

RELATION ENTRE LE POUVOIR TOXIQUE ET LE POUVOIR  
ANTIGENE DES TOXINES DIPHTERIQUE ET TETANIQUE.

par MM. L. P. Delpy et H. Mir Chamsy

Au point de vue de l'immunologiste, les toxines sont des antigènes ayant accessoirement des propriétés toxiques.

Jusqu'à la découverte de la réaction de floculation (Ramon 1932), la constatation et la mesure de la toxicité avaient une importance essentielle. Aucune méthode autre que l'inoculation aux animaux d'expérience ne permettait de déceler la présence de toxine dans une solution, et, l'unité de mesure fondamentale était la *dose minima mortelle* (DMM) définie par Ehrlich comme la plus petite quantité de toxine qui inoculée sous la peau de cobaias de 250 grammes, en tue la majorité en 96 heures.

De même, les propriétés antitoxiques d'un sérum, c'est-à-dire le pouvoir que possède un sérum de se combiner à la toxine en neutralisant son pouvoir pathogène, ne pouvaient être mises en évidence et mesurées qu'en observant chez l'animal d'expérience la disparition du pouvoir pathogène d'une *toxine connue*, mélangée au sérum qu'il s'agissait d'étudier. Par suite, toutes les unités de mesure d'Ehrlich, Unité antitoxique (UA), dose limite inoffensive (Lo) dose limite mortelle (L+) ainsi que la dose limite réactionnelle de Röhrner (Lr) sont basées sur l'observation des réactions provoquées chez le cobaié par l'inoculation des mélanges correspondants à chacune de ces doses.

La méthode de floculation nous a apporté le moyen de mesurer *en vitro* le pouvoir de combinaison de la toxine et de l'antitoxine.

En ce qui concerne l'antitoxine, le pouvoir flocculant peut être exprimé en unités antitoxiques d'Ehrlich. En ce qui concerne la toxine, par contre, la floculation nous indique exactement le pouvoir

de combinaison, qui varie comme le pouvoir antigène, mais ne nous renseigne pas sur la toxicité qui varie indépendamment du pouvoir de combinaison, d'une façon irrégulière et imprévisible.

Si la méthode de floculation était adoptée sans réserves pour l'étalonnage officiel des antigènes et antitoxines, la mesure de la toxicité pourrait être négligée, mais certaines habitudes, nous dirions volontiers certains préjugés, sont difficiles à déraciner, et de nos jours encore, les règlements de la plupart des pays, ne reconnaissent comme méthodes de titrage officielles que les méthodes *in vivo* telles que les employait Ehrlich. Alors que dans le domaine de la recherche on fait confiance à la floculation pour des mesures très précises, il reste nécessaire de revenir aux inoculations pour mesurer officiellement (si ce n'est exactement) le pouvoir antitoxique d'un sérum ou le pouvoir antigène d'une anatoxine.

Ces mesures ne peuvent se faire que par tâtonnements. Sans aller jusqu'à la minutie d'Ehrlich qui utilisait jusqu'à 100 cobaias pour déterminer avec une précision relative la dose minima mortelle d'une toxine diphtérique, on ne peut éviter de grossières erreurs qu'en sacrifiant un grand nombre d'animaux, ce qui entraîne outre des dépenses considérables, une perte de temps véritablement stérile.

Ces considérations expliquent l'intérêt que présentent les tentatives faites pour découvrir l'existence d'un rapport constant entre le pouvoir antigène d'une toxine si rapidement et exactement mesuré par la floculation, et son pouvoir toxique qui ne peut être mesuré que chez l'animal d'expérience. Si la floculation nous indique même approximativement le titre toxique d'un filtrat, le titrage *in vivo* deviendra un simple contrôle, d'exécution relativement simple.

