

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser **VIII**, 6.

TOXINE ET ANTITOXINE DIPHTHÉRIQUES

PAR

TH. MADSEN ET S. SCHMIDT

(INSTITUT SÉROLOGIQUE DE L'ÉTAT DANOIS)



KØBENHAVN

HOVEDKOMMISSIONÆR: ANDR. FRED. HØST & SØN, KGL. HOF-BOGHANDEL

BIANCO LUNOS BOGTRYKKERI A/S

1930

Pris: Kr. 2,00.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs videnskabelige Meddelelser udkommer fra 1917 indtil videre i følgende Rækker:

Historisk-flologiske Meddelelser,
Filosofiske Meddelelser,
Mathematisk-fysiske Meddelelser,
Biologiske Meddelelser.

Hele Bind af disse Rækker sælges 25 pCt. billigere end Summen af Bogladepriserne for de enkelte Hefter.

Selskabets Hovedkommissionær er *Andr. Fred. Høst & Søn*,
Kgl. Hof-Boghandel, København.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.
Biologiske Meddelelser **VIII**, 6.

TOXINE ET ANTITOXINE DIPHÉTÉRIQUES

PAR

TH. MADSEN ET S. SCHMIDT
(INSTITUT SÉROLOGIQUE DE L'ÉTAT DANOIS)



KØBENHAVN

HOVEDKOMMISSIONÆR: ANDR. FRED. HØST & SØN, KGL. HOF-BOGHANDEL

BIANCO LUNOS BOGTRYKKERI A/S

1930

Au commencement de l'année 1926¹, nous avons présenté les premiers résultats d'une série de recherches concernant la réaction qui se produit entre la toxine et l'antitoxine diphtériques. Ces recherches ont été continuées depuis et quelques publications ont paru déjà sur ce sujet². Dans le présent mémoire, nous nous proposons d'exposer les résultats de nos plus récentes expériences et de formuler les conclusions auxquelles elles donnent lieu.

Indiquons tout d'abord brièvement les conditions de préparation des toxines et des sérums utilisés dans nos expériences:

Les toxines sont presque toutes produites avec la souche américaine Park Williams No. 8 et au moyen du bouillon MARTIN³. Si quelques expérimentateurs se sont heurtés à

¹ Kgl. D. Vidensk. Biol. Medd. 1926, V, 9.

² C. R. Acad. Sciences, 1927, 185, 1080; Z. f. Immunforsch. 1928, 59, 82.

³ Deux auteurs, BRONFENBRENNER et REICHERT (Journ. exp. Med. 1926, 44, 553), ayant entrepris des expériences avec du poison botulinique et son antitoxine, ont émis l'opinion que le phénomène de floculation et la réaction anticorps: antigène seraient deux processus indépendants et qu'ils ne coïncideraient que »par hasard«. Si plusieurs expérimentateurs ont trouvé un accord satisfaisant entre la réaction de floculation et la neutralisation entre toxine et antitoxine, cela est probablement dû (d'après les auteurs mentionnés ci-dessus) au fait que presque tous les laboratoires se servent de la même souche de bacille pour la production des toxines.

Ces auteurs craignent que le dit parallélisme s'efface si une autre souche de bacille est employée.

Disons seulement qu'il s'agit ici d'une hypothèse nullement vérifiée par l'expérience. Au contraire, nous avons produit des toxines avec des souches d'origine différente et nous n'avons jamais constaté aucune

des difficultés en essayant de faire une forte toxine dans ce milieu, cela s'explique certainement par le fait que le bacille n'a pas été accoutumé préalablement au milieu¹, car en général, on peut augmenter les propriétés toxigènes du bacille en faisant un nombre suffisant de repiquages dans le bouillon MARTIN.

Pour la production de toxine, nous nous servons de ballons du même modèle que ceux employés dans le laboratoire du DR. L. MARTIN à l'Institut Pasteur et nous avons pu constater que la toxine formée était dans ce cas plus forte que lorsque nous nous servions de vases d'ERLENMEYER. La culture est filtrée sur papier le dixième jour et le liquide clair, après addition d'un peu de toluol, est conservé à une température voisine de 0°.

Les sérums sont gelés et conservés à la température de 15° au-dessous de zéro.

Voici maintenant la terminologie employée dans ce mémoire: Les propriétés spécifiques des toxines sont indiquées par le nombre au cc de: 1) d. m. m. (doses minimales mortelles) sur des cobayes, 2) $L\frac{1}{2}$ (mélange d'une unité antitoxique avec toxine en quantité suffisante pour tuer un cobaye de 250 gr. en 4 jours), 3) unités antigéniques.

différence, même minime, entre des toxines préparées avec la souche américaine ou d'autres souches déjà cultivées pendant longtemps dans le laboratoire ou encore avec celles qui étaient récemment isolées.

A titre d'exemple, nous mentionnerons une souche isolée d'un cas très grave de diphtérie (mortelle). Après quelques passages dans du bouillon MARTIN elle a été immédiatement utilisée à la préparation de la toxine. Ce bacille présentait un développement luxurieux avec formation d'un voile abondant déjà après 18 heures. La culture filtrée au dixième jour donnait un poison actif (5—7 unités antigéniques au cm³) qui ne se distinguait en rien des bouillons diphtériques préparés avec d'autres souches.

¹ WILCOX, H. Journ. Inf. Dis. 1922, **30**, 536. SCHMIDT, S. Annal. Pasteur 1925, **39**, 875.

Les deux premières expressions sont déjà utilisées partout. La troisième, introduite récemment par RAMON, demande à être expliquée: Par une unité antigénique (correspondant à Lf , limite of flocculation, d'après GLENNY & OKELL) nous entendons la quantité de toxine qui, en présence d'une unité antitoxique, donne la floculation initiale. Si p. ex. celle-ci apparaît avec 0,1 cc, cette toxine contient 10 unités antigéniques par centimètre cube.

4) L'indice Kf (du χρόνος, temps) exprime le temps (en heures et minutes) qui s'écoule entre l'établissement du contact toxine-antitoxine et le moment où apparaît le précipité indicateur.

5) Dans un sens analogue l'abréviation Kn indique le temps de neutralisation c'est-à-dire l'intervalle qui s'écoule entre le moment où sont mis en contact l'antigène et l'anticorps, et le moment de l'équilibre du processus $T + A \rightleftharpoons TA$ ¹.

Dans l'immunologie on s'est souvent servi de l'expression »avidité« pour caractériser l'intensité avec laquelle un sérum se combine avec la toxine spécifique. Pour nous, ce terme est synonyme avec la vitesse de réaction entre les deux composants. Ainsi un sérum avec une »grande avidité« indique un sérum, dont la réaction avec la toxine est rapide, etc.

Nous avons envisagé ainsi les aspects suivants du problème toxine—antitoxine.

1. Titrage in vitro de différentes toxines vis-à-vis d'un sérum étalon.

2. Titrage in vitro de différents sérums vis-à-vis d'une toxine étalon.

3. Parallélisme entre les expériences faites d'une part in vitro et, d'autre part, in vivo?

¹ T = toxine, A = antitoxine, TA = toxine—antitoxine (complexe).

4. Relation entre vitesse de floculation et vitesse de neutralisation?

5. Dissociation du complexe *TA*.

6. Titre antitoxique des divers sérums déterminé simultanément sur cobayes (injection par la voie sous-cutanée) et sur lapins (injection par la voie intra-veineuse).

7. Relation entre le pouvoir curatif de l'antitoxine et son avidité avec la toxine.

1. La vitesse de floculation entre des toxines différentes et un sérum étalon.

Dans un travail antérieur, l'un de nous¹ a fait remarquer qu'il n'existe aucun rapport entre la toxicité »actuelle« d'une toxine et la rapidité de sa floculation avec du sérum antitoxique présenté en proportions convenables. On peut constater qu'une toxine »forte« réagit assez lentement avec l'antitoxine et vice-versa. D'autre part, dans certaines circonstances, il existe une relation entre le contenu en matières antigènes d'une toxine et la vitesse avec laquelle elle neutralise le sérum *in vitro*. On s'en rendra compte en regardant les tableaux No. 1 a et 1 b.

La valeur $L\dot{\gamma}$ est indiquée par le nombre de doses $L\dot{\gamma}$ pr. cc; si par exemple on trouve la valeur 10 dans le tableau, cela veut dire que la valeur absolue est égale à 0,1 cc.

Dans la première colonne des tableaux se trouvent les numéros de préparations des toxines. La deuxième contient leur valeur antigène exprimée en unités antigéniques au cc. Vient ensuite l'indication du temps de floculation (Kf) en minutes. Dans les deux dernières rubriques sont réunies les valeurs d. m. m. et $L\dot{\gamma}$ des toxines.

Il ressort de l'examen de ces tableaux que les valeurs Kf dépendent du nombre d'unités antigéniques de la toxine

¹ S. SCHMIDT, *Annal. Pasteur* 1925, **39**, 875.

Tableau No. 1 a.
Montrant la vitesse de floculation de toxines différentes
vis-à-vis d'un sérum étalon.

