

STANDARDISATION DE LA LEPROMINE

ROLAND CHAUSSINAND
*Chef du Service de la Lèpre,
Institut Pasteur, Paris, France.*

Ces dernières années, d'assez nombreux articles ont été publiés, recommandant l'emploi d'antigène fortement dilué pour l'épreuve à la lépromine. En effet, l'utilisation des sulfones sur une grande échelle dans la thérapeutique de la lèpre entraîne la disparition relativement rapide des nodules chez les malades lépromateux, et ce sont surtout ces lésions qui servent à la préparation de l'antigène puisqu'elles présentent la concentration la plus forte en bacilles de Hansen. On pouvait donc craindre que, dans quelques années, il devienne extrêmement difficile de se procurer de la lépromine. Or, la valeur considérable de la réaction de Mitsuda, en ce qui concerne le pronostic de la lèpre et le classement des malades, n'est plus à démontrer. En outre, l'épreuve à la lépromine est indispensable au cours des enquêtes épidémiologiques. Aussi est-il compréhensible que différents auteurs aient tenté d'économiser l'antigène, en utilisant des dilutions parfois très élevées.

Personnellement, nous sommes moins pessimiste. Nous estimons que la crainte de manquer de lépromine dans un proche avenir n'est nullement justifiée. Il existe encore, malheureusement, des millions de malades lépromateux dans le monde et si l'on veut bien se donner la peine de prélever une partie de leurs nodules avant de les traiter on disposera d'un stock très important d'antigène, utilisable pendant de nombreuses années. Nous avons, en effet, pu démontrer que la lépromine, gardée à l'abri de la chaleur et de la lumière, conservait son activité pendant au moins 14 ans.

Toutefois, dans beaucoup de régions où la lèpre est endémique, les médecins ne sont pas toujours suffisamment équipés pour effectuer la préparation de l'antigène. Il nous a été souvent adressé à Paris, des demandes de lépromine par des médecins d'Afrique et d'Asie, qui avaient de nombreux malades lépromateux à leur disposition mais qui hésitaient à préparer eux-mêmes l'antigène. Aussi avons-nous accepté, à la demande de la Société de Pathologie exotique de Paris, de préparer la lépromine standardisée. Et actuellement, pour recevoir cet antigène il suffit de nous adresser des nodules, prélevés aseptiquement, puis placés sans addition de liquide dans un tube en verre, qui est immédiatement scellé et stérilisé à 115° pendant 20 minutes. Nous envoyons même gratuitement des flacons spéciaux qui permettent de supprimer le scellage des tubes, opération qui ne se pratique pas toujours aisément en brousse. La lépromine standardisée du Service de la Lèpre de l'Institut Pasteur de Paris est préparée selon la technique de Mitsuda-Hayashi, modifiée par Wade. Elle est remise gratuitement aux différents centres, au prorata du poids des nodules reçus.

La lépromine standardisée est livrée en ampoules de 2 ou de 10 doses et en flacons de 6 cc.

L'intérêt indiscutable de cette standardisation de l'antigène, déjà recommandée en 1952 sur la proposition de Wade, par le Comité d'Experts de la Lèpre de l'O.M.S. (11), est actuellement reconnu par de nombreux pays étrangers qui ont adhéré à notre "pool" de la lépromine.

Bien que l'éventualité d'un manque de lépromine, en ce qui concerne les besoins courants de la clinique, ne soit pas à craindre dans les années à venir, il est néanmoins indiqué d'étudier dans quelle proportion l'antigène normal peut être dilué sans subir une perte importante de son activité. En effet, les grandes enquêtes épidémiologiques, qu'il serait très utile d'entreprendre, et l'expérimentation de la prophylaxie antilépreuse par le B. C. G., menée sur une grande échelle, exigeraient des quantités considérables de lépromine.

Nous nous sommes intéressé à cette question dès 1939. Nous avons alors vérifié et confirmé l'affirmation de Hayashi (6) que l'agent actif de la lépromine était constitué par les corps bacillaires et que des dilutions de plus en plus fortes de l'antigène produisaient des réactions de plus en plus faibles. Nous avons reconnu à cette date qu'une dilution de 1:60 donnait des résultats sensiblement équivalents à ceux obtenus avec l'antigène classique de Mitsuda-Hayashi (dilution 1:20). Nous avons cependant continué à utiliser la lépromine classique, estimant que tous les léprologues devaient employer la même dilution. Plus récemment, nous avons pu constater que l'usage de dilutions trop fortes, telles que celles expérimentées par Pardo-Castelló et Tiant (12), Floch (4), et Diniz et Neto (3), ne pouvait être recommandé; les réactions tardives de Mitsuda se révélant négatives ou nettement trop faibles chez les sujets peu ou modérément allergiques (1).