Au point de vue théorique, si l'on peut démontrer qu'il existe dans ce que nous appelons „toxine„ avant toute détérioration, une relation fixe entre les pouvoirs antigène et toxique, et si cette relation est bien définie par une formule, les valeurs toxiques indiquées par la formule seront certainement plus exactes que celles

qui sont indiquées par les titrages *in vivo*. Dans le premier cas en effet, la seule cause d'erreur réside dans l'interprétation de la floculation. Dans le second au contraire, on sait que les causes d'erreur sont plus nombreuses et qu'il n'est pas possible de les éviter.

### *I-Toxine diphtérique*

En 1932, Stodel et Bourdin ont recherché si, pour des toxines diphtériques fraîchement préparées, il existe une correspondance fixe entre le pouvoir antigène mesuré par la méthode de floculation de Ramon, et le pouvoir toxique apprécié *in vivo* par la méthode d'Ehrlich, et si cette correspondance peut se traduire par une relation mathématique.

En titrant *in vivo* et *in vitro* des bouillons venant d'être filtrés, après neuf jours d'incubation, ils ont constaté les équivalences suivantes:

<i>Valeur antigène exprimée en unités floculantes par centicube (Lf/cc)</i>	<i>Valeur toxique exprimée en doses minima mortelles par centicube (DMM/cc)</i>
4	100
8	400
10	600
12	900
13	1.100
16,5	1.600
20	2.500

Portant en abscisses les valeurs antigènes  $x$ , et en ordonnées les valeurs toxiques  $y$ , ils ont obtenu une courbe parabolique, définie par la formule  $y = K x^2$ , où  $K$  est une constante égale à 6,3.

Malheureusement, la formule de Stodel et Bourdin, donne des équivalences *a priori* inacceptables: par exemple, au titre de 50 Lf/cc, correspond celui de 17.500 DMM/cc. On obtient facilement des filtrats titrant 50 Lf/cc, mais on n'en a jamais obtenu qui tuent le cobaie à la dose de 1/17.500 cc. Il est vrai que les auteurs n'ont opéré que sur des bouillons titrant au maximum 20 Lf/cc., mais

dans nos conditions de travail, un filtrat titrant 20 Lf/cc. renferme environ 700 DMM/cc et non 2.500.

Stodel et Bourdin ayant établi leur formule d'après des titrages directs *in vivo* et *in vitro*, il faut en conclure que ces titrages étaient incorrects.

Pour reprendre l'étude de cette question, nous avons réuni les résultats des titrages effectués dans notre Institut au cours des quatre dernières années, en ne retenant que ceux qui concernent des bouillons filtrés depuis moins de deux semaines, et qui ont été effectués simultanément *in vitro* et *in vivo*. Nous avons constaté qu'entre les titres antigènes (x) exprimés en Lf/cc. et les titres toxiques (y) exprimés en DMM/cc., il existe une relation qui peut être définie par la formule:  $y = Kx^2$ , à condition que la valeur de K ne dépasse pas 1,9.

