

## LA CONSTITUTION DU POISON DIPHTÉRIQUE

PAR

THORVALD MADSEN

DEUXIÈME MÉMOIRE

(TRAVAIL DE L'INSTITUT SÉROTHÉRAPIQUE DE L'ÉTAT)

(PRÉSENTÉ À LA SÉANCE DU 16. OCTOBRE 1903)

Les nombreux travaux auxquels a donné lieu dans ces dernières années la question de l'immunité ont permis d'établir une multitude de faits et nous ont procuré des matériaux très nombreux, dus en grande partie, directement ou indirectement, à EHRlich. Par ses recherches fondamentales sur le poison diphtérique, il a été le promoteur de l'étude rationnelle des relations mutuelles entre toxines et antitoxines, et ce sont ses méthodes excellentes pour mesurer leurs doses qui firent voir qu'on peut obtenir dans l'expérimentation physiologique cette exactitude que réclame un examen scientifique.

On sait que les premières expériences fondamentales de M. Ehrlich sur la constitution des poisons microbiens et sur leurs rapports avec leurs antitoxine ont été exécutées avec le poison diphtérique.

Si on prépare une série de mélanges de la même quantité de toxine avec des quantités différentes d'antitoxine, ces mélanges, injectés à des cobayes produiront des effets différents. M. Ehrlich est d'avis que l'explication la plus naturelle de ce phénomène, c'est que le poison diphtérique contient une série de substances de toxicité très inégale et d'affinité différente quant à l'antitoxine.

Dans une communication précédente<sup>1</sup>, l'auteur du présent article a confirmé les faits expérimentaux qui constituaient la base de la théorie primordiale de M. Ehrlich; mais des recherches ultérieures<sup>2</sup> sur la tétanolysine, très semblable au poison diphtérique, m'ont amené à me demander, si cette explication, naturelle au premier abord, il faut l'avouer, pouvait être maintenue dans tous ses détails.

A beaucoup d'égards, la tétanolysine se prête très bien aux recherches théoriques, parce qu'elle peut, de même que son antitoxine, être mesurée très exactement par des expériences en éprouvettes, ce qui permet des variations bien plus étendues quant à l'arrangement des expériences que pour le poison diphtérique, où la nécessité de se servir d'animaux restreint aussi le nombre des observations.

Il a été démontré que la neutralisation de la tétanolysine pouvait être représentée par une courbe continue. En poursuivant et en développant ces recherches, Arrhenius et Madsen<sup>3</sup> sont parvenus à démontrer que cette courbe correspond parfaitement à celle qui représente les rapports d'équilibre entre une substance en dissociation partielle et ses produits de dissociation. Une partie des phénomènes qu'offrent les rapports entre la tétanolysine et l'antitétanolysine pourra donc être expliquée par de simples lois physico-chimiques.

Une des difficultés principales, outre les grandes fautes d'expériences, réside dans cette circonstance que les poisons en question sont très labiles et varient très rapidement; par là les résultats deviennent très incertains. Les observations sur le poison diphtérique par exemple ne donneront pas l'impression, ni dans ces recherches, ni dans les recherches antérieures de l'auteur sur sa neutralisation par l'antitoxine,

<sup>1</sup> La constitution du poison diphtérique. Annales de l'Inst. Pasteur. 1899.

<sup>2</sup> Ueber Tetanolysin. Zeitschr. f. Hygiene, etc., XXXII, 1899.

<sup>3</sup> Physical chemistry applied to toxins and antitoxins. Festschrift ved Indvielsen af Statens Serum Institut. Copenhagen, 1902.

qu'on a affaire à un phénomène capable d'être défini d'une manière simple.

Ceci est dû à ce que les poisons, objets des travaux de Ehrlich et de l'auteur, étaient déjà au moment de l'expérience si affaiblis et si altérés que leur courbe de neutralisation offrait un parcours brisé et irrégulier, de sorte qu'il fut impossible de l'interpréter simplement.

Cependant nous avons pu dans ces dernières années observer un poison diphtérique frais<sup>1</sup>, préparé avec le bacille américain connu, provenant de Park et Williams à New-York (No. 8). On le sema dans 20 litres de bouillon de peptone préparé suivant Dean, et on le laissa en étuve pendant 13 jours, à 36° (<sup>15</sup>/<sub>10</sub>—<sup>28</sup>/<sub>10</sub> 1901). Après filtration sur papier, la culture fut conservée sous toluol. Elle s'est toujours maintenue stérile.

La dose mortelle minima immédiatement après la sortie de l'étuve, était de 0,0015 c. c. Pour les déterminations, on s'est toujours servi de cobayes de 250 gr. Plus tard, le poison s'est affaibli progressivement, et au bout d'un an, la toxicité n'était à peu près que de la moitié, la dose mortelle minima étant alors d'environ 0,003 c. c. (Tabl. I). —

Par la mensuration avec du test-sérum que M. Ehrlich avait bien voulu mettre à ma disposition,  $L_+$  fut trouvé égal à 0,2 c. c., et ce chiffre resta constant malgré l'affaiblissement de la dose mortelle minima (Tabl. II).

