

ETUDE DE CERTAINS FACTEURS PERMETTANT
D'INTENSIFIER ET DE REGULARISER LA FONCTION
TOXIGENE DU BACILLE DIPHTERIQUE
par MM. L. P. Delpy et H. Mir Chamsy

Les recherches dont nous donnons ici le résultats on eu pour objet de fixer les conditions permettant de produire avec régularité et sans autres limites dans la quantité que celles du matériel disponible, les solutions de toxine diphtérique destinées à être transformées en antigènes.

Nous réservons le nom de «Toxine» à la substance douée des propriétés toxiques antigéniques et immunisantes. Nous appelons «Solution Toxique» les bouillons ou autres liquides renfermant des proportions variables de Toxine.

Il est indispensable de consulter le travail de Ramon (1939) et celui de Loiseau et Philippe (1939) pour suivre les progrès réalisés à l'Institut Pasteur de Paris, grâce à l'étude méthodique de la toxinogénèse. Il n'est que juste de remarquer que ces progrès ont été beaucoup plus rapides à partir de 1922, date à laquelle la méthode de titrage par floculation de Ramon, a été substituée aux titrages *in vivo*. C'est cette méthode qui a permis de suivre jour par jour l'élaboration des toxines, tout en réalisant une énorme économie de temps et de matériel.

En 1941, nous suivions les règles exposées en détail par Loiseau et Philippe (1939). Les raisons pour lesquelles nous nous

en sommes écartés apparaîtront au cours du présent travail. La plus sérieuse fut l'irrégularité des résultats obtenus, qui était incompatible avec la nécessité ou nous étions à certaines périodes de produire chaque semaine avec un matériel limité, environ 2.000.000 d'unités antigéniques sous une concentration de 40 à 50 Lf/cc.

Ce sont donc les facteurs qui influent sur la régularité de la toxinogénèse que nous avons particulièrement étudiés, à savoir: la conservation du pouvoir toxigène des souches, la constance de composition des milieux de culture, et les règles à observer dans la conduite des cultures.

Matériel utilisé

Les cultures ont été faites dans des ballons de Fernbach. Les ballons que nous utilisons ont une capacité d'environ 1.800 cc. Leur diamètre intérieur est de 190 mm., soit une surface intérieure de 280 centimètres carrés environ. La hauteur du corps est de 60 à 70mm. et ils peuvent être commodément utilisés lorsqu'ils renferment 1 litre de bouillon, occupant une hauteur de 35 mm. Dans ces conditions le rapport de la surface de culture au volume total du milieu est 0,28 ($S/V = 0,28$).

La valeur du rapport S/V indique tout ce qu'il est utile de savoir au sujet des conditions de répartition du milieu. La détermination de cette valeur permet de comparer les résultats obtenus par les auteurs qui ont étudié l'importance de la forme des vases, ou de la hauteur de la couche liquide qui, pris en soi, ne signifient rien. Employer des vases plus larges, sans changer la hauteur du milieu, ou au contraire diminuer la hauteur du milieu sans changer le diamètre des vases, revient à élever le rapport S/V , par augmentation de S ou par réduction de V .

La valeur des pH est mesurée par la méthode colorimétrique avec un comparateur à disques.

Les titres sont exprimés en Unités flocculantes (syn. : Unités antigéniques) par centicube (Lf/cc.). L'étalonnage des toxines et

antitoxines utilisées pour les titrages est basé sur des spécimens d'antitoxine standard reçus régulièrement du *Statens Serum Institut* de Copenhague et du *National Institut of Health, U.S.A.*

Les résultats obtenus par floculation sont fréquemment contrôlés par des titrages *in vivo*.

I-Stabilisation des souches.

Depuis 4 ans, nous avons utilisé les souches suivantes qui nous ont été envoyées desséchées et dans le vide:

- P. W.8. N° 110 B. (Pr. Hartley, *National Institut for Medical Research, London*)
- P.W.8. «Toronto» (Pr. Eling, *Statens Bakt. Laboratorium, Stockholm*)
- P.W.8. N° 385 (*National Institute of Health, U.S.A.*)
- P.W.8. N° 5 «Albany» (*National Institut of Health U.S.A*)