Toxine No.	Unités antigéniques au cc	<i>Kf</i> en minutes	d. m. m. au cc	<i>Lf</i> au cc
46	13,2	13	1100	11
36	10,0	15	800	10
38 a	11,2	»	600	10,5
45	11,3	»	»	11
34	10,5	20	»	8,25
35	11,0	»	500	8,0
44	9,94	»	600	8,5
30	10,0	25	500	9,1
42	10,0	»	600	8,0
41	9,9	26	»	»
43	9,0	28	400	7,7
40	8,8	30	300	6,5
38 e	7,8	40	400	6,6
38 b	7,0	42	550	»
31	7,5	45	300	»
37	7,0	50	250	6,5
28 e	5,1	55	»	»
26 c	5,8	»	»	»
38 c	4,9	65	400	4,0
38 d	6,3	»	250	5,0
26 b	4,3	75	»	»
32	4,9	80	250	5,9
28 b	3,1	85	»	»
26 d	3,0	105	»	»

Sérum étalon no. 717; 140 U. A. au cc.

et non de la toxicité exprimée par le nombre de doses mortelles, ou par les valeurs *Lf*.

Les différences, en effet, sont considérables. Les toxines riches en unités antigéniques (10 au cc et plus) présentent une vitesse de floculation de cinq à sept fois plus grande que celle des toxines faibles en pouvoir antigénique (environ 3 unités au cc).

Tableau No. 1 b.

Toxine No.	Unités antigéniques au cc	<i>Kf</i> en minutes	d. m. m. au cc	<i>L</i> † au cc
48	13,2	25	900	11,0
49	12,3	30	1000	11,0
50	12,0	»	»	9,0
54	11,7	40	900	8,5
52	11,0	45	1000	»
53	10,5	»	»	»
51	7,7	60	550	6,6

Sérum étalon no. 786; 220 U. A. au cc.

En considérant ces résultats, il faut tenir compte de ce qu'il s'agit de toxines mesurées immédiatement après la sortie de la culture de l'étuve et sa filtration. En vieillissant, un bouillon diphtérique perd, on le sait, rapidement une partie de sa nocivité tout en gardant le caractère antigène. Il est intéressant de noter que l'avidité vis-à-vis de l'anti-toxine — liée à la fonction antigène — reste, elle aussi, indemne, à la condition que la température ambiante soit voisine de zéro. A titre d'exemple, nous citerons une toxine âgée de 30 ans environ. Ce produit, dont la toxicité correspondait à 3—400 d. m. m. au cc lorsqu'elle était fraîche, a diminué en pouvoir toxique de telle sorte que la d. m. m. actuelle est égale à 0,02 cc. Elle titre 5 unités antigéniques au cc et la valeur *Kf* est de 85 min. Une toxine fraîche du même pouvoir neutralisant (5,3 unités au cc) floccule en présence du même sérum étalon en 80 min. Le long vieillissement pendant lequel la toxine a perdu beaucoup de son caractère vénéneux n'a donc apporté aucune modification à la fonction flocculante, ni vraisemblablement non plus au pouvoir antigène.

Les divers antiseptiques agissent différemment sur la toxine. Le toluol et le quinosol ne la modifient aucunement tandis que le phénol, les crésols, etc. détruisent partiellement ou complètement son pouvoir flocculant.

Une toxine qui nous était envoyée d'un autre laboratoire présentait une valeur Kf de 2^h, quoique son pouvoir antigène fût égal à 11 unités au cc. Et nous attribuons ce fait au contenu en phénol de cette toxine.

On ne peut pas établir, en règle générale, de parallélisme absolu entre le pouvoir antigène et la vitesse de flocculation des toxines.

2. Vitesse de flocculation de divers sérums antidiphtériques vis-à-vis d'une toxine étalon.

En examinant toute une série de sérums antidiphtériques provenant d'individus différents, on est frappé par les grandes variations que présente la vitesse de flocculation. Le tableau No. 2 montre les détails d'un grand nombre d'examens.

La première rubrique contient le nombre des sérums examinés. Dans la deuxième rubrique se trouvent les valeurs Kf en minutes mesurées à 40° C. (bain-marie). Dans la troisième sont indiqués les titres antitoxiques. P. ex. 11 sérums avec la même valeur, Kf 40 min., avaient des valeurs antitoxiques variant de 435 à 1580.

Le titre est déterminé au moyen d'une toxine étalon renfermant 7—8 unités au cc. On voit que la majorité des sérums examinés a une vitesse de flocculation correspondant à des valeurs Kf comprises entre 30 et 120 minutes.

Il sérums réagissent plus rapidement avec la toxine ($Kf = 12—30$ minutes) tandis que 9 présentent des valeurs Kf beaucoup plus grandes (entre 2 et 30 heures). Il ressort

Tableau No. 2.

Indiquant le temps de floculation d'une série de sérums antidiphtériques des titres variables.

Nombre de sérums	<i>Kf</i> à 40° min.	U. A. au cc	Nombre de sérums	<i>Kf</i> à 40° min.	U. A. au cc
1	12	85	4	90	400—1000
1	15	250	1	95	175
1	17	40	2	100	185— 600
4	25	95— 850	3	105	300—1500
4	30	515—1000	1	110	800
8	35	250—1340	2	115	400— 500
11	40	435—1580	1	120	450
9	45	210—1000	1	150	500
8	50	400—1200	1	180	800
6	55	300—1000	1	210	300
11	60	250—1300	1	240	300
3	65	700—1100	1	270	1000
1	70	250	1	480	95
5	75	560—1050	1	840	150
2	80	450— 815	1	1800	50
3	85	21— 700			

de ce tableau qu'il n'existe aucun rapport entre le temps de floculation et le titre antitoxique d'un sérum. Un sérum faible en antitoxine peut s'emparer très avidement de l'antigène et réciproquement. La valeur *Kf* varie donc beaucoup pour les sérums provenant d'individus différents. D'un autre côté, un seul animal producteur fournira très souvent d'une saignée à l'autre un sérum dont l'antitoxine présente une avidité constante avec la toxine, tandis que son titre subit des oscillations considérables.

Trois chevaux producteurs d'antitoxine diphtérique étaient saignés à des intervalles d'un mois environ. La vitesse de floculation et le titre étaient déterminés par la méthode de RAMON. Tandis que le titre varie d'une saignée à l'autre, la valeur de *Kf* reste assez constante.

Tableau No. 3.

Montrant le titre antitoxique et la vitesse de floculation des sérums de quelques chevaux producteurs, d'une saignée à l'autre.

No.	Date de la saignée	U. A. au cc	<i>Kf</i> à 40°
752	²⁰ / ₉ 28	1300	145
	³ / ₁₁ 28	1000	125
	⁶ / ₁₂ 28	700	135
	²³ / ₁ 29	925	90
	⁴ / ₃ 29	800	110
788	²⁵ / ₁₀ 28	1550	55
	¹⁷ / ₁₁ 28	1600	55
	¹⁵ / ₁₂ 28	1000	55
	⁷ / ₁ 29	1450	60
	⁸ / ₂ 29	1580	40
805	¹¹ / ₁₂ 28	1000	35
	²³ / ₁ 29	1050	35
	¹³ / ₃ 29	700	30

Si l'on suit la formation d'antitoxine dans le sang d'un animal neuf soumis à l'immunisation antidiphtérique, on peut constater les plus grandes variations du temps de floculation. Nous donnons, à titre d'exemple, les résultats du titrage du sérum du cheval No. 802 au cours de l'immunisation. Au début de l'immunisation, le sérum réagissait si difficilement avec la toxine qu'il n'était pas possible de procéder au titrage par la méthode de floculation. Le 21 novembre le temps de floculation était de 109 minutes, après quoi il est tombé brusquement, dans l'espace de 24 heures, à 32 minutes. Entre le 22 novembre et le 7 février nous n'avons constaté par des titrages presque quotidiens qu'une légère variation de la valeur *Kf*, celle-ci étant de 25—55 minutes.

Tableau No. 4.

Date des injections	Cheval No. 802 toxine	Immunisé avec de l'anatoxine diphtérique			
		quantité	saignée	titre du sérum en U. A. au cc	Kf à 40° en minutes
5/11 28	Anatoxine	0,3 cc			
6/11 —	No. 41/28	—			
7/11 —	Lf = 9,9	—			
8/11 —	au cc	1,0 -			
9/11 —		—			
10/11 —		—			
12/11 —		3,0 -			
13/11 —		—			
14/11 —		—			
15/11 —		10,0 -			
16/11 —		—			
17/11 —		—			
19/11 —		15,0 -			
20/11 —		20,0 -			
21/11 —		30,0 -		11	109
22/11 —		50,0 -		15	32
23/11 —		75,0 -		38	40
24/11 —		100,0 -		57	33
26/11 —				125	25
27/11 —				180	31
28/11 —				210	38
29/11 —		200,0 -		215	49
30/11 —				240	48
1/12 28				275	48
3/12 —				300	51
4/12 —				300	51
5/12 —				320	52
6/12 28	Anatoxine	400,0 -		345	49
7/12 —	No. 42/28			375	48
8/12 —	Lf = 10,0			360	40
9/12 —					
10/12 —				360	43
11/12 —				340	45
12/12 —		600,0 -		360	40
13/12 —				380	40
14/12 —				400	40
15/12 —				400	40
17/12 —				410	45

Tableau No. 4 (suite).

