

**Medicine.** — *Différenciation des protéines de poumon normal et de poumon intoxiqué par le phosgène au moyen de la réaction anaphylactique.* Par ONG SIAN GWAN.  
(Communicated by Prof. E. GORTER.)

(Communicated at the meeting of June 27, 1942.)

1. Dans un mémoire antérieur on a vu qu'on pouvait immuniser des cobayes et des souris contre une dose sûrement mortelle de phosgène en les soumettant préalablement à des doses non mortelles de phosgène<sup>1)</sup>. On peut expliquer ce résultat obtenu par la présence des protéines nouvelles, que nous avons mis en évidence par des méthodes physiques dans le poumon intoxiqué par le phosgène<sup>2)</sup>.

En utilisant une des réactions biologiques la plus spécifique, à savoir, le choc anaphylactique, nous pouvons maintenant montrer les différences entre les protéines de poumon normal et de poumon intoxiqué.

2. *Préparation de l'extrait pulmonaire.* Dans les expériences précédentes on a employé des poumons de porc frais qui furent ensuite traités par le phosgène. Il est clair que dans ce cas une partie de phosgène fut décomposée par le suc pulmonaire. L'action de phosgène sur les protéines pulmonaires serait ainsi moins active.

C'est pour cette raison que nous employons actuellement des poumons desséchés. L'avantage de ce poumon sec est qu'on peut le garder très longtemps et qu'on peut faire des expériences en série sur un même poumon.

La dessiccation du poumon a été effectuée sous vide ( $p \sim 2$  mm Hg) à la température de  $40^{\circ}$  C (fig. 1).

Le procédé d'intoxication et la préparation de l'extrait pulmonaire ont été décrits

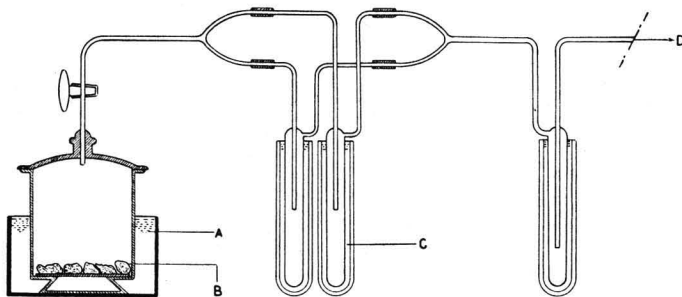


Fig. 1. Dispositif pour la dessiccation du poumon.

A, bain-marie à  $40^{\circ}$  C. B, poumon frais coupé en morceaux. C, air liquide, température  $-190^{\circ}$  C. D, pompe rotative à huile.

dans un mémoire précédent<sup>2)</sup>. Pour augmenter la dissolution des protéines de poumon, le mélange poumon et eau salée à 0,9 p. 100 fut agité pendant deux heures à l'aide d'un agitateur mécanique, dont la fréquence était de 80 par minute.

3. *Anaphylaxie active.* Dans toutes les expériences les cobayes employés étaient élevés par nous-même, ils donnaient une sensibilité constante vis-à-vis du choc anaphylactique. Le poids des animaux ne dépassait pas 300 gr. en général.

<sup>1)</sup> ONG SIAN GWAN, Proc. Ned. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, **44**, 205 (1941).

<sup>2)</sup> ONG SIAN GWAN, Ibid., **44**, 871 et 1024 (1941).

*Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué par le phosgène.* Dans ce groupe d'expériences les cobayes ont reçu une injection souscutanée (1 cc) d'un extrait de poumon de porc intoxiqué, correspondant à 1 mg de protéines. La quantité de protéines était déterminée par précipitation alcool-acétonique selon la méthode de KAYSER. On faisait 34 jours après l'injection déchainante, soit par l'extrait de poumon intoxiqué, soit par l'extrait de poumon normal. Le tableau 1 montre le résultat obtenu. On constate,

TABLEAU 1.

Anaphylaxie active. Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué de porc par injection souscutanée de 1 mg. de protéines.