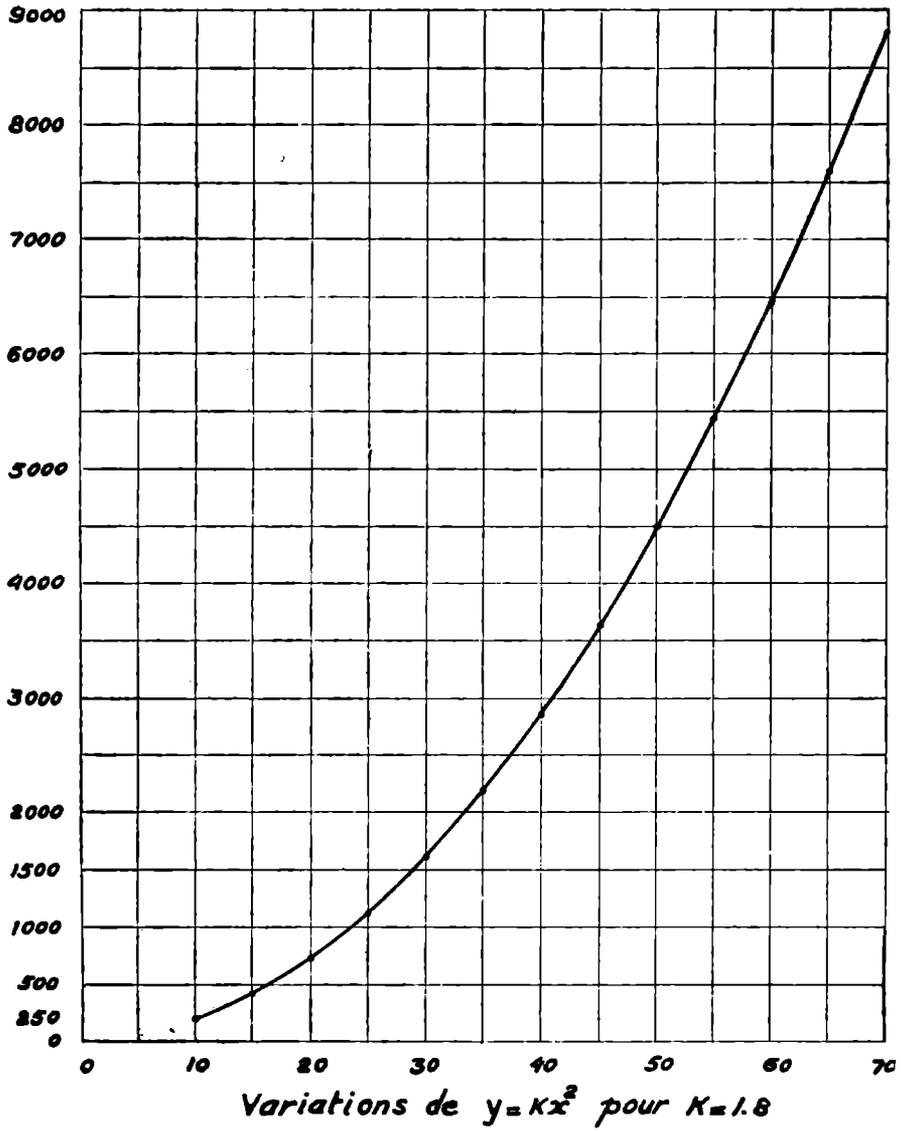
En construisant deux courbes, l'une correspondant à  $K = 1,9$  et l'autre à  $K = 1,7$ , on établit les limites entre lesquelles se fixent les titres en DMM/cc. correspondant aux titres en Lf/cc.

Dans le tableau I, nous avons groupé les chiffres relatifs à 18 filtrats choisis pour montrer les variations maxima que nous avons notées. Nous donnons également les équivalences en DMM/cc indiquées par une courbe construite en donnant à K la valeur moyenne 1,8.

TABLEAU I

Toxine No.	Résultats des titrages			Titre en DMM/cc donné par la courbe (K 1,8)	Différence pour 1.000
	Lf/cc.	DMM/cc.	Valeur de K		
16/24	18	600	1,85	579	-35
5/21	20	700	1,75	720	+28
17/24	24	1.000	1,73	1.038	+38
1/21	30	1.700	1,88	1.620	-47
26/21	34	2.100	1,81	2.080	-9,5
26/24	39	2.750	1,80	2.738	-4,4
7/21	40	3.000	1,87	2.880	-40
18/21	40	2.900	1,81	2.880	-6
8/21	40	3.000	1,87	2.880	-40
16/21	40	3.000	1,87	2.880	-40
24/24	40	2.800	1,75	2.880	+29
17/24 b	40	2.800	1,75	2.880	+29
9/21	42	3.000	1,70	1.175	+58
10/21	42	3.200	1,80	3.175	-8
33/24	46	3.800	1,79	3.808	+2,1
17/24 a	50	4.500	1,80	4.500	0
33/24	50	4.500	1,80	4.500	0

FIGURE I.