Sur les conseils de M. Philippe, de l'Institut Pasteur de Paris, nous avons voulu entretenir ces souches en „Hypoxybiose", selon la technique qu'il a publiée avec Loiseau en 1939. Rappelons qu'il faut repiquer les souches une fois par semaine en bouillon ne renfermant ni acétate de soude, ni glucides et recouvert d'huile de vaseline. Si on veut conserver les souches pendant longtemps, on les „fixe" sur sérum coagulé, recouvert en totalité d'huile de vaseline. Le tube scellé est conservé à l'obscurité à la température ordinaire. Au moment de l'utilisation, on repique une colonie dans un tube de bouillon recouvert d'huile de vaseline. Après 48 h. on enlève l'huile à la pipette, et on émulsionne le voile. Avec cette émulsion, on ensemence un ballon renfermant 150 cc. de milieu du type Loiseau et Philippe (1939) et le voile obtenu après 24 heures constitue la semence pour la préparation d'un lot de toxine.

Cette méthode, qui n'est pas très simple, ne nous a pas permis d'obtenir la „stabilisation" de nos souches et a même dans certains cas altéré sérieusement leur vitalité. Par exemple: la souche P.W. 8 No 110 B. , donnait lorsque nous l'avons reçue en Mai 1924 des bouillons titrant de 35 à 50 Lf/cc. Après avoir été entre-

tenue en „hyoxybiose" pendant neuf mois (34 passages,) elle ne donnait plus que des bouillons titrant au maximum 25 Lf/cc.. En outre, les cultures présentaient une majorité de formes bacillaires atypiques.

Il est fréquent qu'une souche conservée quelques mois sur sérum coagulé, recouvert d'huile de vaseline, donne après repiquage une culture pauvre, se développant lentement. Parfois même, la souche probablement entraînée à la privation d'oxygène ne se développe plus en surface du milieu, mais dans toute son épaisseur, sans former de voile. En pareils cas, la production de toxine est nulle et il est impossible de rendre à la souche ses propriétés originales.

La méthode classique des repiquages à 2 ou 3 jours d'intervalle n'étant pas sans inconvénients et la dessiccation après congélation à très basse température nécessitant des moyens dont nous ne disposons pas, nous avons depuis deux ans stabilisé nos souches par la technique suivante:

Ensemencer avec une culture jeune en bouillon, une série de tubes de sérum coagulé. Après 2 ou 3 jours, vérifier la pureté de la culture, enlever à la pipette l'eau de condensation et la remplacer par du sérum frais, de cheval.

Emulsionner les colonies dans ce sérum, qui est ensuite prélevé et réparti dans de petites ampoules à long col. Ces ampoules sont branchées sur un dispositif de vide sulfurique, de manière à obtenir la dessiccation en 24 heures environ. On scelle alors à la lampe le col des ampoules qui sont conservées à l'abri de la lumière.

Dans ces conditions, la vitalité et le pouvoir toxigène des souches se conservent intégralement pendant au moins 2 ans et il suffit de faire 2 ou 3 repiquages en bouillon pour que la souche soit utilisable.

Il est indispensable d'émulsionner les bacilles dans du sérum de cheval. Si l'émulsion est faite en eau physiologique, la conservation ne dépasse pas quelques semaines.

Il n'est pas nécessaire de congeler les bacilles avant la dessiccation ce qui constitue une simplification appréciable.

II—Composition du milieu

En 1941, nous avons utilisé le milieu de Loiseau et Philippe (1936) dont nous rappellerons brièvement la préparation.

Mélanger:

Liquide obtenu en faisant macérer pendant 20 heures
à la glacière 600 grammes de viande de veau dans
un litre d'eau..... 1 partie
Digestion pendant 24 heures à 48° de 350 grammes
d'estomac de porc dans un litre d'eau acidifiée 2 parties

Ajouter:

Avant stérilisation: acétate de soude 10 pour 1.000
Après stérilisation et répartition:
Glucose en solution stérile..... 2 pour 1.000
Maltose en solution stérile 6 pour 1.000
pH: 8,2. Répartir à raison de 500cc. par Fernbach.

Dans notre laboratoire, nous avons observé que malgré les soins apportés à sa préparation, ce milieu est de composition très inconstante. La teneur en Azote dégradé mesurée par la méthode de Sørensen sur 32 lots a été en moyenne de 0,67grs. par litre, avec des extrêmes de 0,49 grs. et 0,11 grs.

