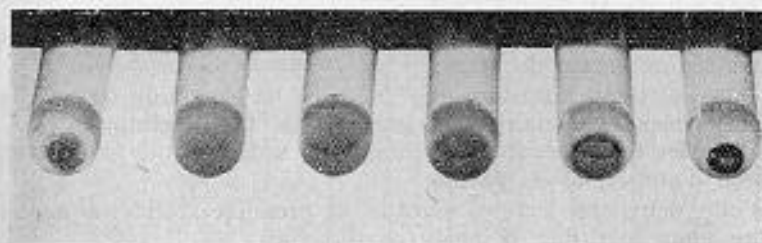
Il faudrait recommencer les opérations précédentes si au cours des manipulations on observait une hémolyse même légère. Cette éventualité ne s'est cependant jamais présentée au cours de nos nombreux essais.

La suspension globulaire sensibilisée ne se conserve que peu de temps et après vingt-quatre heures à + 4° on note fréquemment un très léger degré d'hémolyse.

4° *Exécution de la réaction.* — Répartir dans les tubes à hémolyse les dilutions croissantes de sérum à tester, sous un volume

FIG. 3. — Hémagglutination par centrifugation.

Aspect de la réaction après lecture immédiate par agitation et sédimentation secondaire pendant une nuit à la température de laboratoire. Sérum I. 2.



	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1\ 600}$	$\frac{1}{3\ 200}$	$\frac{1}{6\ 400}$
	Réaction positive.			Réaction	Réaction négative.	
Type : Aggl.	Virus.			douteuse.		
Présence d'agglutinats à la lecture directe par agitation :	+++	++	+	0	0	0

de 0,5 cm<sup>3</sup>. Ajouter la suspension globulaire sensibilisée à raison de 0,05 cm<sup>3</sup> (1 goutte) par tube.

Témoin eau physiologique + hématies tannées sensibilisées.

Témoin sérum normal + hématies tannées sensibilisées.

Placer au bain-marie à 37° pendant dix minutes.

Centrifuger à 1 000 t/m pendant cinq minutes (centrifugeuse de rayon 12 cm). Rappelons que la force centrifuge est directement proportionnelle au diamètre et au carré de la vitesse.

5° *Lecture.* — Déjà au sortir du bain-marie, dans les tubes fortement positifs, l'agglutination des hématies est visible à l'œil nu.

*Première lecture :* Réémulsionner le culot par quelques secousses légères sur le fond du tube.

Dans les tubes fortement positifs (++++), le culot se dissocie

immédiatement et très facilement en gros agglutinats qui tranchent sur le fond clair du liquide.

Dans les tubes négatifs et témoins (0), la réémulsion du culot est plus difficile et les hématies se remettent en suspension de façon homogène.

Dans les tubes présentant des degrés intermédiaires de positivité (+++ à +), la grosseur des agglutinats va en diminuant et en même temps le liquide de suspension devient de plus en plus trouble.

Les agglutinats résistent parfaitement à une agitation forte. La lecture se fait à l'œil nu et on peut contrôler les tubes faiblement positifs en employant la loupe  $\times 5$ .

*Deuxième lecture :* Placer les tubes sur un portoir et laisser sédimenter spontanément à  $+4^{\circ}$  pendant trois à quatre heures ou une nuit. Lire alors la réaction par appréciation de la forme du culot, soit directement à l'œil nu, soit au miroir concave.

Dans les tubes positifs +++ et ++, les agglutinats sont ramassés au centre du tube.

Dans les tubes positifs + et +, on a un aspect du type virus mince couche globulaire avec présence de fins agglutinats.

Dans les tubes négatifs et témoins, la sédimentation se fait en forme d'anneau et en pastille.

Cette deuxième lecture contrôle la première; elle est nécessaire pour confirmer la positivité du type +.

*N. B.* — Les figures 1 et 3 illustrent parfaitement l'exposé précédent.