L'allergie ne se manifeste chez un sujet peu ou modérément sensible à la lépromine que si on lui injecte une certaine dose minima d'antigène, c'est-à-dire de bacilles de Hansen tués par la chaleur. Cette dose minima, variable d'un sujet à l'autre, constitue la limite au-dessous de laquelle l'allergie ne pourra plus être décelée.

L'emploi de fortes dilutions est donc à déconseiller. Et il est vraiment trop simple d'affirmer, comme le fait Floch, qu'au cours de la lecture de la réaction, il suffit d'ajouter une croix au résultat obtenu avec la lépromine diluée à 1:750 pour connaître le degré réel d'intensité de l'allergie d'un sujet. Comment distinguer alors les individus anergiques de ceux qui ne réagissent pas à une dilution de 1:750, mais se révèleraient sensibles à l'antigène intégral?

Diniz et Neto raisonnent d'une manière plus acceptable quand ils proposent de tester les sujets d'abord avec de la lépromine à 1:750, puis de compléter l'examen chez les individus négatifs par une épreuve à la lépromine intégrale. Mais, abstraction faite des difficultés et de la perte de temps qu'entraînerait ce procédé, il ne peut être conseillé de pratiquer

deux épreuves à la lépromine à intervalle rapproché sur un même sujet, puisque, après Lara (9, 10), Ignacio, Palafox et José (7) viennent de démontrer—it est vrai sur des enfants de lépreux—que des injections répétées de lépromine sensibilisaient les individus primitivement négatifs à cet antigène.

Schujman (13) propose de n'éprouver à la lépromine 1:750, au cours des examens périodiques ultérieurs, que les sujets s'étant montrés auparavant fortement positifs à l'antigène intégral. Mais, dans ce cas, il sera impossible de reconnaître si la réaction négative ou plus faible, constatée ultérieurement, est due à l'utilisation d'un antigène trop dilué ou, au contraire, à une disparition ou à une baisse de l'allergie de l'individu testé.

L'allergie à la lépromine n'est pas immuable. Nous avons assez souvent observé, notamment du temps de la thérapeutique au chaulmoogra, que des sujets même fortement allergiques pouvaient devenir négatifs à la lépromine.

Il résulte de ce qui précède que l'emploi de la lépromine diluée à 1:750 doit être déconseillé.

Floch semble d'ailleurs admettre que la dilution de 1:750 donne des résultats trop faibles, puisqu'il cherche à augmenter les réactions qu'elle détermine par l'adjonction de diverses substances, telles que glycérine, huile de paraffine, peau saine (5).

Il est évident que l'injection de substances, n'ayant aucun pouvoir antigénique dans la lèpre, ne peut produire qu'une réaction locale sans signification allergique spécifique. L'adjonction de ces substances, et notamment de peau saine, à l'antigène bacillaire ne provoque qu'une réaction banale, irrégulière, surajoutée à la réaction allergique éventuelle, et non un "renforcement" de la réaction allergique. En effet, Floch a lui-même constaté que seulement 50 pour cent environ des lépreux tuberculoïdes répondaient positivement à l'injection intradermique d'une suspension uniquement préparée avec de la peau normale. Et les "fausses réactions" que nous avons observées chez des malades lépromateux après l'injection de lépromine relativement riche en tissus démontrent bien que le procédé de Floch ne peut être recommandé.

En effet, bien que nous préparions la lépromine standardisée selon la technique de Mitsuda-Hayashi, modifiée par Wade, nous estimons que cette méthode n'est pas entièrement satisfaisante (2). Cette lépromine produit fréquemment chez les malades lépromateux, non traités, de petites infiltrations légèrement érythémateuses, pâlissant plus ou moins lentement. Elles atteignent assez souvent un diamètre supérieur à 3 mm et peuvent persister plus de quatre semaines. Ces infiltrations que nous qualifions de "fausses réactions", sont dues vraisemblablement à la résorption locale très lente des "corps étrangers" injectés dans la peau (tissus et bacilles) et risquent d'être interprétées d'une façon erronée comme une réaction tardive de Mitsuda faiblement positive, surtout chez les malades à peau pigmentée. Cette erreur d'interprétation pourrait

expliquer la proportion surprenante de 30 à 45 pour cent de lépromateux sensibles à la lépromine de Wade que nous avons relevée dans le compte rendu de l'enquête épidémiologique effectuée en 1954 aux Iles Loyauté (8).