N <sup>o</sup> ., sexe et poids des cobayes	Injection d'épreuve, faite 34 j. après la sensibilisation	Résultats	2 ème injection d'épreuve, faite 24 h. après la première	Résultats
1, f, 320 gr. albinos	8,9 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc grave, presque mortel	12,5 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	rien, survie désensibilisé
2, f, 335 gr. albinos	13,3 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 3 min. 9 sec.		
3, f, 385 gr. albinos	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 40 sec.		
4, f, 300 gr. albinos	8,9 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. souscutanée	rien	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc très léger, désensibilisé, survie
5, m, 385 gr. albinos	21,9 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc léger, dû à l'extrait pulmonaire	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	rien, désensibilisé, survie
6, f, 295 gr.	21,9 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	rien	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intracardiaque	choc moyen, désensibilisé, survie

Cobayes témoins, non sensibilisés.

7, m, 535 gr. albinos	8,9 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc léger, survie	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc léger, survie
8, m, 500 gr. albinos	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc léger, survie	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	rien, survie
9, f, 480 gr. albinos	21,9 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	rien, survie	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, injection échouée	survie

toutes conditions égales, que l'injection intraveineuse d'extrait de poumon intoxiqué provoquait un choc anaphylactique très grave ou mortel, tandis que l'injection d'extrait de poumon normal ne donnait pas de symptômes d'anaphylaxie.

Le cobaye 1 qui a survécu le choc anaphylactique très grave supportait le lendemain

une dose mortelle du même extrait de poumon intoxiqué. Il fut désensibilisé. Le même résultat a été obtenu avec le cobaye 4, qui a reçu d'abord une injection souscutanée d'extrait de poumon intoxiqué et 24 h. après une dose sûrement mortelle du même extrait par voie intraveineuse.

Il est à remarquer que l'injection d'extrait de poumon normal ne donnait pas de choc anaphylactique, mais qu'elle était capable de désensibiliser le cobaye vis-à-vis d'une dose mortelle d'extrait de poumon intoxiqué (cobayes 5 et 6). On pourrait expliquer ce résultat de deux manières; dans le premier cas on pourrait penser qu'il s'agirait d'une désensibilisation spécifique. On devrait concevoir que seulement une petite partie de la molécule protéique est modifiée par l'intoxication phosgénique. Les molécules de protéines normales injectées se combineront avec les anticorps anaphylactiques, il en résulterait une désensibilisation vis-à-vis de la dose mortelle de protéines modifiées.

Dans le deuxième cas, on pourrait penser qu'il s'agirait d'une désensibilisation non spécifique. On sait depuis longtemps que l'extrait de poumon est toxique pour l'animal. De plus l'injection d'extrait pulmonaire donne des symptômes, qu'on observe également dans le choc anaphylactique: prurit, hoquet, émission d'urine et de matières fécales, respiration fréquente, convulsion et paralysie. Il est donc probable que le choc léger, que l'animal a eu après l'injection d'extrait de poumon normal désensibilisera l'animal contre une dose mortelle d'extrait de poumon intoxiqué.

C'est pour cela qu'on a déterminé la toxicité des extraits de poumons normal et intoxiqué chez des cobayes neufs (cobayes témoins). Si par conséquent un cobaye sensibilisé était tué par une dose de protéines inférieure à la dose mortelle pour un cobaye neuf, on peut en conclure qu'il s'agirait d'un choc anaphylactique.

4. *Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon normal.* Dans le deuxième groupe d'expériences les cobayes ont reçu une injection souscutanée (1 cc) d'un extrait de poumon de porc normal, correspondant à 0,9 mg. de protéines. Trente jours après on faisait l'injection déchainante, soit par l'extrait de poumon normal, soit par l'extrait de poumon intoxiqué. Le tableau 2 montre que l'injection intraveineuse d'extrait de poumon

TABLEAU 2.

Anaphylaxie active. Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon normal de porc par injection souscutanée de 0,9 mg. de protéines.