Date des injections	Cheval No. 802 toxine	Immunisé avec de l'anatoxine diphtérique			
		quantité	saignée	titre du sérum en U. A. au cc	Kf à 40° en minutes
18/12 28	Anatoxine No. 42/28 Lf = 10,0		9 litres	410	45
19/12 —				380	50
20/12 —			6 litres	380	50
21/12 —				320	45
22/12 —				—	—
24/12 —				—	—
27/12 —				—	—
28/12 —				285	45
29/12 —				—	50
31/12 —				255	50
2/1 29	Toxine diphtérique A 29 Lf = 9,9			—	—
3/1 —				—	48
4/1 —				225	—
5/1 —				—	—
7/1 —		200,0 cc		200	53
8/1 —				—	—
9/1 —				—	—
10/1 —				190	60
11/1 —				185	55
12/1 —				200	51
14/1 —		400,0 -		345	50
15/1 —				—	—
16/1 —				420	47
17/1 —				460	—
18/1 —				500	42
19/1 —				—	40
21/1 —		600,0 -	8 litres	460	—
22/1 —				420	—
23/1 —			7 litres	450	45
24/1 —				410	40
25/1 —			415	40	
26/1 —			410	40	
28/1 —			420	37	
29/1 —			—	—	
30/1 —			—	—	
31/1 —			400	—	
1/2 29			420	35	
2/2 —			420	—	

Tableau No. 4 (suite).

Date des injections	Cheval No. 802 toxine	Immunisé avec de l'anatoxine diphtérique			
		quantité	saignée	titre du sérum en U. A. au cc	<i>Kf</i> à 40° en minutes
$\frac{4}{2}$ 29	Toxine			400	37
$\frac{5}{2}$ —	diphtérique			370	—
$\frac{6}{2}$ —	A 29			360	40
$\frac{7}{2}$ —	<i>Lf</i> = 9,9			350	40

D'autres individus produisent dès le début de l'immunisation un sérum qui peut être titré facilement par la méthode de floculation, même à l'époque où le titre antitoxique est très bas (2—3 unités au cc), et présentent une constance plus prononcée encore en ce qui concerne le temps de floculation du sérum avec la toxine.

Quelquefois, la valeur *Kf* peut subir de grandes variations dans le sérum provenant d'un individu. Ces variations s'observent surtout lorsque l'organisme immunisé vient de recevoir une nouvelle quantité d'antigène ou bien lorsqu'il contracte une infection accidentelle. Par exemple, nous avons vu ce phénomène pour le cheval No. 539 qui, après une primo-immunisation antidiphtérique, a été soumis au traitement par la toxine tétanique. Avant l'introduction dans son organisme du dernier antigène, l'animal avait fourni du sérum antidiphtérique floculant avec la toxine en 15 minutes. Pendant l'immunisation antitétanique les vaccinations avec la toxine diphtérique ont été suspendues. Pendant la baisse du titre antidiphtérique, l'antitoxine tétanique est apparue dans le sang (le titre correspondait à 200 U. A. au cc). Mais la chute des antitoxines diphtériques était accompagnée d'une augmentation de la valeur *Kf*; celle-ci, en effet, montait de 15 minutes à 1 heure.

La reprise des injections de toxine diphtérique a été suivie d'une production abondante de l'antitoxine correspondante — ascension rapide du titre jusqu'à 1200 U. A. —, mais la vitesse de floculation vis-à-vis de la toxine diphtérique resta désormais constante (1 heure). Chose singulière, le temps de neutralisation déterminé par injection dans les veines des lapins des mélanges toxine-sérum était de 0^b avant l'apparition de l'antitoxine tétanique dans le sérum, et n'a été aucunement modifié malgré l'oscillation du temps de floculation.

Nous avons d'ailleurs eu l'occasion de constater qu'une introduction trop abondante de toxine dans l'organisme peut provoquer une hausse dans la valeur *Kf* du sérum, surtout si l'état de santé de l'animal est altéré¹. Voilà une raison pour procéder désormais aussi doucement que possible à l'immunisation des animaux (voir tableau No. 5).

On voit qu'au début de l'immunisation le sérum flocule rapidement avec la toxine. Mais après l'injection de 600 cc de toxine — ce qui amena un affaiblissement général de l'animal — la *Kf* remonte rapidement jusqu'à plus de sa double valeur.

3. Parallelisme entre les titrages *in vitro* et *in vivo*.

Si l'on consulte le tableau No. 6 ou se rendra compte que la méthode de RAMON fournit des résultats étant d'accord — dans la plupart des cas — avec ceux qu'on obtient en procédant selon la technique indiquée par EHRLICH. La concordance, en effet, est si grande que la méthode de RAMON permet de suivre les fluctuations du titre antitoxique dans le sang d'un animal pendant la période d'immunisation. Cependant, il est des exceptions: ainsi les sérums dont l'avidité est très grande pour la toxine, présentent en général un titre inférieur *in vitro* à celui

¹ Nous sommes là en concordance avec les faits communiqués par LOCKE, MAIN & MILLER. Journ. Inf. Dis. 1927, 41, 32.

Tableau No. 5.

Cheval No. 757 date des injections	Toxine	Titre du sérum	
		U. A. au cc	Kf min.
16/7 28	2,5 cc		
17/7 —	—	12	40
18/7 —	—	15	20
19/7 —	—	17	15
20/7 —	—	19	15
21/7 —	{ injection du chlorure de manganèse }	19	15
23/7 —	17 cc	27	19
24/7 —	—	27	15
25/7 —	25 cc	29	15
26/7 —	—	29	15
27/7 —	75 cc	28	15
28/7 —	100 -	35	19
30/7 —	{ injection du chlorure de manganèse }	30	20
31/7 —	—	30	28
1/8 28	—	30	37
2/8 —	125 cc		
6/8 —	200 -		
9/8 —	400 -		
10/8 —	{ injection du chlorure de manganèse }		
11/8 —	—		
14/8 —	—	130	40
15/8 —	—		
16/8 —			
17/8 —			
18/8 —			
20/8 —	{ 600 (à la moitié de la toxine était ajouté du tapioca 3 0/0) }		
21/8 —	{ chlorure de manganèse }		
22/8 —	—	185	115
23/8 —	—	185	100

indiqué par la mesure in vivo; tandis que les sérums réagissant lentement avec la toxine montrent des propriétés inverses (tableau No. 6).

Tableau No. 6.

Montrant les résultats d'un titrage d'un nombre de sérums, fait simultanément par la méthode de RAMON et par la méthode d'EHRlich.

Sérum No.	Titre d'après		Kf
	RAMON	EHRlich	
754	95	160	12 ^m
539	140	250	15 ^m
748	30	56	20 ^m
812	635	600	30 ^m
811	1000	1000	—
799	560	560	35 ^m
805	850	800	40 ^m
806	525	500	—
824	1300	1250	45 ^m
802	1125	1250	47 ^m
778	625	560	50 ^m
782	550	550	—
823	800	710	—
788	1550	1600	55 ^m
775	775	710	—
760	800	800	—
803	1100	1100	60 ^m
752	1300	1300	70 ^m
825	360	350	100 ^m
737	120	75	8 ^h
789	125	40	8 ^h
486	57	40	14 ^h

Comme on voit, la majeure partie des sérums mentionnés dans ce tableau présente un bon accord entre les résultats obtenus par des titrages faits simultanément d'après la méthode de RAMON et d'après la méthode d'EHRlich. Cette catégorie floccule entre 30—100 minutes avec la toxine. Les sérums no's 754, 539, 748 — flocculant plus rapidement — montrent un titre plus élevé déterminé

sur cobayes que déterminé *in vitro* (méthode de floculation). Au contraire les no's 737, 789, 456 paraissent plus forts mesurés *in vitro* que mesurés *in vivo*.

La concordance est presque parfaite pour la majorité des sérums, dont la vitesse de floculation avec la toxine, a une valeur moyenne. Les mélanges de toxine et de sérum à réaction lente sont résorbés dans le tissu sous-cutané des cobayes avant que la neutralisation entre les deux composants soit complète. Dans ce cas, il est possible de déceler des différences dans le titrage du sérum si, d'une part, on injecte les mélanges fraîchement préparés et si, d'autre part, on laisse en contact les deux constituants pendant un temps convenable avant l'injection.

Il est important de noter que les discordances entre les titres *in vitro* et *in vivo* dépendent de la nature du sérum choisi pour l'étalonnage de la toxine étalon. De ce que nous avons déjà dit, il serait préférable d'employer, comme sérum étalon, un sérum à réaction moyenne, car dans ce cas on obtient un accord satisfaisant entre les titrages *in vitro* et *in vivo* pour la majorité (80 p. 100 au moins) des sérums. Si l'on choisit le sérum étalon parmi ceux qui ont une valeur Kf extrêmement petite, la toxine donnera des valeurs *in vitro* supérieures à celles obtenues par le titrage sur les cobayes. En revanche, avec un sérum-étalon dont l'avidité est faible, on doit constater que la plupart des sérums montrent un titre *in vitro* inférieur au titre *in vivo*.

4. Relation entre vitesse de floculation et vitesse de neutralisation.

Comme nous verrons plus loin, la vitesse de neutralisation joue un rôle important dans la valeur thérapeutique

Tableau No. 7.