#### B. — RÉSULTATS.

Dans une première série d'essais, nous avons testé par les deux réactions d'hémagglutination protéinique et d'agglutination (nous en donnerons la technique dans un prochain travail) :

- 1° Des sérums de lapins faiblement immunisés;
- 2° Des sérums de mériens ayant résisté à la contamination expérimentale.

Les résultats sont condensés dans le tableau I.

On voit que les titres obtenus par hémagglutination sont en moyenne cinq fois supérieurs à ceux décelés par l'agglutination; de plus un des sérums est seulement positif à l'hémagglutination.

Parallèlement, 122 sérums normaux d'homme, de lapin, de cobaye et de mérien ont toujours fourni des résultats négatifs à des dilutions allant de 1/2 à 1/5.

D'autre part, dans une deuxième série d'essais, nous avons recherché l'évolution de la réaction d'hémagglutination protéinique chez deux lapins qui ont reçu, par voie intraveineuse, une

TABLEAU I. — Valeur comparée des réactions d'hémagglutination protéinique et d'agglutination. Lecture directe par agitation après centrifugation.

SÉRUM	Hémagglutination protéinique								Agglutination							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
1	25	50	100	200	300	400	600	1000	10	20	50	100	200	300	400	
2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

TABLEAU II. — Evolution de la réaction chez le lapin à la suite d'une seule injection intraveineuse de *P. pestis*.

Ce tableau montre à la fois la précocité et la sensibilité de la réaction alors que la dose injectée était faible.

SÉRUM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lapin 1												
1 <sup>er</sup> jour												
5 <sup>e</sup> jour	+++	+++	+++	+								
8 <sup>e</sup> jour	nf	nf	+++	+++	+++	++	*					
12 <sup>e</sup> jour	nf	nf	nf	nf	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lapin 2												
1 <sup>er</sup> jour												
5 <sup>e</sup> jour	+++	+++	+++	+								
8 <sup>e</sup> jour	nf	nf	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12 <sup>e</sup> jour	nf	nf	nf	nf	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

seule dose de 0,25 cm<sup>3</sup> d'une émulsion de 1 000 000 000 de germes de bacilles pesteux souche EV, cultivés à 37°. Le tableau II résume nos observations.

#### C. — DISCUSSION.

Les considérations suivantes nous ont guidés dans la mise au point de la réaction.

1° *Titre de la solution tannique.* — Etant donné les différences dans la préparation et la purification des acides tanniques de marque différente, il est nécessaire de rechercher la concentration optimale de l'acide tannique choisi. Avec l'acide tannique purifié que nous avons employé (Acidum tannicum pur. lev.-Görlitz-Deutschland), le taux de 1 p. 15 000 nous a donné les résultats les meilleurs, c'est celui que nous avons adopté.

2° *Titre de la solution sensibilisante.* — Les taux de 1 mg/ml

à 0,750 mg/ml de fraction IA donnent des résultats du même ordre de grandeur. A des concentrations moins fortes, la zone de positivité baisse sensiblement, cependant on a encore une hémagglutination appréciable avec 5 µg/ml d'antigène.

Le tableau III résume nos expériences.

TABLEAU III. — Influence du titre de la solution sensibilisante.

mg/ml de fraction IA	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$
1 mg/ml	++++	++++	++++	+++	++	+
750mg/ml	++++	++++	++++	+++	++	+
350mg/ml	++++	++++	+++	++	+	
50mg/ml	+++	+++	++			
5mg/ml	+++	++				

Des doses très faibles de fraction IA provoquent donc encore la formation d'agglutinats. La formation d'agglutinats, observée exceptionnellement par Boyden [9] et jamais par Borduas et Grabar [14] est probablement due d'une part à la spécificité et à la pureté de l'antigène utilisé, puisque nous les observons avec la technique par sédimentation primitive employée par ces auteurs, d'autre part au facteur centrifugation comme nous le verrons plus loin (voir fig. 1 et 2).