N <sup>o</sup> ., sexe et poids des cobayes	Injection d'épreuve, faite 30 j. après la sensibilisation	Résultats	2 <sup>e</sup> me injection d'épreuve, faite 24 h. après la première	Résultats
1, f, 220 gr. albinos	5 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 52 sec.		
2, m, 245 gr.	5 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 40 sec.		
3, m, 220 gr. albinos	10 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 26 sec.		
4, f, 240 gr.	5 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc léger, survie	5 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc léger, désensibilisé, survie
5, m, 290 gr. albinos	5 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc léger, survie	5 mg. de protéines de poumon normal de porc, inj. intraveineuse	choc très léger, désensibilisé, survie
6, f, 240 gr. albinos	10 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 5 min. 32 sec.		

normal, contenant 5 mg. de protéines était déjà mortelle pour l'animal sensibilisé, tandis que la même quantité d'extrait de poumon intoxiqué ne donnait qu'un choc anaphylactique léger. L'extrait de poumon intoxiqué ne tuait le cobaye qu'à la dose de 10 mg. de protéines. Il y avait donc une différence quantitative entre les extraits de poumons normal et intoxiqué. On constate de plus que l'injection d'extrait de poumon intoxiqué désensibilisait le cobaye vis-à-vis de l'extrait de poumon normal. Ce résultat correspond à celui obtenu dans la première expérience, où l'injection d'extrait de poumon normal vaccinait le cobaye sensibilisé vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué contre une dose mortelle d'extrait de poumon intoxiqué. On pourrait ici également expliquer comme nous venons de faire plus haut.

5. *Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon de porc intoxiqué. Injection déchainante par l'extrait de poumon de vache normal ou intoxiqué.* Les résultats précédents montrent qu'on peut distinguer les protéines de poumon normal de celles de poumon intoxiqué au moyen du choc anaphylactique. On pourrait se demander, s'il ne se formerait pas un groupement spécifique dans la molécule de protéine après l'action du phosgène. Dans ce cas on devrait obtenir le même résultat en injectant chez un cobaye sensibilisé vis-à-vis du poumon de porc intoxiqué, soit l'extrait de poumon intoxiqué correspondant, soit l'extrait de poumon intoxiqué d'un autre espèce.

À cet effet six cobayes ont été sensibilisés par une injection souscutanée (1 cc) d'extrait de poumon de porc intoxiqué, correspondant à 1 mg. de protéines. Trente trois jours après on faisait l'injection déchainante, soit par l'extrait de poumon intoxiqué de vache, soit par l'extrait de poumon normal de vache. En même temps on injectait également l'extrait de poumon de porc correspondant pour savoir si la sensibilisation a eu lieu. Les cobayes 1 et 2 ainsi éprouvés par injection intraveineuse d'extrait de poumon intoxiqué de porc montraient le premier un choc anaphylactique moyen, parce qu'une partie du liquide injecté restait sous la peau et le deuxième un choc anaphylactique mortel (tableau 3). Comparons les cobayes 3 et 4 avec les cobayes 5 et 6. Les deux premiers

TABLEAU 3.

Anaphylaxie active. Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué de porc par injection souscutanée de 1 mg. de protéines.

N <sup>o</sup> ., sexe et poids des cobayes	Injection d'épreuve, faite 33 j. après la sensibilisation	Résultats	2 <sup>e</sup> ème injection d'épreuve, faite 24 h. après la première	Résultats
1, f, 193 gr.	10 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse et souscutanée	choc moyen, survie	20 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	rien, survie
2, m, 410 gr. albinos	11,6 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc suraigu mortel		
3, m, 240 gr.	10 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc mortel en 4 min. 2 sec.		
4, f, 310 gr.	20 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc mortel en 1 min. 15 sec.		
5, m, 340 gr.	5,2 mg. de protéines de poumon normal de vache, inj. intraveineuse	rien, survie	20 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc très grave, presque mortel
6, m, 235 gr.	10,4 mg. de protéines de poumon normal de vache, inj. intraveineuse	choc mortel en 6 min. 4 sec.		