Montrant l'effet de l'antitoxine sur la toxine 1) dans un mélange fraîchement préparé 2) dans un mélange laissé à l'étuve pendant un temps plus ou moins long (lapins).

Sérum No.	Quantité mélangée avec une dose L_7 de la toxine	Temps d'incubation à 40° du mélange avant l'injection	Observation	K_n	K_f	
503	$\frac{1}{18}$ cc	0h	0	0h	45m	
	$\frac{1}{20}$ -		0			
	$\frac{1}{22}$ -		†			
	$\frac{1}{20}$ -	2h	0			
	$\frac{1}{22}$ -		†			
	$\frac{1}{25}$ -		†			
	$\frac{1}{20}$ -	24h	0			
	$\frac{1}{22}$ -		†			
$\frac{1}{25}$ -	†					
539	$\frac{1}{200}$ -	0h	0	0h	15m	
	$\frac{1}{225}$ -		0 0 0 0			
	$\frac{1}{250}$ -		† † 0 0			
	$\frac{1}{280}$ -	† † † †				
	$\frac{1}{250}$ -	15m	† 0 0			
	$\frac{1}{280}$ -		† † †			
	$\frac{1}{250}$ -		0 0 0			
	$\frac{1}{280}$ -	24h	† † †			
486	$\frac{1}{25}$ -		0h	0 0	0h	15m
	$\frac{1}{28}$ -			0		
	$\frac{1}{30}$ -	0 0				
	$\frac{1}{31}$ -	0(†)				
	$\frac{1}{33}$ -	†				
	$\frac{1}{34}$ -	0 †				
	$\frac{1}{38}$ -	†				
	$\frac{1}{40}$ -	†				
$\frac{1}{42}$ -	† †					
$\frac{1}{33}$ -	6h	0				
$\frac{1}{37}$ -		0				
$\frac{1}{40}$ -		†				
$\frac{1}{45}$ -		†				

Tableau No. 7 (suite).

Sérum No.	Quantité mélangée avec une dose $L\frac{1}{2}$ de la toxine	Temps d'incubation à 40° du mélange avant l'injection	Observation	<i>Kn</i>	<i>Kf</i>
486	$\frac{1}{33}$ cc	9 ^h	0		
	$\frac{1}{37}$ -		0		
	$\frac{1}{40}$ -		(†)		
	$\frac{1}{45}$ -	14 ^h	†		
	$\frac{1}{40}$ -		0		
	$\frac{1}{45}$ -		0		
	$\frac{1}{50}$ -	24 ^h	(†)		
	$\frac{1}{66}$ -		†		
	$\frac{1}{45}$ -		0		
	$\frac{1}{50}$ -	48 ^h	(†)		
	$\frac{1}{55}$ -		†		
	$\frac{1}{66}$ -		†		
	$\frac{1}{50}$ -		†		
	$\frac{1}{55}$ -		†		
$\frac{1}{66}$ -	†				
				14 ^h	15 ^h

0 = survie du lapin.

(†) = mort du lapin après le 4^{ième} jour.

† = — - — avant - — —

d'un sérum. Mais la détermination de la vitesse de neutralisation est délicate et demande un grand nombre d'animaux d'expérience. Elle deviendrait commode si l'on pouvait conclure de la comparaison avec le phénomène de flocculation et la réaction anticorps-antigène, à la valeur curative d'un sérum. Celle-ci serait donc indiquée par un simple titrage *in vitro*. Or, il en est ainsi pour la majeure partie des sérums frais (tab. 7).

Les deux sérums no's 503 & 539 flocculent vite en présence de la toxine. Par conséquent, des mélanges toxines-sérums correspondants, se montrent d'une nocivité égale, soit qu'on

les injecte immédiatement après leur préparation, soit qu'on les expose pendant un temps plus ou moins long à la temp. de 40° avant l'introduction dans les veines des lapins. La réaction toxine + antitoxine \rightarrow toxine-antitoxine (complexe) s'effectue alors instantanément dans ces cas. Les résultats obtenus avec le sérum à floculation lente (no. 486) indiquent, en revanche, que la réaction entre les deux composants n'est accomplie qu'après un contact pendant 14 heures environ à la temp. de 40° . Le temps de floculation, lui aussi, est long — 15 heures.

Cependant, on ne peut établir comme règle générale que la vitesse de floculation soit toujours l'expression exacte de la réaction entre toxine et antitoxine. Nous venons justement de donner un exemple montrant que la vitesse de floculation d'un sérum, provenant d'un même individu, vis-à-vis de la toxine, peut subir des variations remarquables d'une saignée à l'autre quoique l'avidité de l'antitoxine pour la toxine reste constante. En outre, la fonction floculante du sérum peut être détruite totalement ou diminuée considérablement sous l'action de certains agents physiques ou chimiques, tels que la chaleur, des sels divers, etc. sans que la vitesse de neutralisation entre toxine et antitoxine (K_n) soit aucunement influencée.

Une dose L_f de la toxine était mélangée avec des quantités variables de sérum tantôt en état frais, tantôt chauffé à 60° pendant 1 heure. La fonction floculante du sérum est détruite par ce procédé, mais l'avidité de l'antitoxine pour la toxine n'est aucunement modifiée. Le sérum à grande avidité, chauffé à 60° , réagit aussi énergiquement avec la toxine qu'avant le chauffage.

Il ressort des résultats indiqués dans ce tableau qu'un sérum, dont la fonction floculante est détruite par chauffage,

Tableau No. 8.

Montrant l'effet d'un chauffage à 60° pendant une heure sur deux sérums antidiphthériques présentant des valeurs *Kf* différentes.

Sérum No.	<i>Kf</i>	<i>L</i> † + . . cc de sérum	Incubation du mélange à 40°	Observation
503 non chauffé	0 ^h 45	1/18	0 ^h	0
		1/20		0
		1/22		†
		1/18	24 ^h	0
		1/20		0
		1/22		†
chauffé à 60° pendant 1 heure	∞	1/18	0 ^h	0
		1/20		0
		1/22		†
		1/18	24 ^h	0
		1/20		0
		1/22		†
486 non chauffé	15 ^h	1/31	0 ^h	0
		1/35		0
		1/40		†
		1/40	24 ^h	0
		1/45		0
		1/50		†
chauffé à 60° pendant 1 heure	∞	1/31	0 ^h	0
		1/35		0
		1/40		†
		1/40	24 ^h	0
		1/45		0
		1/50		†

réagit de la même manière vis-à-vis de la toxine avant et après chauffage. Il est surtout important de noter, comme nous le verrons plus tard, qu'un sérum à grande avidité pour la toxine garde cette propriété inaltérée même en perdant tout à fait l'aptitude à faire flocculer la toxine.

Si un sérum est soumis à un processus de purification au moyen du sulfate d'ammoniaque, on peut obtenir des fractions ayant une vitesse de floculation très différente vis-à-vis de la toxine.

Le tableau No. 9 montre les résultats de la précipitation fractionnée d'un sérum avec du sulfate d'ammoniaque. Le sérum frais renfermait environ 630 U. A. (EHRlich) au cc. Le temps de floculation était de 2^h10. La précipitation fractionnée donnait deux produits dont l'un flocculait avec la toxine dans 0^h15, tandis que l'autre demandait 8^h45 pour provoquer la floculation initiale. La première fraction était faite par addition au sérum frais d'une solution saturée de sulfate d'ammoniaque dans la proportion de 28 %. Le précipité formé était séparé, par filtration sur papier et la teneur du liquide en solution de sulfate d'ammoniaque saturée était augmentée jusqu'à 50 p. 100. Le second précipité était également séparé. Les deux précipités (le premier contient surtout l'euglobuline, le dernier renferme les pseudoglobulines) étaient dissous dans un volume d'eau distillée convenable et dialysés jusqu'à ce que le sulfate d'ammoniaque ait disparu¹.

Comme le montre le tableau, le titre du sérum frais était de 630 U. A.; le temps de floculation était égal à 2^h10. Les solutions des deux fractions présentaient des titres et des valeurs *Kf* respectives de 310 U. A. au cc (*Kf* = 0^h15) et de 150 U. A. (*Kf* = 8^h45).

En examinant les résultats des titrages, on verra que le titre déterminé au moyen des cobayes est à peu près le même que celui résultant d'un titrage sur lapins. Nous allons voir plus tard qu'un sérum à grande avidité pour

¹ Ces expériences de purification étaient exécutées par notre collègue M. MÖRCH.

Tableau No. 9.

Montrant les résultats des titrages soit *in vitro* soit *in vivo* du sérum no. 763 avant et après précipitation par le sulfate d'ammoniaque.

Date de la saignée	Kf min.	Titre antitoxique (U. A. au cc)		
		<i>in vitro</i> (Ramon)	<i>in vivo</i>	
			(cobayes)	(lapins)
¹⁶ / ₇ 28	50	17—20	16—25	
¹⁹ / ₇ 28	14	29		
²³ / ₈ 28	130	550	630	
28 % saturation } (euglobuline) }	15	250	310	310
50 % saturation } (pseudoglobuline) }	525	ca. 150	150—180	150—180

la toxine donne en général le même titre soit que l'on emploie des cobayes (injections sous-cutanées) soit que l'on se serve de lapins (injections intra-veineuses). Des sérums à réaction lente au contraire vont paraître plus faibles si la teneur en antitoxine est titrée sur des lapins au lieu de cobayes. Si l'abaissement de la vitesse de floculation avait été accompagné d'une diminution de l'avidité vis-à-vis de la toxine on aurait dû s'attendre à des variations dans le titre. Or, il n'en est pas ainsi.