Il est possible que ces variations soient en relation avec l'état de conservation des estomacs de porc qu'il est difficile en Iran de se procurer facilement.

La même irrégularité a été constatée dans la toxinogénèse.

Les résultats obtenus en cultivant pendant 12 jours à 32-35°, la valeur S/V étant 0,56, 52 lots de 30 à 60 litres, sont indiqués dans les tableaux II et III, colonne 1. On voit que 5,6 pour 100 des lots ne renfermaient pas de toxine. 48 pour 100 titraient moins de 30 Lf/cc. et 52 pour 100 seulement titraient de 30 à 46 Lf/cc.

Au cours de l'année 1942, pendant que ce milieu était utilisé dans la pratique journalière, nous en avons expérimenté d'autres et notamment ceux de Ramon, Berthelot et Amoureux (1932) Taylor (1935) P. Eordet (1938), Pope et Linggood (1939), Barr, Glenny, Pope et Linggood (1941). Dans les conditions de travail où nous étions placés, aucun d'eux ne s'est montré exempt d'inconvénients.

Enfinement, nous avons adopté comme base la «peptone de laboratoire» telle qu'elle était employée en 1938 au Laboratoire du Professeur Legroux (Institut Pasteur de Paris), et nous avons composé le milieu suivant.

-Macération pendant 5 heures à 15-20° de 600 grammes de viande de veau par litre d'eau	1 partie.
-Digestion pendant 20 heures à 48-50° de 250 grammes de viande de veau par litre d'eau acidifiée, en présence de la quantité nécessaire de pepsine	2 parties.
-Acétate de soude	10 p. 1.000
-Maltose	6 p. 1.000
-Glucose.....	2 p. 1.000

La quantité de pepsine à utiliser doit être déterminée pour chaque nouveau lot. Avec une pepsine de titre 1.500 (Français) ou 15.000 (Américain), il faut 0,50 gr. de pepsine par kilo de viande. Ce milieu est facile à préparer et sa composition est assez constante. La teneur en Azote dégradé par litre, mesurée sur 23 lots, a été en moyenne de 0,45 gr. avec des extrêmes de 0,32 et 0,56 grs, attribuables à des fautes de technique.

Il est important d'employer de la viande de veau.

ADDITION DE LEVURE et D'HYDRATES DE CARBONE

Depuis les travaux de Ramon (1929) l'utilité de l'addition de glucose, à la dose de 2 p. 1.000 a été démontrée. Pope et Healey (1933) prouvèrent ensuite les bons effets du maltose qui présente l'avantage de se dédoubler lentement en hexoses et peut par suite être employé à la dose de 6 p. 1.000 sans provoquer d'acidification brutale.

Ces faits étant confirmés par de nombreux auteurs, nous avons d'emblée additionné nos milieux de 6 p. 1.000 de maltose et de 2 p. 1.000 de glucose.

Mais comme l'a fort bien expliqué Bordet (1937), l'addition de glucides à certains milieux entraîne des variations considérables

dans la marche de la réaction. Avec les milieux du type Martin, on obtient parfois d'excellents résultats, mais d'autres fois, l'acidification initiale est intense, le redressement tardif et lent, de sorte que la culture reste maigre et ne donne qu'une faible quantité de toxine. Avec notre milieu, l'addition de glucose et de maltose dans les proportions indiquées, entraîne régulièrement ce que Bordet appelle «l'indigestion acide». L'acétate de soude amortit la chute initiale du *PH*, mais n'accélère pas sensiblement le retour à l'alcalinité. Mais si aux sucres et à l'acétate de soude on ajoute 5 pour 1.000 de levure, la courbe indiquant les variations du *PH*, devient parfaitement satisfaisante, et la culture progresse avec un maximum de vigueur: un premier voile commence à se former en moins de 24 heures. Après trois jours il se fragmente en lambeaux qui tombent au fond du vase, et est remplacé par un second voile, qui fait place à un troisième dans les 10 premiers jours. Ce troisième voile reste comme nous le verrons plus loin capable de produire de la toxine, aussi longtemps que l'alcalinité limite, équivalente à *PH*: 8,4, n'est pas atteinte.

Nous avons essayé de remplacer la levure par un extrait, selon Mustapha (1937), sans avantage appréciable.