Avec ce poison, nous avons institué une série d'expériences pour déterminer ses rapports avec l'antitoxine diphtérique. Pour cette dernière, on s'est servi de deux préparations, partie du *test-sérum* de Ehrlich, partie d'un sérum d'effet antitoxique pris d'un cheval non immunisé: *sérum normal*.

Les expériences furent faites de telle sorte qu'à la même quantité arbitrairement choisie de poison, 0,1 c. c., on a ajouté

<sup>1</sup> DREYER & MADSEN. Studies on diphteria toxin. Festschrift I. c.

des quantités variables de sérum, exprimées en unités immunisantes. La toxicité de ce mélange a été déterminée par des injections à des cobayes de 250 gr. Là où le mélange contenait plus d'une dose mortelle minima, il fut établi quelle était la fraction minimale contenant une telle dose.

La courbe de neutralisation de ce poison a été déterminée deux fois, d'abord en *févr.—mars* 1902, alors que la dose mortelle minima était de 0,002 c. c., et plus tard, en *novembre*, alors quelle s'était élevée à 0,0028—0,0029 c. c. (Tabl. III).

Les résultats se trouvent dans le résumé ci-dessous où, dans la première colonne,  $n$  marque la quantité d'antitoxine, exprimée en unités immunisantes, ajoutée aux 0,1 c. c. de poison. Dans la rubrique suivante,  $x$  indique, combien de c. c. de ce mélange contiennent une dose mortelle, tandis que  $T$  indique la toxicité du mélange, c'est-à-dire combien de doses mortelles sont contenues dans le mélange de 0,1 c. c. de toxine +  $n$  unité immunisante. —

Dans les dernières colonnes, on trouvera un  $x$  et  $T$  théorique, dont le calcul sera indiqué plus bas.

A.				Sérum normal		Calc.		
$n$	Test-sérum		$x$	$T$	$x$	$T$	$x$	$T$
	févr.—mars	novembre						
0	0,002	50	0,0029	35	....	..	0,0015	66,67
0,05	0,002	50	....	..	....	..	0,00173	57,8
0,06	....	..	0,0029	35	....	..	0,00179	56
0,075	....	..	....	..	0,0022	45	0,0019	53
0,1	0,0022	45	....	..	....	..	0,00207	48
0,12	....	..	0,0029	35	....	..	0,00219	45
0,15	0,0025	40	....	..	0,0025	40	0,0025	40
0,18	....	..	0,0029	35	....	..	0,00288	36
0,2	0,0033	30	....	..	....	..	0,0032	31
0,225	....	..	....	..	0,0036	28	0,0037	27
0,24	....	..	0,0056	18	....	..	0,00408	24,5
0,25	0,005	20	....	..	....	..	0,0044	22,9
0,3	0,0067	15	0,0071	14	0,0059	17	0,0066	15,3
0,35	0,01-0,012	10-8	....	..	....	..	0,011	9,1
0,36	....	..	0,013	8	....	..	0,0136	7,5
0,375	....	..	....	..	0,0143	7	0,0147	6,8
0,4	0,017	6	0,014	7	....	..	0,019	5,3
0,45	0,033	3	....	..	0,05	2	0,03	3,4
0,48	....	..	0,033	3	....	..	0,0366	2,8
0,54	....	..	0,1	1	....	..	0,06	1,7
0,6	....	..	0,1	1	0,1	1	0,067	1,5

Le résultat est inscrit dans un système de coordonnées où l'on a marqué  $n$  le long de l'axe de l'abscisse, et  $T$ , la toxicité, le long de l'axe des ordonnées. (Fig. 1.)

Ces courbes, correspondant sur la plus grande partie de leur parcours, présentent une grande ressemblance aux courbes analogues de la tétanolyse. Elles font penser

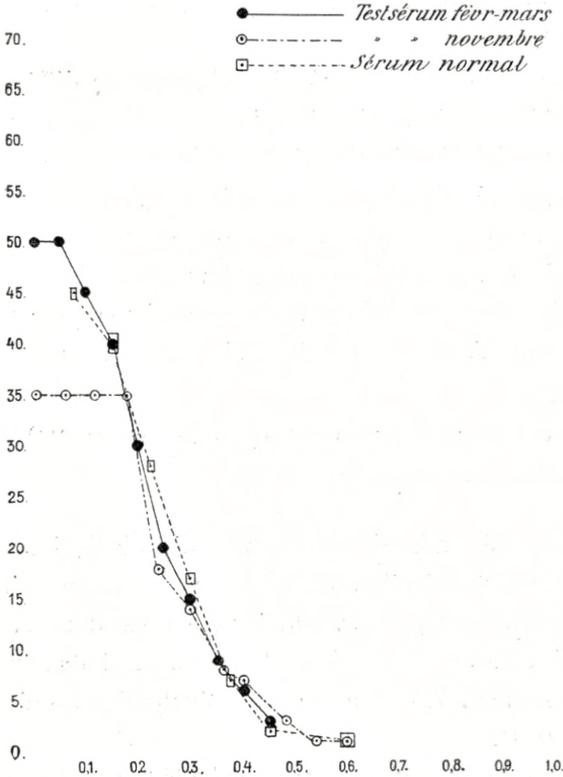


Fig. 1.

qu'aussi la combinaison du poison diphtérique avec l'antitoxine a subi une dissociation partielle.