Il est intéressant de remarquer que le cheval a fourni pendant la première période d'immunisation une antitoxine floculant en 0^h14.

5. Dissociation du complexe toxine-antitoxine.

La question de la constitution du poison diphtérique et de la nature de la l'union entre toxine et antitoxine, qui a donné lieu autrefois aux discussions si vives entre divers savants, s'est renouvelée à la suite des documents provenant des recherches de ces dernières années.

Sans entrer dans une discussion détaillée, nous dirons simplement que les nouveaux résultats expérimentaux plaident en faveur de la théorie émise par *ARRHENIUS* et *MADSEN* tandis qu'ils ne s'accordent pas avec celle d'*EHRLICH*. Surtout la dissociabilité du complexe toxine-antitoxine invoquée par *ARRHENIUS* et *MADSEN* a été prouvée par quelques expériences bien démonstratives.

Si on laisse un mélange neutre de toxine-antitoxine à l'étuve (37°) on constatera parfois qu'il devient légèrement toxique après un temps plus ou moins long. Le tableau en donne un exemple.

Tableau No. 10.

Une dose $L\frac{1}{2}$ de toxine était mélangée avec des quantités variables de sérum, et les mélanges étaient exposés pendant un temps plus ou moins long à 37° avant d'être injectés dans les veines à des lapins.

Quantité de sérum	Observation	
1,3 cc	0 0 0	} Injection aussitôt après le mélange.
1,1 -	† † †	
1,0 -	† † †	
1,1 -	0 0 0	} Injection après 30 min. à 37°.
1,1 -	0 0 0	
1,0 -	(†)(†) †	} — — 1 h. —
1,1 -	0 0 0	
1,1 -	† † †	} — — 4 h. —
1,0 -	† † †	
1,1 -	† † †	} — — 24 h. —
1,0 -	† † †	

Il faut alors employer 1,3 cc de sérum pour neutraliser une dose $L\frac{1}{2}$ si le mélange toxine-sérum est injecté immédiatement après sa constitution, s'il est exposé à 37° pendant 30 minutes avant d'être injecté, 1,1 cc de sérum suffit pour obtenir le même effet. Mais après incubation

pendant 24 heures à 37°, on constatera qu'un tel mélange est capable de tuer les lapins. Nous attribuons ce fait à la dissociation partielle du complexe toxine-antitoxine. Il est vrai qu'on pourrait admettre aussi une transformation des toxoides en toxine comme pensent H. SCHMIDT & W. SCHOLTZ¹. Mais une telle interprétation du phénomène ne nous paraît guère justifiable dans ce cas, parce que le mélange, étant toxique lorsqu'il est frais devient neutre après 30 minutes de séjour à 40°. Ce n'est que si le séjour à l'étuve est prolongé plus longtemps que le mélange redevient toxique.

On voit que le mélange fraîchement préparé et qui est

Tableau No. 11.

Montrant l'effet du NaJ sur un mélange de toxine et anti-toxine fraîchement préparé.

Sérum No.	L [†] + . . cc de sérum	Temps d'incubation du mélange à 40°	Observation	NaJ
486	1/28 cm ³	14 ^h	0	0,3 n
	1/33 -		(†)	
	1/40 -		†	
	1/50 -		†	
	1/60 -		†	
	1/28 -	24 ^h	0	
	1/33 -		†	
	1/40 -		†	
	1/50 -		†	
	1/60 -		†	
	1/28 -	48 ^h	0	
	1/33 -		†	
	1/40 -		†	
	1/50 -		†	
	1/60 -		†	

¹ Arch. f. Hyg. 1925, 95, 339.

vénéneux, devient inoffensif après un repos à 37° pendant 30 minutes, mais qu'il redevient toxique après 24 heures.

En ajoutant de l'iodure de sodium à un mélange de toxine et d'antitoxine on peut empêcher l'action annihilante qu'exerce ordinairement l'antitoxine sur la toxine.

Si l'on compare les résultats indiqués dans ce tableau avec ceux exposés dans le tableau No. 7, on aura une idée très nette de l'effet de l'iodure de sodium. Dans le cas où le sérum No. 486 est laissé en contact avec la toxine pendant 14 heures, $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{45}$ cm³ suffit pour annihiler une dose $L\ddagger$ de la toxine. Si, d'autre part, le mélange toxine-sérum est introduit dans l'organisme des animaux lorsque il est frais, il faut $\frac{1}{30}$ cc de sérum pour rendre la même quantité de toxine inoffensive. Mais si le milieu contient de l'iodure de sodium, il faut $\frac{1}{31}$ cc de sérum pour neutraliser la toxine si le mélange est incubé pendant 14^h, 24^h ou même pendant 48^h avant l'introduction.

L'iodure de sodium empêche alors l'interaction des deux substances. Si le sel est ajouté au mélange après neutralisation, il en résulte une dissociation complète, pourvu que

Tableau No. 12.

Montrant l'effet du NaJ sur le complexe toxine-antitoxine.

Sérum No.	Composition du mélange $L\ddagger + \dots$ cc sérum	Temps de contact avec NaJ	Observation
486	$\frac{1}{31}$	0 ^h	0
	$\frac{1}{38}$		0
	$\frac{1}{45}$		(†)
	$\frac{1}{31}$	24 ^h	0
	$\frac{1}{38}$		†
	$\frac{1}{45}$		†

le contact du complexe toxine-antitoxine avec le sel soit prolongé suffisamment.

Dans cette expérience le sel est ajouté à un mélange de toxine-sérum préalablement incubé pendant 24 heures à 40°. L'effet de l'iodure de sodium n'est pas immédiate, mais si le contact du sel avec le mélange dure 24 heures, celui-ci reprend sa nocivité primitive, se conduisant comme un mélange fraîchement préparé.

Il faut donc un certain temps d'action du sel avant que la dissociation se réalise.

Nous avons refait la même expérience avec un sérum neutralisant instantanément la toxine. Dans ce dernier cas il faut 5 fois plus de NaJ pour obtenir la dissociation du complexe. Voilà une nouvelle preuve encore de la différence d'avidité pour la toxine des divers sérums antidiphthériques.

RAMON a démontré que le dépôt qui se forme dans des mélanges de toxine et d'antitoxine en proportions équivalentes peut être dissocié par chauffage en milieu acide. Nous avons obtenu la dissociation partielle dans un milieu neutre, mais contenant de l'iodure de sodium. En effet, si l'on sépare le dépôt se formant dans un mélange de 10 cc de toxine et d'une quantité équivalente d'un sérum à réaction lente, et si l'on en fait une suspension aqueuse (après des lavages successifs avec de l'eau physiologique), celle-ci se montre inoffensive pour des lapins. D'autre part, si l'on traite d'abord cette suspension par du NaJ pendant 24 heures à 37°, l'introduction du mélange dans les veines des lapins fait périr les animaux avec une paralysie du train postérieur. Car la quantité de toxine mise en liberté étant trop minime pour tuer les animaux par une intoxica-

tion aiguë, le mélange se conduit comme une toxine partiellement neutralisée par l'antitoxine.

Récemment GLENNY et ces collaborateurs ont avancé l'hypothèse que la toxoïde (anatoxine) aurait une avidité pour l'antitoxine inférieure à celle de la toxine. Nous citons ici un exemple d'une série d'essais démontrant que la toxoïde est au moins aussi avide pour l'antitoxine que la toxine. On prépare un mélange, constitué par une unité antitoxique (sérum étalon de Francfort) et d'une dose L_0 d'une toxine quelconque — c'est-à-dire un mélange où toutes les propriétés délétères de la toxine sont parfaitement annihilées par l'antitoxine. Ensuite on ajoute un peu d'anatoxine diphtérique, et le mélange est injecté dans le tissu sous cutanée d'un cobaye de 250 grammes; on verra alors que ce mélange, produit par deux substances tout à fait inoffensives, fait périr l'animal. La conclusion la plus probable sera, que l'anatoxine (toxoides), s'est accaparée de l'antitoxine et que la toxine par la suite est mise en liberté.

Tableau No. 13.

Montrant l'effet de l'anatoxine à un mélange neutre de toxine-anatoxine ($L_0 + 1$ U. A.).

Quantité d'anatoxine ajoutée	Observation
nulle	0 0 (normaux)
0,046 cc	0 0 (léger oedème)
0,10 -	† †
0,22 -	† †
0,46 -	† †
1,00 -	† †

Sans discuter la question si la toxoïde jouit d'une avidité supérieure à celle de la toxine, nous interprétons

les résultats dans le sens que, dans un mélange où se trouvent la toxine et l'anatoxine côte à côte avec l'antitoxine, les possibilités de la combinaison entre toxine et antitoxine d'une part, et, de celle entre toxoïde et antitoxine d'autre part, peuvent être égales.

6. Comparaison entre titrage de l'antitoxine sur cobayes (injection par la voie sous-cutanée) et sur lapins (injection par la voie intraveineuse).