En 1943, il devint impossible de se procurer en Iran du glucose et du maltose de bonne qualité, et l'emploi de produits de conservation ou de composition douteuses entraîna une série d'échecs. Nous avons alors utilisé une préparation de laboratoire préparée de la façon suivante:

—Faire germer de l'orge de qualité choisie et constante, le dessécher, éliminer les germes et broyer les grains pour obtenir une farine grossière (malt), que l'on peut conserver pendant des mois.

—Mélanger 1 partie de cette farine et 4 parties d'eau.

—Chauffer doucement au bain marie en agitant constamment jusqu'à ce que le mélange ne renferme plus trace d'amidon. (Ceci peut être facilement apprécié en laissant tomber une goutte de digestion dans un tube d'eau iodée faible. La coloration obtenue qui est bleue au début de l'opération, passe ensuite au violet, puis au rouge. Finalement, lorsque l'hydrolyse est assez avancée, il ne se produit aucun changement de couleur).

—Porter à 100° pour détruire l'amylase, filtrer sur toile, puis sur bougie L3.

Il est facile si l'on opère toujours de façon rigoureusement identique d'obtenir des digestions de composition uniforme. La quantité à ajouter au milieu dépend de la composition même du milieu et particulièrement de la teneur en Azote. Avec notre milieu renfermant en moyenne 0,45 grs. d'Azote dégradé par litre, la proportion optima est de 30 centicubes pour 1.000. Les résultats obtenus sont au moins aussi bons et plus réguliers qu'avec les sucres du commerce.

ADDITION DE FACTEURS DIVERS

Cystine.— dans notre milieu additionné de glucides, d'acétate et de levure, la cystine est non seulement inutile, mais nuisible. Ce fait étant en contradiction avec les observations des auteurs qui ont étudié la culture du Bacille diphtérique en milieux synthétiques (Braun, Hoffmeier et Mundel 1929; Erishmann 1933; Johnson, Pappenheimer et Robinson 1938) il est permis de penser que le milieu tel que nous le préparons contient déjà une proportion suffisante, soit de cystine, soit de quelque substance ayant une action identique.

Extrait de foie.— D'après les travaux de Mueller (1937) l'extrait de foie renferme la Béta-alanine et l'acide nicotinique, qui sont des facteurs indispensables pour l'obtention de toxine dans les milieux synthétiques. L'addition d'extrait de foie à notre milieu n'a pas agi sur la toxinogénèse de façon appréciable.

Fer.— Sous la forme de sulfate ferreux, dissous dans une solution de citrate de soude (Barr, Pope, Glenny et Linggood 1941) et à la dose de 0,0001 gr. par litre de milieu, le fer agit comme régulateur du *pH* et favorise la toxinogénèse. Il convient d'être prudent dans l'utilisation de ce facteur, car un très léger excès devient nuisible (Pappenheimer 1936).

STERILISATION

Certains auteurs (Taylor 1935, Pope et Linggood 1939) stérilisent leurs milieux par filtration sur bougie. Nous stérilisons par la chaleur sans dépasser 110° et l'on ajoute les substances complémentaires (stérilisées par filtration) après répartition et stérilisation.

Les résultats obtenus en cultivant dans les conditions habituelles ($S/V=0,56$), 48 lots de 30 à 50 litres du milieu ainsi préparé sont indiqués dans les tableaux II et III, colonne 2. L'amélioration est appréciable, puisque le titre le plus bas est 24 Lf/cc, que 11,8 pour 100 des lots seulement titrent moins de 30 Lf/cc et que le titre maximum atteint 50 Lf/cc.

Néanmoins l'écart entre les titres minima et maxima restait considérable et inexplicable.

III-Conduite des cultures

Les milieux à base de macération et de digestion de viande, additionnés de glucides et de levure, ne peuvent avoir une composition rigoureusement constante, quels que soient les soins apportés à leur préparation. On peut donc admettre que des lots de bouillon différents donnent des résultats plus ou moins bons. Mais lorsque la production de toxine est très différente dans divers ballons renfermant le même milieu, la composition de ce milieu ne peut être raisonnablement mise en cause.

Si les autres facteurs : température d'incubation, forme des vases, rapport S/V , durée d'incubation, sont rigoureusement identiques, il ne reste qu'un seul facteur susceptible de variations, et ce facteur est l'aération.