On a voulu savoir alors si l'une des formules valables en ce cas :

$$\left\{ \frac{\text{Toxine libre}}{\text{vol.}} \right\} \left\{ \frac{\text{Antitoxine libre}}{\text{vol.}} \right\} = K \left\{ \frac{\text{Toxine-Antitoxine}}{\text{vol.}} \right\}^2.$$

s'adapterait aux résultats obtenus.

La mesure de la quantité de toxine libre étant la dose mortelle minima pour des cobayes de 250 gr., et les mélanges injectés pouvant toujours être regardés comme dilués dans ces 250 gr., on a omis le volume du calcul, ce qui, sans doute, peut se faire sans faute essentielle.

La quantité de toxine libre est évaluée à 0,0015 c. c., ce qui représente la dose mortelle minima du poison avant son affaiblissement.

La quantité de toxine fixée s'exprime par la différence entre la quantité de poison ajouté et la quantité libre:  $x - 0,0015$ .

La quantité d'antitoxine fixée est la même. —

La quantité d'antitoxine dans la solution peut s'exprimer par  $n x p$ , où  $p$  indique le multiple de 0,1 c. c. de poison équivalant à une unité immunisante. On obtient la quantité d'antitoxine libre en déduisant de ce chiffre la valeur ci-dessus trouvée pour l'antitoxine fixée. L'équation sera donc la suivante:

$$0,0015 [n x p - (x - 0,0015)] = K (x - 0,0015)^2$$

Pour la détermination du chiffre d'équivalent  $p$ , et de la constante de dissociation  $K$ , nous avons autant d'équations que d'observations pour  $x$ . On trouve donc dans la première série d'observations avec le test-sérum, 9, et dans celle avec le sérum normal, 7. — La meilleure évaluation a été:  $p = 2,7$ , et  $K = 0,015$ .

A l'aide de ces valeurs, on a calculé les chiffres pour  $x$  et  $T$  des deux dernières colonnes du résumé A. Excepté les déterminations de  $n$ , depuis 0—0,1, où il y a des circonstances spéciales, la correspondance entre les chiffres obtenus par calcul, et par observation, est parfaitement satisfaisante, les écarts se trouvant en dedans de la faute d'observation. Ceci ressort clairement de la figure 2, où la courbe indique les valeurs théoriques, tandis que les observations obtenus par le test-sérum

sont marquées respectivement par ● et ⊙, et celles du sérum normal par □. Ainsi, il n'y a pas lieu de supposer l'existence de toute une série de toxines dans *ce poison diphtérique à l'état frais*, parce que les phénomènes de neutralisation s'expliquent tout naturellement en admettant la présence d'une seule substance réagissant contre l'antitoxine.

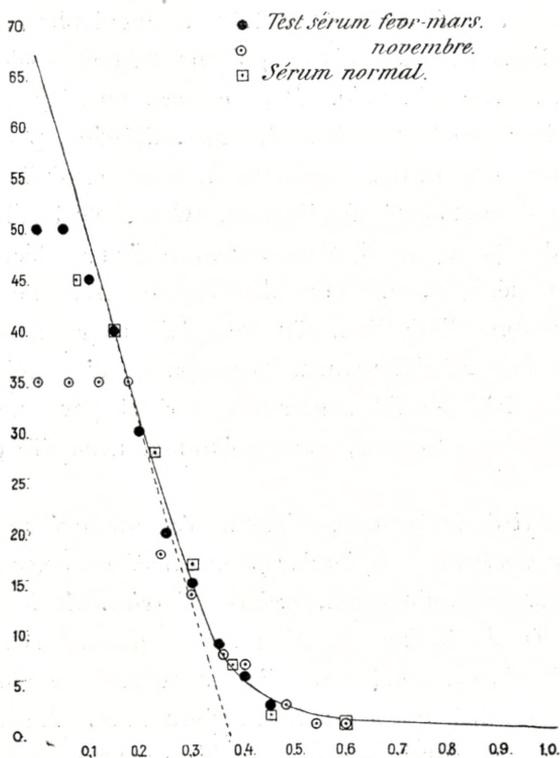


Fig. 2.