MADSEN et DREYER ont démontré (1902) qu'un mélange toxine-antitoxine se comporte différemment selon qu'on l'injecte dans les tissus sous-cutanés du cobaye ou qu'on l'introduit directement dans la circulation d'un lapin. Plus tard (1904) MORGENROTH a constaté qu'un mélange, neutre pour les cobayes mais toxique pour les lapins, se montre inoffensif aussi vis-à-vis de ces derniers s'il est laissé à l'étuve pendant quelques heures et ensuite à la température du laboratoire pendant 24 heures. MORGENROTH en a conclu que la neutralisation entre la toxine et l'antitoxine s'effectue lentement, et non pas immédiatement comme pensait EHRLICH. Cependant, les expériences de MORGENROTH ont été exécutées avec un seul sérum (le sérum étalon de Francfort) et par conséquent ses recherches ne permettent pas une conclusion aussi générale. Par hasard, MORGENROTH s'est-il servi d'un sérum à avidité faible pour la toxine?

A la suite de nombreux essais, nous avons pu nous rendre compte que quelques sérums à avidité très énergique pour la toxine donnent exactement le même titre, soit que le titrage soit exécuté au moyen des cobayes (par injection sous-cutanée), soit que l'on s'adresse aux lapins (injection dans les veines). Le titre des sérums, déterminé sur lapins, est le même si, d'une part, on injecte le mélange

toxine-sérum fraîchement préparé ou bien, si l'injection est faite avec un mélange laissé à l'étuve pendant plus ou moins longtemps. La grande catégorie des sérums possédant une avidité moyenne pour la toxine, donne un titre légèrement inférieur lorsqu'il est déterminé sur les lapins que lorsqu'il l'est sur des cobayes. Pour le sérum à réaction extrêmement lente, le titre déterminé en injectant le mélange toxine-sérum, aussitôt les deux composants mis en contact, ne s'élève quelquefois que jusqu'à la moitié de celui, résultant de l'injection d'un mélange, exposé à 37° pendant un temps suffisant, pour que le processus de neutralisation soit achevé complètement. Dans ce dernier cas, on obtient en général une concordance entre le titre déterminé sur cobayes et celui déterminé sur lapins. Au contraire, il n'est pas possible d'obtenir un parfait accord entre le titre *in vivo* et le titre *in vitro* avec un tel sérum, ce dernier

Tableau No. 14.

Montrant une comparaison des résultats du titrage fait 1) *in vitro* (méthode de floculation) 2) *in vivo*: a) sur cobayes b) sur lapins.

Sérum No.	Kf	Kn	U. A. au cc				
			titrage <i>in vitro</i>	titrage <i>in vivo</i>			
				sur cobayes		sur lapins	
				avant l'incuba- tion	après l'incuba- tion	avant l'incuba- tion	après l'incuba- tion
754	15 m.	0	95—100	130	130	120	120
539	15 m.	0	180—200	250	250	250	250
757	— ¹	0	—	1,25	1,25	1,25	1,25
789	6 ^h 45	6—8 ^h	120	ca. 50	71	10	71
737	8 ^h	ca. 8 ^h	100—110	70—75	ca. 80	28	75—80
721	—	ca. 24 ^h	—	1,4	—	0,2—0,25	0,5—1,0

¹ aucune détermination.

restant toujours plus élevé que le premier. Le tableau suivant montre d'une manière détaillée ces phénomènes. Il faut préciser que les lapins utilisés pour des expériences aussi délicates, doivent être de la même race et provenir, si possible, d'un même élevage. Nous nous sommes servi presque exclusivement de lapins blancs pesant 2000 grammes. Les animaux avaient été soumis dans les étables de l'Institut à une observation scrupuleuse (pesage tous les 3 à 4 jours) pendant au moins 3 semaines. Les individus qui n'ont pas pris de poids ou qui ont présenté d'autres signes anormaux ont été refusés.

Les sérums à floculation rapide (No.'s 754, 539, 757) donnent un titre inférieur déterminé *in vitro* que déterminé *in vivo*. Au contraire, le titre obtenu sur cobayes et sur lapins reste sensiblement le même. Enfin, il n'y a aucune différence entre les titres obtenus sur lapins, d'une part avec des mélanges toxine-sérum fraîchement préparés et, d'autre part, avec de tels exposés pendant 24 heures à

Tableau No. 15.
Sérum 737. Kf 8^h40.

Sérum titré au nombre d'unités antitoxiques	Sur Cobayes	Sur Lapins	
		immédiatement après mélange	après 24 h à 37°
80	† † † † † 0		† † †
75	† 0 0		
70	† 0 0 0 0 0		† 0 0
65	0 0 0 0 0		† 0 0 0
56			† 0 0 0 0
46		† †	
40		† † † †	
36		† † † † (†)	
31		† † † †	
28		0 0 0 0 0	

l'étuve. Pour les sérums à floculation lente, on peut noter de grandes différences du titre suivant qu'on opère sur cobayes ou qu'on s'adresse aux lapins, ainsi que pour des mélanges frais et des mélanges incubés.

Un autre exemple se trouve dans le tableau No. 15.

Le titrage sur lapins, fait immédiatement après le mélange de toxine et d'antitoxine, montrait 28 U. A. seulement; après 24 h. à 37° le titre s'élevait à 56—70 U. A., eau même résultat comme celui du titrage sur cobayes.

On est frappé par la grande différence que montrent divers sérums selon qu'ils témoignent une avidité très énergique pour la toxine, ou bien qu'ils réagissent lentement en présence de celle-ci.

7. Essais curatifs.

Il va de soi que la différence d'avidité pour la toxine des divers sérums influence aussi les propriétés curatives que manifeste le sérum vis-à-vis des animaux intoxiqués par le poison diphtérique.

Pour élucider cette question, nous avons entrepris plusieurs séries d'expériences sur lapins. Les premiers essais ont été exécutés de telle façon que l'on a injecté 4 doses mortelles d'une toxine diphtérique dans les veines des lapins; une heure plus tard le sérum a été introduit, également par la voie intraveineuse.

Dans la première rubrique du tableau No. 16, on trouve le nombre d'unités antitoxiques administrés aux animaux. Malgré l'inégalité des résultats, on verra donc qu'il faut plus d'unités d'un sérum à floculation lente (486) que d'un sérum à floculation rapide (502, 503) pour sauver les animaux de l'intoxication diphtérique.

En consultant ces essais on est frappé de l'inégalité des

Tableau No. 16.

Sérum No.	486	A 24	466	B 24	502	503	503	503
Saignée	¹³ / ₁₁ 24		¹⁵ / ₁ 24		²⁷ / ₄ 25	³⁰ / ₇ 25	²⁷ / ₄ 25	²¹ / ₃ 25
U. A. au cc	150	290	900	370	12,5	240	20	2,5
<i>Kf</i>	15 ^h	3 ^h	2 ^h	1 ^h 30	1 ^h 15	1 ^h 15	0 ^h 45	1 ^h 15
<i>Kn</i>	14 ^h	c. 2 ^h			c. ¹ / ₂ ^h		0 ^h	0 ^h
U. A. inj.								
150,0	00							
100,0	00††††							
75,0	0 (†)							
37,5	††††							
30,0	00†							
25,0	†††				00	0000		
20,0	(†)(†)(†)							
15,0	†††			00				
14,5		00						
12,5						00		
11,5		††				0 (†)		
11,0			00	(†)(†)				
10,0		†			000†	000†(†)		
9,0			†00	(†)	0000	00		
7,5								00
7,0			0†		0(†)(†)†			0†
6,5					0 (†)			
6,0					0†	(†)(†)	000	0†
5,0					0†	††		0†
4,0					††		0††	
3,5					0 (†)			
3,0					0††			
2,5								††
2,25					00†			
1,5					††			
1,25								††

résultats. Quelques animaux survivent à l'injection d'un mélange qui, ordinairement, est mortel tandis que d'autres ne résistent pas à l'intoxication quoi qu'on leur administre une dose de sérum capable de sauver la plupart des individus traités de la même manière. On doit admettre que cette série ne fournit pas de preuves absolument évidentes

et, cependant, on ne peut à peine douter que les sérums No. 502 et 503 possèdent une valeur curative plus élevée que le No. 486. Il existe donc ici un rapport entre le temps de floculation et l'effet curatif du sérum.

Les essais suivants sont exécutés en employant une technique un peu modifiée par ce que l'intervalle entre l'introduction de la toxine et l'administration du sérum est raccourci de 1 heure à 5 minutes. En même temps la dose intoxicante est décuplée (40 doses mortelles).

Tableau No. 17.