Or, nous n'avons pas observé ces "fausses réactions" en utilisant une lépromine, préparée, selon la méthode de Mitsuda-Hayashi, avec des nodules sans peau et refiltrée au travers de couches de estimonsnous gaze de coton, colmatées par une première filtration. Aussi estimonsnous qu'il y a grand intérêt à éliminer, autant que possible, les tissus au cours de la préparation de l'antigène.

Nous avons été ainsi amené à étudier, en collaboration avec Viette, différents procédés pour obtenir un antigène, contenant relativement peu de tissus, sans provoquer une perte appréciable de bacilles (2). Mais, jusqu'à présent, les résultats se sont révélés peu satisfaisants. Répétons toutefois que la lépromine standardisée, faite avec les nodules que nous recevons de différents pays, est préparée uniquement selon la méthode de Mitsuda-Hayashi, modifiée par Wade.

Au cours de notre expérimentation concernant les lépromines diluées, que nous avons eu le privilège de pouvoir terminer au magnifique Hôpital-Colonie de Rovisco Pais (Portugal), nous avons reconnu que des dilutions plus fortes que celle de l'antigène intégral, préparé selon la technique de Mitsuda-Hayashi, modifiée par Wade (1:30), étaient utilisables. Ainsi des dilutions entre 1:60 et 1:200, nous ont donné des résultats plus ou moins acceptables. Par contre, les dilutions plus fortes sont à déconseiller formellement.

La dilution à 1:60 donne sensiblement les mêmes résultats que la lépromine normale du type Wade (1:30). Celle de 1:200 est encore utilisable pour des enquêtes épidémiologiques bien qu'elle produise des réactions tardives plus faibles. Les résultats se montrent d'ailleurs variables selon la teneur en germes des différentes lépromines intégrales, employées pour les dilutions. Cette teneur en germes dépend d'abord de la richesse en bacilles des nodules prélevés, ensuite du mode et de la durée de leur broyage et enfin de la contexture plus ou moins serrée du tissu servant de filtre.

Il ressort de notre expérimentation, concernant les lépromines diluées, que les résultats variables, obtenus sur un même sujet avec de fortes dilutions de lépromine, provenaient vraisemblablement de la répartition irrégulière de l'agent actif dans l'antigène, c'est-à-dire des bacilles (germes isolés, amas et globies de tailles extrêmement différentes). Nous avons donc cherché, en collaboration avec Grabar, Prudhomme et Viette, à obtenir une suspension bacillaire plus homogène en soumettant la lépromine normale à l'action des vibrations sonores de haute fréquence (2).

A noter que Floch a eu, quelques mois plus tard, la même idée, ce qui semble indiquer qu'il considère également l'homogénéité de sa lépromine 1:750 comme insuffisante.

La valeur pratique de nos lépromines irradiées a été étudiée tout

récemment par Gehr au Suriname et par nous-même à l'Hôpital-Colonie Rovisco Pais. Il résulte de cette expérimentation que l'emploi de lépromine soumise à l'action des vibrations sonores de haute fréquence ne peut être recommandée. Ce procédé dissocie bien les amas bacillaires et les globies, mais rend l'antigène moins actif en détruisant une grande quantité de corps bacillaires.

Nos travaux concernant l'allergie à la lépromine nous ont amené à la conviction que la standardisation de l'antigène constitue la mesure indispensable à une étude comparative approfondie de l'immunologie de la lèpre. Aussi avons-nous accepté d'entreprendre, en collaboration avec Viette, ce travail délicat et ingrat. Le Service de la Lèpre de l'Institut Pasteur de Paris prépare donc actuellement cette lépromine standardisée en grande quantité et selon une technique toujours rigoureusement égale. Les nodules, provenant de différentes parties du monde, qui servent à la préparation de l'antigène, sont sélectionnés après un examen bactériologique, puis soigneusement pesés sur une balance de précision. Ils sont ensuite broyés très finement à trois reprises et filtrés au travers d'un tissu de nylon de contexture très serrée, toujours identique. La dilution finale est contrôlée et ajustée par mesure de la densité optique. Enfin, la répartition en ampoules ou en flacons est pratiquée à l'aide d'un agitateur électro-magnétique et d'un rhéomètre à distribution continue. Cette lépromine standardisée contient donc d'un lot à l'autre une quantité de germes approximativement égale.