Dès 1894, Roux et Martin, jugeaient nécessaire de réaliser un courant d'air dans les ballons de culture. Aronson (1900) proposa de simplifier la procédure en répartissant le milieu en couche mince dans de très grands vases renfermant un grand volume d'air. Par la suite, Bunker (1919), Hartley et Hartley (1922), Andrewes *et al* (1923) insistèrent sur la grande importance de la „capacité et de la forme des vases”; ils montrèrent que la courbe représentant la production de toxine atteint son sommet d'autant plus rapidement que la quantité de milieu cultivée est plus faible.

Marbé *et al.* (1933) étudiant le rôle du glucose et du maltose, observèrent que ces sucres ne sont convenablement utilisés que si l'oxygénation de la culture est suffisante. Pour réaliser cette

oxygénation ils „emploient un très petit volume de bouillon représentant une très grande surface d'aération". D'après leurs chiffres, nous estimons que le rapport S/V devait, dans leurs expériences être voisin de 0,56. Mlle. Taylor (1936) va beaucoup plus loin, et en utilisant un milieu particulièrement riche elle porte la valeur S/V jusqu'à 1,20. Elle est ainsi conduite à cultiver de très petites quantités de milieu (parfois 50cc. seulement) sous une épaisseur de 8mm.

Enfin dans leur technique de 1939, que nous avons suivie pendant près de deux ans, Loiseau et Philippe, se basant sur les résultats de Marbé, réduisent le volume du milieu de 1200 à 500cc., faisant ainsi passer S/V de 0,23 à 0,56, et obtiennent une élévation du titre en Lf/cc d'environ 38 p. 100.

Nous n'aurions sans doute pas contrôlé attentivement les divers travaux qui viennent d'être énumérés, si l'un de nous (H. Mir Chamsi) n'avait pas fait les deux observations suivantes:

1) Les ballons où l'on prélève chaque jour les quelques centicubes de milieu nécessaires aux titrages, présentent toujours, en fin d'incubation, un titre en Lf/cc plus élevé que les autres.

2) Les ballons placés à la chambre étuve entre deux étagères, ou dans un coin, donnent toujours un titre plus bas.

En rapprochant ces deux faits, nous avons pensé qu'on pouvait y voir le résultat d'une aération activée dans le premier cas, et ralentie dans le second. Cette hypothèse put être facilement vérifiée: il suffit, après avoir renouvelé l'air de la chambre étuve, d'ouvrir chaque jour pendant quelques instants les ballons de culture, avec les précautions d'aseptie convenables, pour supprimer les différences de titre entre les divers ballons, et, fait non moins intéressant, pour augmenter dans tous les ballons la production de toxine.

Si, dans un même lot, on ferme une partie des ballons au coton et d'autres avec un bouchon de caoutchouc, on observe que dans les ballons fermés au caoutchouc, la réaction du milieu reste

acide, la culture pauvre, la production de toxine nulle.

Enfin, si après 7 jours d'incubation normale, on remplace le bouchon de coton par un bouchon de caoutchouc, la culture est paralysée: l'alcalinisation du milieu et la production de toxine sont immédiatement arrêtées.

Ainsi l'artifice qui consiste à étaler le milieu dans de très grands vases pour assurer une oxygénation suffisante, ne peut être utile que si l'atmosphère intérieure des ballons est régulièrement renouvelée. Les ballons de culture étant laissés au repos pendant toute l'incubation, la couche d'air située au dessus de la surface se trouve rapidement viciée, même si le bouchon de coton est assez perméable et l'étuve bien aérée. Les variations inévitables de ces deux derniers facteurs, expliquent parfaitement les variations de la toxinogénèse entre les divers ballons d'un même lot.

L'amélioration de l'oxygénation que l'on prétend obtenir en augmentant le volume d'air dans les ballons, par réduction du volume du milieu, ne peut être que négligeable: on ne saurait raisonnablement employer des vases assez grands pour que la composition de leur atmosphère ne soit pas sérieusement altérée pendant la durée de l'incubation.

Cette opinion nous met apparemment en contradiction avec les auteurs que nous avons précédemment cités, mais la contradiction n'est qu'apparente, et nous semble résulter d'un malentendu. En effet, ces auteurs constatent qu'en élevant le rapport S/V par réduction de V, ils obtiennent plus rapidement un *titre* plus haut. Le fait est exact, mais on peut aisément calculer que la quantité totale de toxine produite, non seulement n'est pas plus élevée, mais encore est nettement abaissée. Il suffit d'examiner le tableau I que nous avons dressé avec les renseignements donnés par Marbé (1933) et Loiseau et Philippe (1939) pour voir que lorsque le volume du milieu est réduit de 58 p. 100, la surface restant constante, la quantité totale de toxine produite tombe de 45 p. 100.