Pour la neutralisation, on s'est servi en partie du test-sérum d'Ehrlich, en partie du sérum obtenu d'un *cheval tout-à-fait normal*. Ce cheval n'a jamais servi à l'immunisation diphtérique. Il est donc d'un intérêt spécial de voir que les deux courbes en dedans des fautes d'observation suivent le même parcours; il semble donc qu'il n'y ait lieu d'établir aucune différence

entre l'antitoxine normalement existante, et celle obtenue artificiellement par l'immunisation.

Pendant les recherches antérieures sur les poisons diphtériques, un phénomène avait surtout attiré l'attention, et fait supposer leur constitution complexe. En préparant un mélange de toxine et d'antitoxine tel qu'aucune dose mortelle complète n'était libre, ce mélange produisit des effets spéciaux: œdème sans nécrose, parésies tardives, très rarement observées après des injections de quantités de poisons un peu au-dessous de la dose mortelle minimale. Dans ce cas, on réussit toutefois à démontrer que le poison seul, sans antitoxine, pouvait provoquer des cas tardifs analogues à ceux produits par des mélanges de toxine et d'antitoxine. Ces effets tardifs étaient surtout des paralysies typiques, comme j'en ai décrites dans un autre mémoire, mais on observait encore, une ou deux semaines après l'injection, d'autres phénomènes subséquents, voire un fort amaigrissement accompagné d'un relâchement musculaire très sensible, marquée surtout par une grande difficulté à se retourner, quand l'animal avait été placé sur le dos.

Il ressort de la formule, *qu'une molécule de toxine se combine avec une molécule d'antitoxine pour constituer deux molécules d'une nouvelle combinaison, toxine-antitoxine*. Si, à une quantité donnée de toxine, on ajoute une quantité relativement petite d'antitoxine, cette dernière sera presque entièrement fixée; le surplus de la toxine restera libre. Au contraire, presque aucune antitoxine ne sera libre, parce que, dans ces proportions quantitatives, la „toxine-antitoxine“ n'est que très faiblement dissociée. A mesure qu'augmenté la quantité d'antitoxine, une quantité de plus en plus grande de la toxine sera fixée, mais en même temps, la toxine-antitoxine se dissociera de plus en plus, de sorte qu'il existera toujours de la toxine et de l'antitoxine à côté l'une de l'autre.

On voit facilement que les idées courantes sur la neu-

*tralisation de la toxine par l'antitoxine* ne sauraient être maintenues. D'après ce qui précède, la quantité d'antitoxine équivalente à 0,1 c. c. de toxine est  $1/p = 0,37$  unité immunisante, tandisqu'il ressort du tableau III qu'il faut se servir de deux unités immunisantes pour faire disparaître tout effet toxique sur des cobayes.

Si la combinaison toxine-antitoxine ne se dissociait pas, la courbe de neutralisation serait une ligne droite, la ligne pointillée de la fig. 2, comme c'est le cas pour la combinaison d'un acide fort avec une base forte. Dans ce cas, 0,37 unité immunisante ferait entièrement disparaître l'effet des 0,1 c. c. de poison. Toutefois tel n'est pas le cas: à cause de la dissociation, une quantité assez considérable de toxine devient libre, env. 7 doses mortelles. A mesure qu'on ajoute de l'antitoxine, la quantité de toxine libre va diminuant, mais ce décroissement se fait de plus en plus lent, et en théorie, il reste toujours de la toxine libre, quelque grande que soit la quantité d'antitoxine ajoutée. Ceci ressort de la courbe de neutralisation, qui est une hyperbole, se rapprochant à son asymptote.

On voit donc qu'en concevant les toxones comme de la toxine-antitoxine dissociée, on aura une explication naturelle de la longue „zone de toxone“ se trouvant dans ce poison et dans d'autres. En considérant le tableau III, on verra que les mélanges depuis 0,6 jusqu'à 2 unités immunisantes présentent tous un effet toxique diminuant par degrés.

A cette manière de concevoir les toxones comme de la toxine-antitoxine dissociée correspond aussi cette circonstance que leurs effets ne restent pas les mêmes vis-à-vis des différents animaux. Des expériences antérieures ont démontré<sup>1</sup> qu'un mélange de toxine-antitoxine restant sans effet sur des cobayes, produit des paralysies chez les lapins, et qu'un mélange ne

<sup>1</sup> DREYER: Experimentelle Undersøgelser over Difterigiftens Toxoner. 1900.

provoquant que des cas tardifs chez les cobayes, tue les lapins en peu de jours. — Il est difficile de comprendre cette différence, si l'on regarde la toxone comme une substance essentiellement différente de la toxine, tandis que l'explication en devient facile, en ne supposant qu'une différence quantitative. Du reste, il serait sans doute assez difficile de donner un exposé parfaitement lucide des effets des toxones sur les différents animaux à cause de l'insuffisance actuelle des matériaux. Toutefois, on peut supposer qu'il existe une différence entre les effets d'une petite dose de toxine et d'un mélange de toxine avec de l'antitoxine qui, en plus de la même quantité de toxine libre, contient de la toxine-antitoxine, et, encore, de l'antitoxine libre.