Mais, il nous paraît encore beaucoup plus important que la lépromine diluée soit standardisée, puis étudiée, dans différents pays par des léprologues compétents, sur des malades atteints de lèpre tuberculoïde ou de lèpre indéterminée à divers stades. Il deviendra alors possible de déterminer la dilution optima qui pourra être universellement adoptée.

Actuellement, l'expérimentation des lépromines diluées se révèle assez incohérente du fait que les diverses lépromines intégrales, employées pour les dilutions, ont des teneurs parfois très inégales en bacilles. En outre, certains injectent 0 cc 2 d'antigène, d'autres, 0 cc 1, d'autres encore, aussi surprenant que cela puisse paraître, pratiquent leurs injections intradermiques à vue d'oeil en cherchant à obtenir des papules [wheals] de dimension semblable. D'autre part, la majorité des auteurs ne veulent ou ne peuvent expérimenter que sur un nombre réduit de sujets. Enfin, chaque expérimentateur emploie sa dilution préférée. Il s'ensuit que les futures enquêtes sur l'allergie à la lépromine ne seront que rarement comparables et que les discussions stériles à propos de la dilution de l'antigène risquent de durer aussi longtemps que celles concernant la classification de la lèpre.

Par contre, une expérimentation sérieuse, faite avec la lépromine standardisée dans plusieurs centres antilépreux du monde, permettrait sans doute d'adopter universellement la dilution de 1:50 comme lépromine intégrale pour la pratique clinique, et la dilution de 1:200 pour les enquêtes

épidémiologiques. Il en résulterait une économie appréciable d'antigène et les résultats observés seraient absolument comparables d'un pays à l'autre.

RESUME

L'auteur discute d'abord le problème de la dilution de la lépromine et déconseille l'emploi de dilutions trop fortes. Il n'est pas partisan d'ajouter des substances sans pouvoir antigénique à la lépromine diluée, cette adjonction ne provoquant qu'une réaction banale, irrégulière, surajoutée à la réaction allergique éventuelle, et non un "renforcement" de la réaction allergique.

L'auteur conclut que la standardisation de l'antigène constitue la mesure indispensable à une étude comparative approfondie de l'immunologie de la lèpre et annonce que le Service de la Lèpre de l'Institut Pasteur de Paris prépare actuellement une lépromine standardisée selon la technique de Mitsuda-Hayashi, modifiée par Wade. Pour obtenir gratuitement cet antigène, il suffit d'envoyer à ce service des nodules lépromateux, très riches en bacilles, prélevés aseptiquement, puis placés, sans addition de liquide, dans un tube en verre, qui est immédiatement scellé et stérilisé à 115° pendant 20 minutes.

Le Service de la Lèpre de l'Institut Pasteur de Paris prépare déjà cette lépromine standardisée en grande quantité. Les nodules, provenant de différentes parties du monde, sont sélectionnés après un examen bactériologique, puis pesés sur une balance de précision. Ils sont ensuite broyés très finement à trois reprises et filtrés au travers d'un tissu de nylon de contexture très serrée, toujours identique. La dilution finale est contrôlée et ajustée par mesure de la densité optique. Enfin, la répartition en ampoules ou en flacons est pratiquée à l'aide d'un agitateur électromagnétique et d'un rhéomètre à distribution continue. Cette lépromine standardisée contient donc d'un lot à l'autre une quantité pratiquement égale de bacilles. La lépromine standardisée est livrée gratuitement à chaque centre antilépreux, en ampoules de 2 ou de 10 doses et en flacons de 6 cc, au prorata du poids des nodules reçus.

L'auteur insiste sur le fait qu'il est encore beaucoup plus important que la lépromine diluée soit standardisée, puis étudiée dans différents pays, afin que l'on puisse déterminer la dilution optima. Il estime que cette expérimentation permettrait sans doute d'adopter universellement la dilution de 1:50 comme lépromine intégrale pour la pratique clinique et la dilution de 1:200, pour les enquêtes épidémiologiques. Il en résulterait une économie appréciable d'antigène et les résultats observés seraient absolument comparables d'un pays à l'autre.