Dans ce tableau, nous avons introduit le rapport: Nombre

d'Unités Lf, par centimètre carré de surface (Lf/cm²), la valeur de ce rapport indique bien l'intensité de la toxinogénèse et est beaucoup plus significative que le titre en Lf/cc, qui mesure seulement la concentration.

TABLEAU I

	S/V=0,23	S/V=0,56
Volume du milieu	1.200cc	500 cc.
Surface de culture	380cm ²	380cm ²
Capacité du vase	2.000cc.	2.000cc.
Titre en Lf,cc	26,2	35,9
Total Lf par vase	31.440	17.950
Lf par centimètre carré de surface (Lf cm ²)	83	47.

Cette diminution de la quantité de toxine produite par une même surface de culture, montre que l'artifice qui consiste à élever le rapport S/V pour augmenter l'oxygénation, est insuffisant. Nous ignorons quelle est exactement la proportion d'Oxygène la plus favorable à la toxinogénèse diphtérique, mais il est certain qu'elle ne doit pas être inférieure à celle de l'air normal. La seule manière efficace d'assurer une oxygénation constante au niveau de la surface de culture, est de revenir au procédé de Roux et Martin, et de réaliser par un dispositif approprié une aération continue.

La réalisation d'expériences sous aération intensifiée (1), nous a permis de mettre plus nettement en évidence le fait que l'élévation du rapport S/V au dessus de certaines limites est en soi nuisible à la toxinogénèse.

1. — Etudiant jour par jour les variations du *pH*, et la production de toxine, nous avons vu qu'avec notre milieu, réparti à raison de 500cc. dans des Fernbach de 19 cm. de diamètre, (S/V=0,56) et

1) Les expériences sur lesquelles est basé le présent travail n'ont pas été faites sous "aération continue" parce que nous ne disposions pas pendant la guerre du matériel nécessaire, mais en ouvrant chaque jour les vases de culture dans les conditions indiquées plus haut. De nouvelles expériences sont en cours pour mettre au point un dispositif assurant une aération permanente.

régulièrement aéré, on obtient un graphique analogue au graphique 22 (Fig. 1). Le renversement de l'acidité initiale se produit le 3^o jour et l'on rentre dans la zone alcaline le 4^o jour. La production de toxine commence vers ce moment, puisque dès le 5^o jour la concentration atteint 25 Lf/cc. Puis, l'alcalinisation progresse rapidement, et le 8^o jour atteint $pH:8,4$. Ce même jour la toxinogénèse est interrompue et le titre reste fixé à 38 Lf/cc, bien que l'incubation soit poursuivie jusqu'au 12^o jour. Ainsi, la culture n'est restée dans une zone favorable à la toxinogénèse ($pH :7,0 - pH :8,4$) que pendant 4 jours. Valeur Lf/ cm² = 71, 4.

La figure 5 représente un graphique établi d'après les graphiques individuels de 3^o cultures réalisées dans les mêmes conditions. On voit que la valeur limite $pH: 8,4$ est atteinte entre le 7^o et le 9^o jour et que l'arrêt de la toxinogénèse se place entre le 8^o et le 10^o jour. Si l'on examine comparativement le graphique 4, d'après le travail de Loiseau et Philippe (1939), qui figure la marche de la réaction dans 26 lots cultivés dans les mêmes conditions que les nôtres ($S/V = 0,56$) on voit qu'avec le milieu employé par ces auteurs les phénomènes sont analogues à ceux que nous décrivons: le milieu ne reste dans la zone favorable que pendant 5 à 6 jours.

De même Marbé (1923) indique qu'après 7 jours ses cultures sont à $pH: 8,0 - 8,2$ et ont atteint leur titre maximum.

2—Sans rien changer aux autres conditions nous avons alors porté le volume du milieu à 750 cc., ramenant ainsi la valeur S/V de 0.56 à 0,36. Le graphique 32 (fig.2) montre que la marche des phénomènes a été considérablement modifiée: le pH est resté dans la zone favorable du 3^o au 14^o jour, et le titre s'est élevé régulièrement pour se fixer à 55 Lf/cc le 14^o jour. Valeur Lf/cm² = 147.