Quel que soit le mécanisme de la sensibilisation (formation probable d'un complexe acide tannique-protéine), on a intérêt à ce que les opérations de tannage et de sensibilisation soient soigneusement exécutées, afin d'éviter des réactions non spécifiques, étant donné le comportement particulier des hématies tannées et sensibilisées, très différent de celui des hématies normales.

3° Influence du tannage et de la sensibilisation sur le comportement des hématies. — Le tannage exerce une action inhibitrice sur l'hémolyse et l'agglutination naturelle des hématies, action qui est encore renforcée par la sensibilisation.

1° Hémolyse. — Le tableau IV montre l'action qu'exercent le

TABLEAU IV. — Influence du tannage et de la sensibilisation sur l'hémolyse.

Dilution du sérum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$
H. normales	++++	++++	+++	++	
H. tannées	++	++	+		
H. sensibil.	+				

tannage et la sensibilisation sur l'hémolyse des hématies de mouton par un sérum neuf et non inactivé de lapin.

Des résultats analogues ont été obtenus avec des sérums d'homme ou de cobaye. L'inactivation des sérums peut donc être supprimée dans certains cas, quand on opère avec des sérums dilués.

2° Agglutination. — L'effet inhibiteur s'exerce aussi sur l'agglutination naturelle des hématies par les sérums non saturés, comme le montre le tableau V.

TABLEAU V. — Influence du tannage et de la sensibilisation sur l'agglutination naturelle.

Dilution du sérum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$
H. normales	++++	+++	++	+	
H. tannées					
H. sensibil.					

Signalons que les hématies tannées peuvent quelquefois présenter encore un certain degré d'agglutinabilité qui se traduit, avec des sérums positifs ou négatifs, au cours de la centrifugation par la présence de flocs agglutinats ou au cours de la sédimentation lente primitive par une agglutination du type virus, aspect que l'on retrouve si l'on remplace les sérums par de l'eau physiologique.

Les hématies tannées et sensibilisées, en présence de sérum négatif non saturé (ou en eau physiologique) se comportent toujours comme les hématies normales dans ce même sérum saturé.

La saturation des sérums n'est donc pas nécessaire, ce qui évite une opération supplémentaire, au cours de laquelle la perte de sérum peut être appréciable, surtout quand on opère sur de très petites quantités, comme c'est le cas pour le mérion.

3° Influence de la centrifugation. — La mise au bain-marie préalable (dix minutes à 37°) nous a paru rendre la réaction plus sensible; déjà, au sortir du bain-marie, on observe une légère agglutination visible à l'œil nu dans les tubes fortement positifs.

Nous avons utilisé la centrifugation dans l'hémagglutination polyosidique pesteuse sans aucun avantage appréciable, sinon celui de la rapidité. Entre temps, Suchet [15] a appliqué cette méthode à la réaction de Middlebrook et Dubos et n'a obtenu que des résultats superposables à ceux de la méthode lente.

Par contre, la centrifugation dans l'hémagglutination protéinique pesteuse a une action renforcatrice considérable qui se traduit, par rapport à la réaction par sédimentation lente, par :

1° La formation d'agglutinats dans un plus grand nombre de tubes, le tableau VI en donnant un exemple :

TABLEAU VI. — Comparaison entre la centrifugation et la sédimentation lente. Action de la centrifugation sur la formation des agglutinats.

SÉRUM I I (Planches I, 2)	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$
Centrifugation	++++	++++	++++	+++	++	+
Sédimentation	+++	+++	++	+		

2° Corrélativement l'observation d'agglutinats (même avec un sérum faiblement positif) dans une zone où par sédimentation primitive on ne note qu'une agglutination du type virus.

3° Le renforcement considérable de la cohésion des hématies, une agitation sévère ne dissociant pas les agglutinats formés au cours de la centrifugation, alors que ceux obtenus par sédimentation primitive le sont aisément.