## Cobayes témoins, non sensibilisés.

7, m, 440 gr. albinos	10 mg. de protéines de poumon intoxiqué de <i>vache</i> , inj. intraveineuse	choc léger, survie		
8, f, 372 gr.	20 mg. de protéines de poumon intoxiqué de <i>vache</i> , inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 57 sec.		
9, m, 400 gr. albinos	10,4 mg. de protéines de poumon normal de <i>vache</i> , inj. intraveineuse	choc léger, survie		
10, m, 273 gr. albinos	20,8 mg. de protéines de poumon normal de <i>vache</i> , inj. intraveineuse	choc prolongé mortel en 10 min. 32 sec.		

ont reçu 10 et 20 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, tous sont morts d'un choc anaphylactique. Les deux derniers ont reçu 5,2 et 10,4 mg. de protéines de poumon normal de vache; le cobaye 5 a survécu, tandis que le cobaye 6 a succombé. Ce résultat montre qu'il n'y a pas de différence entre les protéines de poumons normal et intoxiqué de vache. En effet, les deux protéines tuaient le cobaye à la dose de 10 mg. Mais on peut en conclure, que les protéines normales aussi bien que les protéines intoxiquées de poumon de vache donnaient un choc anaphylactique mortel chez des cobayes sensibilisés vis-à-vis du poumon intoxiqué de porc. Cette conclusion est exacte, puisque les cobayes neufs (cobayes témoins 7 et 9) supportaient la même quantité de protéines normales ou modifiées. Il s'agissait probablement d'une anaphylaxie spécifique pour les organes.

Comparons ensuite le cobaye 1 avec le cobaye 5. Le premier a reçu une injection d'extrait de poumon intoxiqué de porc, il était complètement désensibilisé vis-à-vis du même extrait. Le cobaye 5 par contre a reçu d'abord l'extrait de poumon normal de vache et a ensuite été injecté par l'extrait de poumon intoxiqué de porc. Il était très peu ou pas désensibilisé vis-à-vis de cet extrait, puisque le choc était très grave et presque mortel. Les protéines du poumon intoxiqué de porc ont donc une action désensibilisante plus prononcée que celles du poumon normal de vache.

Il faut remarquer que l'extrait de poumon de vache était plus toxique que celui de poumon de porc. On peut le voir en comparant les cobayes témoins dans les tableaux 1 et 3.

6. *Anaphylaxie passive.* A l'aide de l'anaphylaxie passive on peut maintenant montrer qu'il existe un groupement moléculaire identique, dû à l'intoxication phosgénique, dans la molécule de protéines de différentes espèces.

La sensibilisation passive a été réalisée par injection souscutanée (4 cc) ou intrapéritonéale d'un sérum de lapin préparé par plusieurs injections intraveineuses d'extrait de poumon intoxiqué de porc. Le lendemain les animaux furent éprouvés par injection intraveineuse d'extrait de poumon normal ou intoxiqué. Le tableau 4 montre qu'on peut ainsi obtenir une anaphylaxie passive vis-à-vis de l'extrait de poumon correspondant (cobayes 1 et 2). En comparant les résultats obtenus chez les cobayes 3 et 4 avec ceux obtenus chez les cobayes 5 et 6 on constate une différence nette. Tandis que les cobayes 3 et 4 supportaient respectivement 5 et 10 mg. de protéines de poumon normal de vache, les cobayes 5 et 6 par contre ont eu le premier un choc anaphylactique grave et presque mortel et l'autre un choc anaphylactique mortel après l'injection de 5 et de 8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache. Remarquons que la dose de protéines injectées n'était pas mortelle pour un cobaye neuf (tableau 3, cobayes témoins 7 et 9). Il est clair qu'il existe une différence nette entre les protéines de poumon normal et celles de poumon intoxiqué de vache chez le cobaye sensibilisé vis-à-vis des protéines de poumon

TABLEAU 4.

Anaphylaxie passive. Sensibilisation vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué de porc par injection souscutanée de 4 cc de sérum de lapin immunisé contre le poumon intoxiqué \*).