De plus, il est permis de croire qu'un tel mélange offrirait des effets différents dans des organismes différents. Tandis que la dose mortelle minima de ce poison restait presque la même pour les cobayes de 250 gr., et pour les lapins de 1500 gr., la différence était grande pour  $L_+$ , 1 unité immunisante + 0,2 c. c. de poison étant mortelle pour les cobayes, tandis que déjà un mélange de 1 unité immunisante + 0,14 c. c. de poison tuait les lapins.

Si on peut supposer qu'une quantité absolument et relativement plus considérable de toxine est fixée chez le lapin que chez le cobaye, l'équilibre entre la toxine libre, l'antitoxine libre, et la toxine-antitoxine sera bien plus exposé à être déplacé chez un lapin que chez un cobaye. Pour rétablir l'équilibre changé par la fixation de la toxine libre, la toxine-antitoxine devra être ultérieurement dissociée, de la nouvelle toxine deviendra libre, et pourra être fixée, de sorte que le même mélange pourra présenter des effets bien plus toxiques sur l'un que sur l'autre animal.

La vieille dispute sur l'existence ou la non-existence d'un *point de neutralisation* se résoudra sans doute facilement par l'interprétation précédente; en se basant sur elle, on com-

prendra aisément qu'un mélange de toxine avec de l'antitoxine restera, à une dose donnée, absolument sans effet, tandis qu'un multiple produira de faibles effets toxiques (paralyse), et qu'une dose encore plus forte sera mortelle.

Le fait que les toxones présentent des *effets immunisants* au même degré que la toxine seule, s'adopte sans doute aussi bien à ce que nous venons d'avancer, qu'à l'idée de l'existence d'une substance particulière à avidité plus faible que la toxine.

Dans tout le développement antérieur, le but a été d'interpréter les faits observés d'une manière qui se rapproche le plus possible d'un phénomène connu, ce qui n'a présenté aucune difficulté quant à la première partie de la courbe; toutefois, quant à la région de „toxone“, il y a un certain désaccord dont je vais parler. Ici, nous trouvons que la toxicité observée des mélanges de toxine et d'antitoxine se trouve constamment un peu au-dessous de la toxicité calculée (voir aussi la courbe suivante No. 4). Il est peu probable que ce phénomène soit dû à des fautes d'expériences; peut-être provient-il de ces écarts des prémisses théoriques simples, comme on en voit fréquemment dans une série de réactions, quand elles se font en concentrations élevées.

Il est aussi permis de croire que d'autres substances du sérum que l'antitoxine pourront jouer un rôle quelconque.

Les relations assez simples, trouvées dans un poison frais s'effacent à mesure que s'affaiblit le poison. Outre la diminution de la force létale, la formation des prototoxoïdes, dont on parlera plus tard, il se produit aussi un affaiblissement de la faculté paralysante du poison. Lorsque la dose létale minimale était montée au double, on n'observait aucun cas de paralysie après une quantité non létale de poison. Au cas contraire, la paralysie s'observait toujours, bien qu'à un moindre degré, après les mélanges de toxine avec une quantité relativement grande d'antitoxine, mélanges pour lesquels je

conserverai provisoirement et pour être bref, le nom de „toxones“.

Entre la toxone et la toxine on a observé en outre cette différence que la dernière produit la nécrose avec alopecie, tandisque les toxones ne provoquent qu'un œdeme mou sans conséquences. Ceci s'explique peut-être par la différence dans la rapidité de réaction existant sans doute entre toxine et toxone ainsi qu'il a été démontré antérieurement<sup>1</sup>.

Nous savons que pour la tétanoly sine la vitesse de réaction entre la toxine et l'antitoxine baisse rapidement en présence de grandes quantités d'antitoxine (Arrhenius et Madsen); conformément à cela, les toxones de la tétanoly sine se fixent plus lentement aux érythrocytes que la tétanoly sine seule (Madsen) et les toxones du poison diphtérique sont fixées bien plus tardivement dans l'organisme que le poison seul (Dreyer).

On pourra croire que cela est dû à ce que la présence de la toxine-antitoxine ou de l'antitoxine fait baisser la vitesse de réaction de l'antitoxine de la même façon que par exemple l'hydrogène sulfurique déprime la rapidité de la réaction des solutions colloïdales de platine (Bredig).

Si la toxine est injectée subcutanément, elle se lie sans doute rapidement avec tissu et provoque une forte réaction, tandisque la toxone en conséquence de sa moindre vitesse de réaction n'est fixée que faiblement et avec lenteur, et qu'elle réussit ainsi à se diffuser et à disparaître de l'endroit injecté, de sorte que l'effet local sera de la même nature que des doses minimales de toxine.