On voit que, dans la série considérée, la valeur de K, calculée en donnant à (x) et à (y) les valeurs obtenues expérimentalement, varie entre 1,88 et 1,70. Lorsque'on utilise une courbe identique à celle qui est figurée (K = 1,8) les valeurs de (y) obtenues en fonction de (x) diffèrent de 0 à 50 pour 1000 en plus ou en moins de celles que l'on obtient par titrage *in vivo*.

La composition du milieu de culture n'a pas d'influence sensible. La relation reste la même avec des milieux à base de digestion pepsique et papaïnique, par exemple.

Au point de vue pratique, l'usage de la courbe permet à coup sûr d'éviter des tâtonnements dans la détermination de la DMM, et par suite de réaliser une importante économie de temps et de cobaias. L'expérience nous a montré que si l'on opère dans les trois jours qui suivent la filtration, et si le titrage par floculation a été soigneusement effectué, il suffit d'inoculer 4 à 5 dilutions pour obtenir d'emblée la DMM avec la précision généralement requise. Par exemple, pour 40 Lf/cc, l'équivalence donnée par la courbe est 2.880 DMM/cc, et on injectera les dilutions: 1/3.000, 1/2.950, 1/2.900 1/2.850, 1/2.800.

## 2.- Toxine tétanique

Ramon (1940) a constaté expérimentalement qu'une unité de floculation (Lf) correspond à 3.000 Doses Minima Mortelles (DMM) pour le cobaie de 350 à 380 grammes et à 10.000 DMM pour la souris de 20 grammes. La relation est ici plus simple que pour la toxine diphtérique. Connaissant le titre floculant d'une toxine exprimé en Lf/cc, il suffit d'une multiplication pour connaître la toxicité en DMM/cc. (Voir tableau 2)

**TABLEAU 2**

Titre obtenu par floculation.	Toxicité pour le cobaie		Toxicité pour la souris	
	DMM/cc	DMM	DMM/cc	DMM
40	120.000	1/120.000cc.	400.000	1/400.000cc.

Les expériences que nous avons pratiquées à maintes reprises nous ont permis de vérifier l'exactitude des relations indiquées par Ramon, et nous pensons qu'elles peuvent être utilisées, avec confiance.

On peut ici objecter qu'en ce qui concerne la toxine tétanique, la réaction de floculation serait sujette à des défaillances. Ces défaillances peuvent être facilement évitées en choisissant judicieusement les sérums floculants, et en les comparant périodiquement aux sérums étalons de l'Institut Pasteur de Paris ou du *Statens Serum Institut* de Copenhague.

#### *Conclusion*

1—Il existe entre le pouvoir antigène et le pouvoir toxique des toxines diphtériques une relation constante exprimée par la relation  $y=Kx^2$  dans laquelle:

$y$  = toxicité exprimée en *Doses minima mortelles* par centicube (DMM/cc.)

$x$  = pouvoir antigène exprimé en *unités floculantes* par centicube (Lf/cc.)

$K$  = constante de valeur 1,8.

La formule a été établie par Stodel et Bourdin (1932), mais ces auteurs donnaient à  $K$  la valeur 6,3 qui conduit à des équivalences évidemment fausses.

2—Il existe également un rapport constant entre le pouvoir toxique et le pouvoir antigène des toxines tétaniques.

D'après les expériences de Ramon, ce rapport est exprimé par deux relations différentes selon que l'animal d'expérience est le cobaie ou la souris.

Chez le cobaie, le pouvoir toxique exprimé en DMM/cc. s'obtient en multipliant par 3.000 le titre en Lf/cc., tandis que chez la souris ce titre doit être multiplié par 10.000.

Nos expériences nous permettent de confirmer les résultats de Ramon.

*Institut d'Etat des Sérums et Vaccins,  
Hessarek (Iran).*

**BIBLIOGRAPHIE**

KAMON, G-1922.-C R Soc. Biol., 86, pp. 661, 711, 813.

1940.-Rev. Immunologie 6,p 65.

STODEL et BOURDIN.-1932.-C.R. Acad. Sc. p.1687.

---