N <sup>o</sup> ., sexe et poids des cobayes	Injection d'épreuve, faite 24 h. après la sensibilisation	Résultats	2 <sup>e</sup> me injection d'épreuve, faite 24 h. après la première	Résultats
1, f, 210 gr. albinos	15 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc presque mortel	8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intrapéritonéale	rien, survie
2, f, 200 gr. albinos	15 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intraveineuse	choc mortel en 2 min. 16 sec.		
3, f, 215 gr.	5 mg. de protéines de poumon normal de vache, inj. intraveineuse	choc très léger, survie	15 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. intracardiaque	choc prolongé, mort en 22 min. 3 sec.
4, f, 240 gr.	10 mg. de protéines de poumon normal de vache, inj. intraveineuse	choc très léger, survie	8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc prolongé avec paralysie, survie
5, f, 210 gr. albinos	5 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc aigu presque mortel	15 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc	choc aigu, mort en 2 min. 37 sec.
6, f, 255 gr. albinos	8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc suraigu, mort en 2 min. 2 sec.		
7, m, 305 gr. albinos	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. souscutanée	rien	8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc moyen, survie
8, f, 290 gr. albinos	17,8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de porc, inj. souscutanée	rien	8 mg. de protéines de poumon intoxiqué de vache, inj. intraveineuse	choc grave, survie

intoxiqué de porc. Il existe donc un groupement moléculaire identique dans les protéines de poumon intoxiqué de porc et de vache.

Si maintenant on recherche la désensibilisation, on constate que les cobayes 1, 7 et 8, qui ont reçu l'extrait de poumon intoxiqué de porc, pouvaient supporter une dose mortelle d'extrait de poumon intoxiqué de vache, tandis que les cobayes 3 et 4, qui ont reçu l'extrait de poumon normal de porc, ne supportaient pas l'extrait de poumon intoxiqué de porc ou de vache. Le même résultat a déjà été obtenu par le cobaye 5 dans le tableau 3. Chez le cobaye 4, la deuxième injection d'épreuve a été faite 29 j. après la première. Le résultat devrait être plus net si l'on faisait la deuxième injection d'épreuve peu après la première, parce qu'on sait que l'anaphylaxie passive est passagère. On voit que le cobaye 5 qui a reçu l'extrait de poumon intoxiqué de vache n'était pas désensibilisé vis-à-vis de l'extrait de poumon intoxiqué de porc. On pourrait l'expliquer comme suit: les protéines de poumon intoxiqué de vache pourront seulement saturer une

\*) Le cobaye 1 a été sensibilisé par injection intrapéritonéale de 2 cc de sérum et la deuxième injection d'épreuve, en même temps avec le cobaye 4, a été réalisée 29 j. après la première.

petite partie d'anticorps anaphylactiques par leur groupement moléculaire identique, formé par l'action de phosgène. La plus grande partie d'anticorps anaphylactiques resteront cependant libres et l'injection de protéines correspondantes provoquerait un choc anaphylactique mortel.

On pourrait également expliquer les faits obtenus en supposant que l'extrait de poumon intoxiqué se composait d'un mélange de protéines normales et de protéines modifiées. Les protéines normales se combineront seulement avec les anticorps provoqués par ces protéines, de même les protéines modifiées avec les anticorps correspondants. Cependant une partie des expériences rapportées n'est pas en faveur de cette hypothèse.

Les résultats obtenus ci-dessus se rapprochent beaucoup de ceux obtenus par des méthodes physiques<sup>2)</sup>. En effet, les mesures de l'indice de réfraction, du pouvoir rotatoire et les spectres d'absorption de protéines du poumon normal ou intoxiqué montrent qu'il existe une différence nette entre ces deux protéines. Ils montrent de plus que la différence devrait être causée par une modification chimique superficielle de la molécule de protéine. C'est ce que nous pouvons confirmer en nous servant de la réaction anaphylactique.

Ce travail a été poursuivie au Laboratoire KAMERLINGH ONNES et à l'Institut voor Praeventieve Geneeskunde (Directeur J. P. BIJL) à Leyde.

#### Résumé.

1. Au moyen de la réaction anaphylactique on peut montrer une différence nette entre les protéines de poumon normal et celles de poumon intoxiqué par le phosgène de la même espèce animale.
2. Les protéines de poumon intoxiqué de différentes espèces ont un groupement moléculaire identique, formé par l'action de phosgène.
3. Ce groupement moléculaire identique doit être rattaché à une petite partie de la molécule protéique.
4. Il existe probablement une anaphylaxie spécifique pour le poumon.