On voit par la fig. 2 que la toxicité du mélange de 0,1 c. c. de poison avec une quantité d'antitoxine,  $n$ , moindre de 0,12 unité immunisante, est considérablement au-dessous du calcul. Si l'on compare les courbes déterminées au printemps et en

<sup>1</sup> TH. MADSEN: Sur les toxones. XIII. Congrès internat. de médecine. Paris 1900.

automne 1902, on voit qu'il s'agit d'un procès progressif. Dans l'automne de 1902, la dose mortelle minima était de 0,0029 c. c., et les 0,1 c. c. contenaient alors, en tout, environ 35 doses mortelles. Les 0,18 unités immunisantes ne produisaient aucun abaissement dans la toxicité. En augmentant ensuite la quantité d'antitoxine, on obtint une courbe essentiellement correspondant à celle déjà trouvée.

Suivant Ehrlich, ce phénomène peut s'expliquer par cette supposition que le poison diphtérique contient une substance, la *prototoxine*, d'une plus grande affinité pour l'antitoxine que le reste de la toxine. Tandis que sa faculté de fixer l'antitoxine (liée au groupe haptophore d'Ehrlich) reste constante, l'élément toxique (le groupe toxophore d'Ehrlich) est très labile, de sorte que la prototoxine se change graduellement en une modification atoxique, le toxoïde, avec faculté non modifiée de fixer l'antitoxine. A ceci correspond encore le fait que  $L_{\dagger}$  est resté constant malgré l'accroissement continu de la dose mortelle minima.

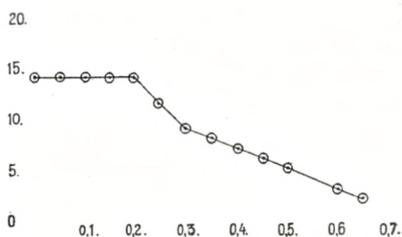


Fig. 3.

Une telle formation de prototoxoïde qui se trouve aussi dans la tétanolysine est un phénomène constamment observé quand on conserve les poisons pendant quelque temps. Cette formation semble comprendre souvent presque la moitié de la toxicité. Voir aussi les courbes correspondantes, pour deux autres poisons A. (fig. 3), et C. (fig. 4).

Pour examiner si la formule indiquée s'applique aussi à d'autres poisons diphtériques qu'au poison décrit, on a organisé une série d'expériences provenant de recherches antérieures, et portant sur un *autre poison* C<sup>1</sup>. Ce dernier a été

<sup>1</sup> MADSEN: Om Difterigiftens Konstitution. Oversigt over D. kgl. Danske Vidensk. Selsk. Forhandl. 1899.

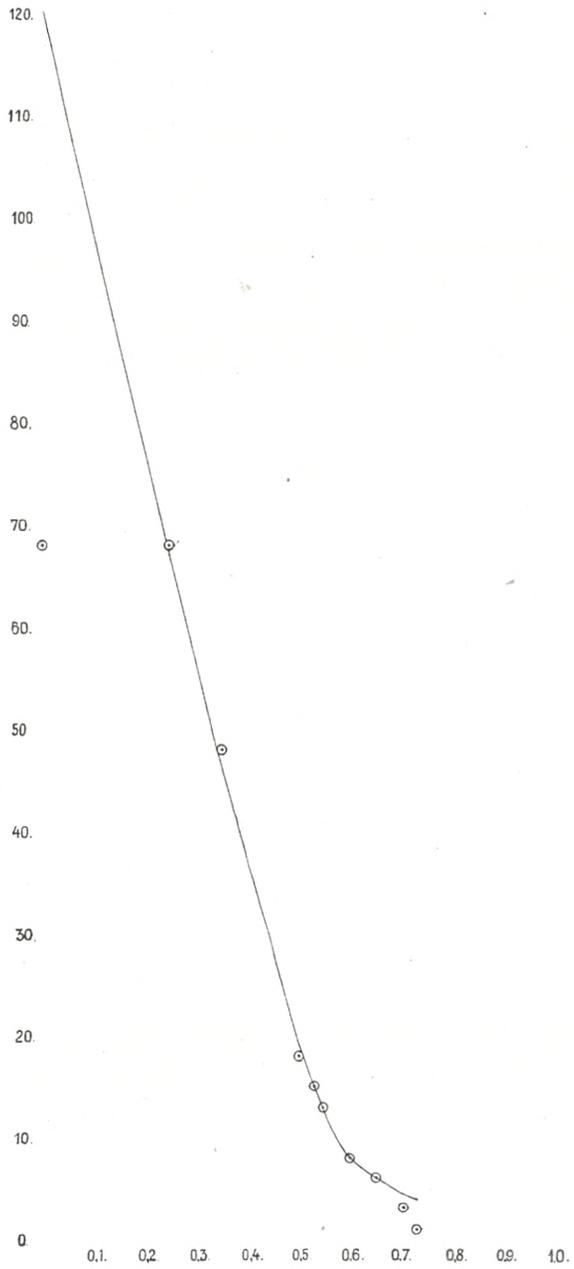


Fig. 4.

préparé à l'aide d'un bacille diphtérique que M. Ehrlich a bien voulu mettre à notre disposition. —

Immédiatement après la sortie de l'étuve, en 1898, la dose mortelle minima était de 0,005 c. c., mais elle monta plus tard jusqu'à 0,0086 c. c. Les expériences avec saturation partielle furent faites de telle sorte qu'à une dose de 0,6 c. c. de poison on ajoutait des quantités variables de test-sérum d'Ehrlich.