Sérum No.	539	539			539	633	633		I	Ia	II	III
		eu-glob.	eu-glob.	pseudo-glob.			eu-glob.	pseudo-glob.				
Saignée	$\frac{6}{4}$ 27	I	II		$\frac{5}{10}$ 27	$\frac{4}{11}$ 28						
U. A. au cc	250	20	150	125	1200	1000	50	1000	2200	1000	1600	1100
<i>Kf</i>	0 ^h 15	∞	0 ^h 20	0 ^h 20	1 ^h	4 ^h 30		5 ^h	c. 4 ^h	2 ^h 30	4 ^h 30	4 ^h 10
<i>Kn</i>	0 ^h					4 ^h			> 4 ^h			
U. A. inj.												
250	00											
125	00											
88								0				
80						†00000	00	00				
60											000	
50					0000							000
44								††				
40						0000				000		
30											††0	
25	00			000	0000							
22								†0				
20										†00		000
12,5				†00								
11,0								††				
10	00	00				(†) †						†0
7,5			0000									
6,25				†00								
5	††				†0							
2,5					††							

Dans les rubriques 3, 4, 5 se trouvent les résultats obtenus avec de diverses fractions du sérum 539. Les fractions provenaient d'une précipitation par sulfate d'ammoniaque et dialyse des précipités. On voit que les globulines diverses n'ont rien perdu en pouvoir curatif. Un essai correspondant était fait avec le sérum No. 633. Ici aussi les produits purifiés (rubriques 8 et 9) montrent une valeur curative égale à celle du sérum primitif.

Le sérum le plus riche en antitoxine possédait, comme on le voit, la plus petite valeur thérapeutique. Cependant, il est possible, par une méthode de précipitation modérée, d'obtenir des produits, où ne sont altérés ni l'avidité pour la toxine ni la valeur curative. Dans le tableau on trouve justement deux sérums (No. 539 et 633) qui ont été soumis à une précipitation fractionnée au moyen du sulfate d'ammoniaque. Ces deux sérums étaient des extrêmes en ce qui concerne l'affinité pour la toxine: le premier flocculant en 15 minutes; le second ne réagissant sous les mêmes conditions qu'après 4 heures de contact avec la toxine. Les résultats montrent que ni la fraction d'euglobine ni les pseudoglobulines n'avaient perdu en pouvoir thérapeutique.

Les d'expériences mentionnées dans le tableau No. 18 sont faites avec une toxine particulièrement riche en toxoïdes: No. V²⁴; $L_f = 0,30$ cc ($12 \times$ d. m. m.). L'injection du sérum avait lieu 10 minutes après l'introduction d'une dose L_f de la toxine diphtérique.

Dans cette série d'expériences, la différence en pouvoir curatif des sérums à vitesse de flocculation diverse apparaît d'un façon très nette. Comparons p. exp. les sérums No.s 754 et 757 aux No.s 721 et 737.

Le sérum No. 721 était fourni par un cheval qui, malgré une immunisation très intense, ne produisit que des quan-

Tableau No. 18.

Sérum No.	721	737	777	788	581	754	757
Saignée	$\frac{13}{28}$	$\frac{3}{8}$ 28	$\frac{15}{9}$ 28	$\frac{25}{10}$ 28	$\frac{24}{2}$ 27	$\frac{27}{7}$ 28	$\frac{9}{7}$ 28
U. A. au cc	1,4	75	1250	1500	1100	130	1,25
Kf	∞	8 ^h	1 ^h 05	0 ^h 55	0 ^h 40	0 ^h 15	0 ^h 10
Kn	c. 24 ^h	> 4 ^h		ca. 0 ^h 30	< 0 ^h 30	0	0
U. A. inj.							
28	†0000						
15,0		0000		000			
14	††						
13						000000	
12,5			000				
11	†††	†††					
7,5	††††††	†††††00	†††000				
6,5						000	
5,5					000		
4,5		††0		000			
3,9						000	
3,75							000
3,3					000		
3,0		†††		†0			
2,75			††		†00	†0	
2,5							††0
2,25		†††					
1,9						††0	
1,5		†††					
1,4		†††					
1,3						†††	
1,25							†††

tités minimales d'antitoxine. Ce sérum est sans valeur thérapeutique appréciable. Nous avons d'ailleurs pu établir comme règle générale qu'un animal fournissant un sérum à l'avidité faible pour la toxine soit aussi un mauvais producteur d'antitoxine; le titre antitoxique de tels sérums est presque toujours relativement faible (en dessous de 200 unités antitoxiques au cc).

En considérant l'ensemble de nos recherches nous pen-

sons avoir tranché la question de »l'avidité« des sérums antidiphthériques d'une façon définitive. Déjà en 1900 E. ROUX, s'appuyant sur des essais faits par MOMONT et DANITZ, avança l'opinion que la teneur en antitoxine ne suffit pas, à elle seule, à caractériser la valeur thérapeutique des sérums. Vinrent alors les expériences très étendues et fort intéressantes de KRAUS et ses collaborateurs (DOERR, PRIBRAM, RUS, SCHWONER, BÄCHER, AMIRADZIBI) concernant la différences d'»avidité« entre les divers sérums. Les expériences de BARIKINE devaient porter sur la même conclusion: il n'y a pas de rapport strict entre le titre antitoxique d'un sérum et son effet thérapeutique. De grands travaux sur le même sujet entrepris par les savants allemands (BERGHAUS 1908—09, NEUFELD et HÄNDEL 1912, KOLLE et SCHLOSSBERGER et JOSEPH 1919—21) plaidaient, au contraire, en faveur de la conception d'EHRlich. La divergence des résultats des différents expérimentateurs devient compréhensible quand on consulte les faits nouveaux qu'ont apportés nos essais. La plupart des sérums employés par les auteurs allemands étaient constitués par des mélanges de sérums provenant de plusieurs individus; mais dans un mélange composé par un nombre plus ou moins grand de sérums, les différences d'avidité s'effacent. D'ailleurs, pour bien démontrer une différence d'avidité entre deux sérums, on doit, comme nous l'avons fait, choisir les cas extrêmes, c'est-à-dire d'un côté un sérum à avidité très énergique pour la toxine et, d'un autre côté, un sérum à réaction extrêmement lente. Les petites différences disparaissent à cause des erreurs d'expérience que doivent comporter nécessairement de telles recherches. On pourrait objecter, il est vrai, contre nos essais que l'intervalle s'écoulant entre l'introduction de la toxine et l'administra-

tion du sérum antitoxique est trop restreint pour qu'il soit justifié de les nommer »essais curatifs« au sens propre de ce mot. Mais, vu le nombre considérable de nos expériences, faites dans des conditions très variées, il nous semble hors de doute qu'une unité antitoxique renferme un nombre très différent d'unités »curatives«.

Outre l'intérêt théorique que présentent nos recherches, elles comportent un intérêt pour la pratique de la Sérothérapie antidiphtérique. Dans ces dernières années le traitement des diphtériques s'effectue avec des doses de plus en plus intenses et surtout, on a recours, avec beaucoup de succès, aux injections intraveineuses de sérum. Il est alors fort important que le sérum administré au malade contienne non seulement le plus grand nombre d'unités antitoxiques au cc. mais aussi que ces antitoxines possèdent un pouvoir curatif élevé ou, en d'autres termes: une avidité énergique pour la toxine. Comme nous l'avons démontré, la différence entre deux sérums peut être si considérable que 100000 U. A. d'un produit représenteraient la même valeur que 300000 à 500000 U. A. d'une autre préparation.

Dans cet ordre d'idées on doit tenir compte du fait que la »concentration« ou la purification de l'antitoxine peut comporter un certain risque. Inutile de dire que de tels procédés n'ont qu'une valeur fictive, s'ils nous amènent seulement à des produits dont la teneur en albumine est accrue dans la même mesure que l'augmentation de l'antitoxine. Si, en même temps, l'avidité spécifique pour la toxine est diminuée, les processus de concentration ne constitueront donc aucun progrès réel. Mais nous avons mentionné qu'il est possible, en employant une technique convenable, d'éviter ce danger.

En présence des faits établis par nous, le problème du

titrage des sérums antidiphtériques se présente sous un nouvel aspect. Il serait commode si l'on pouvait se borner à faire un titrage par la méthode de floculation. Mais nous avons vu que la vitesse de floculation n'est pas toujours l'indicateur fidèle de l'avidité entre toxine et antitoxine. Le titrage sur lapins, au contraire, nous paraît répondre à ce but. Dans le cas où l'on constate une différence sensible du titre déterminé d'une part sur cobayes et, d'autre part, sur lapins, on saura que la réaction entre toxine et antitoxine ne s'effectue pas immédiatement.

Si l'on trouve une trop grande différence entre le titre d'un sérum déterminé sur cobayes et celui déterminé sur lapins, comme par exemple avec le sérum No. 789, celui-ci ne doit pas être employé en thérapeutique.