La lecture de la réaction se trouve ainsi facilitée. Elle se fait, comme nous l'avons vu plus haut par :

1° Une première lecture par agitation immédiate au sortir de la centrifugeuse ;

2° Une deuxième lecture, après sédimentation secondaire, qui sert surtout de vérification pour les tubes faiblement positifs.

La lecture, par examen du culot après centrifugation (centrifugeuse horizontale) ne donne qu'une idée approximative de la positivité ; nous ne l'avons pas retenue.

Les figures 1, 2, 3 illustrent parfaitement toutes les considérations précédentes.

#### D. — RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

L'hémagglutination protéinique, appliquée à la peste, donne une réaction bien supérieure aux autres réactions sérologiques et en particulier à la réaction d'agglutination.

Elle se caractérise par :

1° Une exécution facile, non seulement parce que les incidents techniques au cours de la préparation des hématies semblent exceptionnels, mais encore parce que le tannage et la sensibilisation des hématies exercent une action inhibitrice remarquable sur l'hémolyse et l'agglutination naturelle des hématies de mouton par les sérums, ce qui permet, tout au moins, de supprimer la saturation des sérums à tester.

2° Une grande sensibilité qui paraît due à deux causes :

a) L'emploi d'un antigène très purifié, fraction IA, ne contenant des polysaccharides qu'en faible proportion. On élimine de

ce fait la fixation possible d'autres substances protéiniques non spécifiques, la réaction ne faisant plus appel qu'à l'antigène d'enveloppe immunisant et spécifique. La partie glucidique, dont le rôle dans l'immunisation antipesteuse est discutée, n'intervient pas, tout au moins directement, non seulement du fait de la fixation tannique préalable, mais aussi du fait que la fraction IA ne sensibilise pas les hématies dans la méthode polysidique classique. En pratique, l'utilisation d'un antigène pur se traduit déjà par la formation d'agglutinats dans la zone de forte positivité (++++ et +++).

b) L'emploi de la centrifugation, qui renforce encore la réaction et permet l'obtention d'agglutinats dans toute la zone de positivité (++++ à +), à la place d'une agglutination du type virus.

Par voie de conséquence, cette réaction permet :

1° La détection précoce de taux faibles d'anticorps (vraisemblablement précipitines) alors que la réaction d'agglutination est encore négative ;

2° L'obtention de taux de positivité en moyenne cinq fois supérieurs à ceux fournis par l'agglutination.

Il serait intéressant de pouvoir étudier le comportement des autres fractions antigéniques isolées à partir du bacille pesteux : fraction IB, antigène d'Amies, antigène A de Seal et leur sensibilité dans ce type de réaction.

La réaction d'hémagglutination protéinique semble applicable à tous les tests de laboratoire et, étant donné sa précocité et sa sensibilité, également aux tests de clinique, d'épidémiologie et d'épizootologie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WU LIEN-TEH, J. CHUN, R. POLLITZER et C. YU. *Plague. A Manual for medical and public Health Workers*. Shanghai, 1938.
- [2] R. POLLITZER. *Bull. O. M. S.*, 1952, **16**, 40.
- [3] E. BAKER, H. SOMMER, L. FOSTER, E. MEYER et K. F. MEYER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **64**, 139.
- [4] T. CHEN, S. QUAN et K. F. MEYER. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 147.
- [5] C. AMIES. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, **32**, 259.
- [6] T. CHEN. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 587.
- [7] E. KROGH, E. NORTH et M. WARBURTON. *Nature*, 1947, **160**, 83.
- [8] S. SEAL. *J. Immunol.*, 1951, **67**, 93 ; *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 675.
- [9] S. BOYDEN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [10] P. GRABAR, S. BOYDEN, A. TAQUET et A. BORDUAS. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 899.
- [11] G. MIDDLEBROOK et R. DEBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [12] V. SAUTTER et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1948, **74**, 261.
- [13] S. BUKANTZ, C. REIN et J. KENT. *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**, 394.
- [14] A. BORDUAS et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1953, **84**, 903.
- [15] A. SUCHET. *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **10**, 412.