Les résultats sont indiqués dans le résumé ci-dessous, où les en-têtes ont la même signification que plus haut.

## B.

<i>n</i>	obs.		calc.	
	<i>x</i>	<i>T</i>	<i>x</i>	<i>T</i>
0	0,0088	68	0,005	120
0,15	0,0088	68	0,0068	88
0,25	0,0088	68	0,00895	67
0,35	0,0125	48	0,013	46
0,5	0,033	18	0,032	19
0,53	0,04	15	0,0405	15
0,55	0,046	13	0,0478	13
0,6	0,075	8	0,071	8
0,65	0,1	6	0,1	6
0,7	0,2	3	0,133	4,5
0,725	0,6	1	0,15	4

L'expression graphique se trouve dans la fig. 4, où la ligne marque la courbe de neutralisation calculée et  $\circ$  les observations réelles. —

Les observations pour  $n = 0, 0,15$  et  $0,25$  donnèrent le même  $x$  (prototoxoïde). En traitant de même façon qu'antérieurement les autres observations, on obtint le chiffre d'équivalent  $p = 1,8$ , et la constante de dissociation  $K = 0,012$ . Avec ces chiffres, les valeurs de  $x$  et de  $T$ , dans les deux dernières colonnes ont été calculées; la correspondance entre les valeurs observées et les valeurs calculées est satisfaisante, excepté pour les deux dernières. —

Le rapprochement entre les constantes de dissociation  $K$  pour chaque poison est donc considérable,  $0,015$  et  $0,012$ . Quant

aux chiffres d'équivalent  $p$  une unité immunisante équivalait à  $2,7 \times 0,1$  c. c. du premier poison décrit, et à  $1,8 \times 0,6$  c. c. du dernier. Ces quantités de poisons contenaient, avant l'affaiblissement, respectivement 180 et 216 doses mortelles minimales. La correspondance est assez satisfaisante. Si la différence est due à des fautes d'expérience ou peut-être à un abaissement de l'unité immunisante pendant les quatre ans écoulés entre les deux déterminations, voilà ce qui ne peut être établi sur la base des matériaux actuels.

Les recherches précédentes nous mettent a même de retrouver, à l'aide de la courbe de neutralisation, notre unité actuelle d'antitoxine, même si par hasard elle s'était perdue.

La condition en est que nous déterminions avec une exactitude suffisante combien d'unités de toxine, calculées d'après le poison non affaibli, équivalent à notre unité immunisante actuelle (ce chiffre semble se trouver aux environs de 200).

Veut-on alors déterminer combien grande est la quantité d'une antitoxine inconnue équivalente à notre unité actuelle immunisante, on trace la courbe de neutralisation de l'antitoxine en question et l'on trouvera ainsi une valeur arbitraire de  $p$ . Puisque nous savons combien d'unités de toxine doit contenir  $p$ , multiplié par la quantité de poison employé, on peut calculer la valeur réelle de  $p$  et de  $J$ , l'unité immunisante.

En démontrant que la combinaison de la toxine avec l'antitoxine suit la loi de Guldberg et Waage (loi de l'effet des masses) on fait disparaître les derniers doutes sur la nature chimique de l'action mutuelle de ces substances.

Une telle manière de voir, dont la justesse a pu être constatée en ce qui concerne la tétanolysine et le poison diphtérique, s'adapte sans aucun doute à un grand nombre de corps et à leurs anticorps.

Tabl. I.  
Dose minima mortelle.  
Cobayes 250 gr.