Il est à prévoir que par le choix scrupuleux de sérums riches en antitoxine et possédant en outre une grande avidité vis-à-vis de la toxine, on aura un moyen de lutter plus efficacement contre la diphtérie particulièrement maligne.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BARIKINE: Zeitschr. f. Imm., 1912, **15**, 329.
 — & FRIESE W.: Avidität der Antikörper I Mitteilung. Zeitschr. f. Imm., 1925, **45**, 2, 97.
- BELFANTI: Centralbl. f. Bakt., 1908, **47**, 248.
- BERGHAUS: — - — 1908, **48**, 450.
 — — - — 1909, **49**, 287.
 — — - — 1909, **50**.
- BIE: Deutsche Med. Wochenschr., 1929, **55**, 564.
- BRÜSTLEIN: Arb. a. d. Inst. f. Erforsch. d. Inf. Krankh., Bern 1909, **3**, 22.
- CRUVEILHIER: Ann. d. l'Inst. Pasteur, 1904—05.
- DÖNITZ: Arch. intern. de Pharmacodyn., 1899, **5**.
- EHRlich: Klinisches Jahrbuch, 1898, **6**.
 — Berl. Klin. Wochenschr., 1903, **35—37**.
- EISLER: Zeitschr. f. Imm., 1909, **1**.
 — & TSURU: Zeitschr. f. Imm., 1910, **6**.
- GLENNY, A. T.: Journ. of Hygiene, 1913, **13**, 63.
 — & OKELL: Journ. of Pathol., 1924, **27**, 187.
 — & WALLACE: — - — 1925, **28**, 317.
 — POPE, WODDINGTON & WALLACE: Journ. of Pathol., 1925, **28**, 463.
- KOLLE & SCHLOSSBERGER: Med. Klin., 1919, **1**.
 — JOSEPH & SCHLOSSBERGER: Arb. a. d. Inst. f. exp. Theraphie, 1919, **8**, 16.
 — Arb. a. d. Inst. f. exp. Theraphie, 1921, **13**.
- KRAUS: Centralbl. f. Bakt., 1903, **34**.
 — & DOERR: Wien klin. Wochenschr., 1905.
 — & PRIBRAM: Centralbl. f. Bakt., 1906.
 — & DOERR: Zeitschr. f. Hyg., 1906.

- KRAUS & RUSS: Centralbl. f. Bakt., 1907.
 — Schlusssätze zum Ref. am XIV intern. h. Kongr., 1907 (über die Methode der Serumprüfung).
 — & DOERR: Deutsche med. Wochenschr., 1908.
 — & SCHWONER: Centralbl. f. Bakt., 1908, **47**, 124.
 — Wien klin. Wochenschr., 1908, **28**.
 — & SCHWONER: Zeitschr. f. Imm., 1909, **2**, 273.
 — & AMIRADZIBI: — - — 1910, **6**.
 — GRAFF & MENSCHIKOFF: Centralbl. f. Bakt., 1911, **61**.
 — & BÄCHER: Deutsche med. Wochenschr., 1913, **23**, 1081.
 — - — Wien klin. Wochenschr., 1928, **41**.
- LOCKE, MAIN & MILLER: Journ. of Inf. Dis., 1926, **39**, 485; 1927, **41**, 32.
- MADSEN: Zeitschr. f. Hyg., 1900, **33**.
 — i KRAUS & LEVADITTI's Hdb., 1909, **2**.
 — Journ. of State Med., 1923, **31**, 1.
 — & SCHMIDT: Kgl. D. Vidensk. Selsk. Biol. Medd., 1926, V, 9.
- MARTIN: Compt. rend. Soc. de Biol., 1903, **17**.
 — PREVOT & LOISEAU: Compt. rend. Soc. de Biol., 1910, **39**, 56.
- MARX: Zeitschr. f. Hyg., 1901, **38**.
- MORGENROTH: Zeitschr. f. Hyg., 1904, **48**.
 — & ASCHER: Centralbl. f. Bakt. 1911, **59**.
- MÜLLER dans KRAUS & LEVADITTI's Hdb., Ergänzungsband 1911.
- NEUFELD & HÄNDEL: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt, 1912, **38**, 219.
- RAMON: Compt. rend. Soc. de Biol., 1922, **86**, 661, 711, 813; 1923, **88**, 167, 2; **89**; 1926, **93**, 506. Compt. rend. Acad. des Sciences, 1923, **167**, 267; 1924, **179**, 422; Ann. Pasteur, 1923, **37**, 1001; 1924, **38**, 1; 1925, **39**, 1; 1926, **40**, 1.
- ROSENBERG: Zeitschr. f. Imm., 1910, **8**.
- ROUX: Berichte d. X internat. Hyg. Kongr., Paris 1900.
- SCHMIDT, H. & SCHOLZ, W.: Arch. f. Hyg., 1925, **95**, 308, 339. 1926, **96**, 172, 185, 251, 294.
- SCHMIDT, S.: Kgl. D. Vidensk. Selsk. Biol. Medd., 1926, V, 8.
- SCHÜRMAN & SONNTAG: Zeitschr. f. Imm., 1911, **12**.
- STEINHARDT & BANZHAF: Proc. of soc. f. exp. Biol. med. Vol. V. 1907.
 — - — Journ. of Inf. Dis. 1908, **5**, 203.

BIOLOGISKE MEDDELELSER

UDGIVNE AF

DET KGL. DANSKE VIDENSKABERNES SELSKAB

5. BIND (KR. 19,25):

	Kr. Ø.
1. RAUNKLÆR, C.: Eremitageslettens Tjørne. Isoreagentstudier. I. 1925.....	2.50
2. PETERSEN, C. G. JOH.: Hvorledes Hvalerne bærer sig ad med at svømme. 1925.....	0.50
3. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. I. Chlorophyceæ. 1925....	7.35
4. KRABBE, KNUD H.: L'organe sous-commissural du cerveau chez les mammifères. Avec XVII planches. 1925.....	5.70
5. RAUNKLÆR, C.: Nitratinholdet hos <i>Anemone nemerosa</i> paa forskellige Standpladser. 1926.....	1.80
6. BOAS, J. E. V.: Zur Kenntnis symmetrischer Paguriden. 1926.....	3.40
7. BOAS, J. E. V.: Zur Kenntnis des Einsiedlerkrebses Paguropsis. 1926.....	1.60
8. SCHMIDT, S.: Om reaktionen mellem toksin og antitoxin (difteri). 1926.....	1.75
9. MADSEN, TH. og SCHMIDT, S.: Om »Aviditeten« af Difteriserum. 1926.....	1.10

6. BIND (KR. 18,10):

1. LUNDBLAD, O.: Zur Kenntnis der Quellenhydracarinen auf Møens Klint nebst einigen Bemerkungen über die Hydracarinen der dortigen stehenden Gewässer. Mit 7 Tafeln und 5 Textfiguren. 1926.....	5.00
2. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. II. Phæophyceæ. 1926 ..	6.00
3. OSTENFELD, C. H.: The Flora of Greenland and its Origin. 1926.....	3.35
4. FIBIGER, JOHANNES and MØLLER, POUL: Investigations upon Immunisation against Metastasis Formation in Experimental Cancer. With 5 plates. 1927.....	2.75
5. LIND, J.: The Geographical Distribution of some Arctic Micromycetes. 1927.....	1.50
6. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. III. Rhodophyceæ. Part 1. Bangiales and Nemalionales. 1927.....	4.50
7. LINDHARD, J.: Nogle Undersøgelser over den respiratoriske Kvotient under kortvarigt Muskelarbejde. 1927.....	1.00

7. BIND (KR. 14,85):

1. RAUNKLÆR, C.: Dominansareal, Artstæthed og Formationsdominanter. 1928.....	1.75
2. PETERSEN, C. G. JOH.: On some Biological Principles. 1928 ...	2.00

	Kr. Ø.
3. VIMTRUP, BJ.: Undersøgelser over Antal, Form, Bygning og Overflade af Glomeruli i Nyren hos Mennesker og nogle Pattedyr. 1928	1.30
4. BENSLEY R. R. og VIMTRUP, BJ.: Undersøgelser over de Rouget'ske Cellers Funktion og Struktur. En Metode til elektiv Farvning af Myofibriller. 1928	1.00
5. THOMSEN, OLUF: Die Erbllichkeit der vier Blutgruppen des Menschen, beleuchtet durch 275 Nachkommenschaftsindividuen in 100 AB (IV)-Ehen (nebst 78 Kindern, von denen nur der eine (AB)-Elter bekannt ist). 1928	1.00
6. KROGH, A. and HEMMINGSEN, A. M.: The Assay of Insulin on Rabbits and Mice. 1928.	0.70
7. JOHNSON, J. W. S.: L'Anatomie mandchoue et les Figures de Th. Bartholin, étude d'iconographie comparée. 1928.....	2.00
8. KEMP, TAGE: Om Kromosomernes Forhold i Menneskets somatiske Celler. 1929	1.75
9. WEIS, FR.: Fysiske og kemiske Undersøgelser over danske Hedejorder. Med særligt Henblik paa deres Indhold af Kolloider og Kvælstof. With a Resumé in English. 1929	8.25

8. BIND (under Pressen):

1. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. III. Rhodophycæ. Part II. Cryptonemiales, Gigartinales and Rhodymeniales. Les Mélobésiées par M ^{me} Paul Lemoine. Avec 4 planches. 1929..	4.50
2. THOMSEN, OLUF og KETTEL, KARSTEN: De menneskelige Isoagglutininer og tilsvarende Blodlegemereceptorers Styrke i forskellige Levealdre. Med 1 Tavle. 1929	1.60
3. KRABBE, KNUD H.: Recherches sur l'existence d'un œil pariétal rudimentaire (le corpuscule pariétal) chez les mammifères. Avec 11 planches (22 figures). 1929.....	2.80
4. ROSENINGE, L. KOLDERUP: Phyllophora Brodiaei and Actinococcus subcutaneus. With one plate. 1929	2.40
5. THOMSEN, OLUF og KETTEL, KARSTEN: Kvantitative Undersøgelser over de menneskelige Isoagglutininer Anti-A og Anti-B. 1929	0.65
6. MADSEN, TH. et SCHMIDT, S.: Toxine et antitoxine diphtériques. 1930	2.00