ABSTRACT

Discussing the current fear that, as a result of sulfone treatment, there may be a critical shortage of nodule material of which to make lepromin, the author declares himself less pessimistic. Certain workers have been led to employ high dilutions, but although it is possible that less concentrated and therefore more economical dilutions

than the classical 1:20 one may be serviceable, he counsels against the great dilutions that have been used; also against the addition of "reinforcing" substances that have no antigenic value.

A practical difficulty is that in many places the leprosy workers are not equipped to prepare the antigen. At the request of the Société de Pathologie exotique the author has undertaken to prepare a standardized lepromin from sterile nodules that are sent him from overseas. The sender will receive an amount of the antigen, made by the Mitsuda-Hayashi technique as modified by Wade (1:30), corresponding to the amount of nodule-material sent. Standardization being important, care is taken to attain uniformity in the preparation of the different lots for distribution. The final concentration is determined by optical density.

This product, however, is not regarded as entirely satisfactory, because frequently it causes, in untreated lepromatous cases, small erythematous infiltrations which may be larger than 3 mm. in diameter and last more than four weeks. These are regarded as false reactions, probably due to the foreign bodies (tissue and bacilli) in the lepromin. It is desirable to eliminate the tissue elements as far as possible. To attain a more homogenous suspension of the bacilli, an attempt was made to break up the clumps and globi by ultrasonic treatment, but the activity of the product proved to be reduced because many of the bacilli were destroyed.

Concurrently, the author has experimented with less than normal concentrations, and he believes that a 1:50 dilution can be used for clinical work and a 1:200 dilution for epidemiological studies, although the late reactions to the latter are weaker. It is important that such dilutions should be standardized and studied in various parts of the world to determine the optimal dilution for universal adoption.

BIBLIOGRAPHIE

1. CHAUSSINAND, R. A propos de l'utilisation d'antigène dilué pour l'épreuve à la lépromine. *Bol. Serv. Saúde Públ. (Lisboa)* **3** (1956) 179.
2. CHAUSSINAND, R., VIETTE, M. et PRUDHOME, R. O. Note préliminaire sur la préparation d'une lépromine standardisée. *Bull. Soc. Path. exot.* **48** (1955) 784-788.
3. DINIZ, O. and NETO, H. A. Results of the use of dilute Mitsuda antigen. *Internat. J. Leprosy* **22** (1954) 144-146.
4. FLOCH, H. Sur l'intérêt de l'utilisation de lépromine diluée. *Bull. Soc. Path. exot.* **48** (1955) 367-371.
5. FLOCH, H. Enhancement of positivity of the Mitsuda reaction obtained with dilute antigen. *Internat. J. Leprosy* **23** (1955) 295-300.
6. HAYASHI, F. Mitsuda's skin reaction in leprosy. *Internat. J. Leprosy* **1** (1933) 31-38.
7. IGNACIO, J. L., PALAFOX, C. A. and JOSÉ, F. A., JR. Mitsuda reactions induced by repeated lepromin testing in children removed at birth from their leprous parents; failure of BCG to induce strong reactivity in persistently moderate reactors. *Internat. J. Leprosy* **23** (1955) 259-269.
8. LACOUR. Essai d'expérimentation sur la prophylaxie antilépreuse par le B. C. G. aux Iles Loyauté. Commission du Pacifique Sud, Section Santé, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 1955. (Mimeographed.)
9. LARA, C. B. Mitsuda's skin reaction (leprolin test) in young children of leprous parents. I. Observations on children from one to five years old. *Mo. Bull. Bur. Hlth. (Manila)* **19** (1939) 15-47.
10. LARA, C. B. Mitsuda's skin reaction (lepromin test) in children of leprous parents. II. Observations on newly-born to eighteen-month-old children. *Internat. J. Leprosy* **8** (1940) 15-28.
11. [ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (W. H. O.)] Comité d'Experts de la Lèpre. Premier Rapport, Rapports techniques No. 71, 1953.

12. PARDO-CASTELLÓ, V. and TIAN, F. R. Leprosy. Correlation of its clinical, pathologic, immunologic and bacteriologic aspects. *J. American Med. Assoc.* **121** (1943) 1264-1269.
13. SCHUJMAN, S. The use of dilute antigens in lepromin tests. *Internat. J. Leprosy* **23** (1955) 291-294.