Date	Dose en C. c.	Résultat	Paralyisie Temps d'incubation: jours	Date	Dose en C. c.	Résultat	Paralyisie Temps d'incubation: jours
28/10-31/11 1901	0,001	*	20	11/2-5/3 1902	0,0015	† 5 1/2	
	—	*	20		—	*	
	0,0015	† 5 jours			—	*	30
	—	† 6			—	*	30
	0,002	† 3			0,0016	*	
	—	† 3 1/2			—	*	46
6/1-20/1 1902	0,0011	*	20	0,0017	† 5 1/2		
	0,0013	† 4		—	*		
	—	*	17	0,0018	*	28	
	—	*	17	—	*	23	
	—	*	17	0,002	† 2		
	—	*	21	—	† 2		
	—	*	35	—	† 2 1/2		
	0,0014	† 3 1/2		22/2 02	0,002	† 2 1/2	
	—	*	17		—	*	21
	0,0015	† 2		18/4 —	—	† 2 1/2	
	—	† 3		—	—	† 3 1/2	
	—	† 4		19/6 —	—	† 3 1/2	
	—	† 4 1/2		—	—	† 4	
	—	*	25	28/10-15/11 1903	0,0025	† 3 1/2	
	0,0017	† 6			—	*	
	—	† 7			—	*	
—	*	30	0,0026		† 5 1/2		
0,0019	† 2		0,0027		*		
0,002	† 2		0,0028		† 5		
—	† 4		0,0029		† 7		
—	† 4 1/2		0,003		† 3 1/2		
0,0022	† 2	30	—	† 3 1/2			
—	† 4 1/2						

Tabl. II.  
Détermination de  $L_{\dagger}$ .  
Cobayes 250 gr.

Date	$I+x$ c. c. de poison	Résultat	Paralyse	
			Temps d'incubation. Jours	Marche de la maladie
$9/1-20/1$ 1902	$x$			
	0,05	0	29	guéri
	—	0	22	—
	0,1	0	28	—
	—	0	28	—
	—	0	28	—
	0,12	0	23	—
	0,14	*	22	—
	0,16	*	22	mort
	0,17	*	22	—
	—	† 5 $1/2$		
	0,18	*	16	—
	—	*	16	—
	— <sup>e</sup>	*	16	—
	—	† 5		
	—	† 5 $1/2$		
	0,19	*	17	—
	—	*	16	—
	0,2	† 1 $1/2$		
	—	† 1 $1/2$		
—	† 1 $1/2$			
—	† 1			
—	† 1			
—	† 1			
$22/3$ 1902	—	† 4		
—	—	† 2		
$24/6$ —	—	† 3 $1/2$		
—	—	† 3 $1/2$		
$18/11$ —	—	† 3		
—	—	† 3		

Tabl. III.

Test-sérum fév.-mars 1902				Test-sérum novb. 1902				Sérum normal			
0,1 cc. de poison + n I	Divisé par	Résultat	Paralytie Temps d'incubation. Jours	0,1 cc. de poison + n I	Divisé par	Résultat	Paralytie Temps d'incubation. Jours	0,1 cc. de poison + n I	Divisé par	Résultat	Paralytie Temps d'incubation. Jours
0,05	50	† 2		0,35	8	† 1 1/2		0,06	30	† 6 1/2	
—	—	† 5 1/2		—	10	† 6		—	35	† 5 1/2	
—	55	† 10		—	12	† 12		—	40	*	
—	—	*		0,4	5	† 5 1/2		0,12	30	† 7	
—	60	*		—	5	† 5 1/2		—	35	† 6	
—	—	*		—	6	† 4		—	40	*	
0,1	40	† 3 1/2		0,45	2	† 1 1/2		—	45	*	
—	—	† 1 1/2		—	3	† 2 1/2		0,18	30	† 5 1/2	
—	43	† 4 1/2		—	4	*	21	—	35	† 6 1/2	
—	45	† 4 1/2		0,5	..	† 12	19	—	40	† 2 1/2	
—	—	*		—	..	† 9		0,24	18	† 4 1/2	
—	50	† 8		0,55	..	† 0	21	—	20	*	
—	—	*		0,6	..	0	21	0,3	12	† 4 1/2	
—	55	† 1 1/2		0,8	..	0		—	14	† 2 1/2	
—	60	*	27	1	..	0		—	16	*	
0,15	30	† 5 1/2		2	..	0		—	18	*	
—	—	† 1 1/2		—	..	0	28	0,36	8	† 3 1/2	
—	35	† 2		—	..	0		—	10	† 8	
—	40	† 5		3	..	0		—	11	*	
—	—	*	27	4	..	0		0,4	6	† 2 1/2	
0,2	25	† 6 1/2		—	..	0		—	7	† 5 1/2	
—	30	† 5 1/2		—	..	0		—	8	† 8	
—	—	† 2 1/2		—	..	0		—	10	*	
—	35	*	19	—	..	0		0,48	3	† 3	
—	—	*		—	..	0		—	4	*	
0,25	17	† 2 1/2		—	..	0		0,54	1	† 8	
—	20	† 4		—	..	0		—	2	*	
—	25	*	{ † de ca- chexie	—	..	0		0,6	1	† 1 1/2	
0,3	10	† 2 1/2		—	..	0		—	2	*	
—	15	† 2 1/2		—	..	0		—	—	—	
—	—	† 4		—	..	0		—	—	—	
—	17	*	19	—	..	0		—	—	—	
—	19	† 8		—	..	0		—	—	—	
—	20	*	23	—	..	0		—	—	—	
—	—	*		—	..	0		—	—	—	