3.—Enfin, en portant le volume à 1000 cc. ($S/V=0,28$), la marche de la réaction a été encore retardée (graphique 33, fig. 3). Le retour initial à la neutralité ne s'est produit que le 4^o jour, mais du 5^o au 11^o jour le milieu s'est maintenu avec une constance remarquable à $pH: 7,5$. Le titre n'a cessé de croître jusqu'au 16^o jour, moment où il a atteint 55 Lf/cc, ($pH: 8,4$). Valeur Lf/cm² = 196.

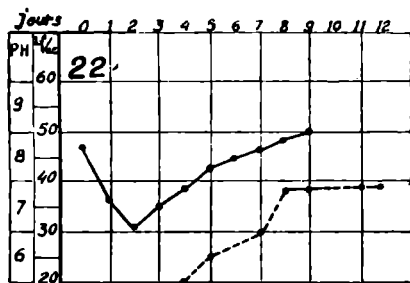


Fig. 1 $S/N = 0.56$

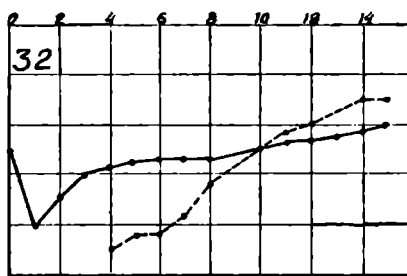


Fig. 2 $S/N = 0.36$

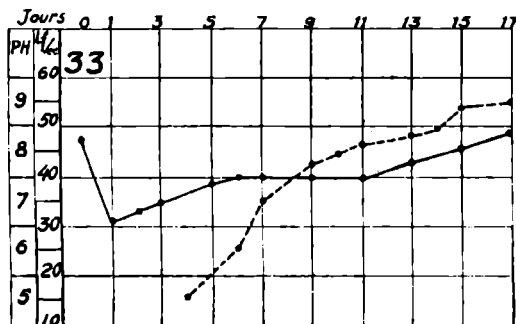


Fig. 3 $S/N = 0.28$

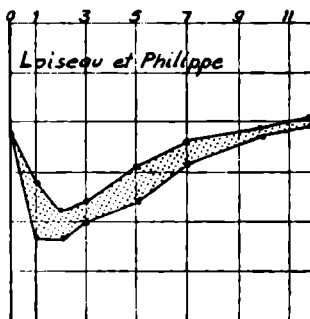


Fig. 4 Marche de la reaction dans 26 préparations $S/N = 0.56$

— Variations du pH
 - - - Titre en Lf/cc.

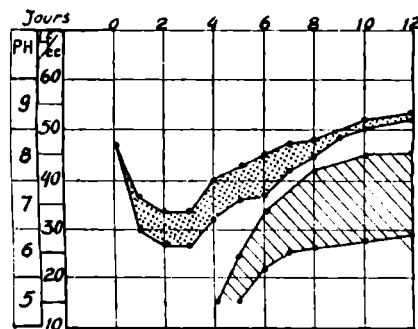


Fig. 5. Resultat de 30 préparations $S/N = 0.56$

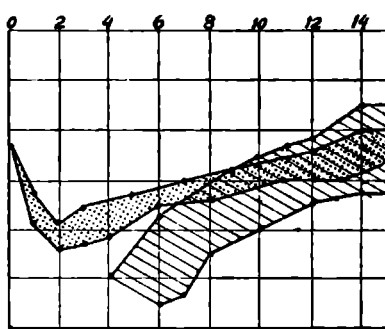


Fig. 6. Resultat de 59 préparations $S/N = 0.28$

••• pH
 // Lf/cc

La figure 6, représente un graphique établi avec 59 graphiques partiels relatifs à des cultures effectuées dans les mêmes conditions ($S/V = 0,28$), et par comparaison avec le graphique la figure 6 permet d'apprécier le progrès réalisé.

En abaissant le rapport S/V de 0,56 à 0,28 par augmentation de V de 500 à 1000 cc., S restant constante, le titre moyen calculé sur 59 lots est passé de 36, 7 à 43 Lf/cc, et le titre maximum de 50 à 56 Lf/cc. Cette augmentation de la concentration est due à une véritable augmentation de la quantité de toxine produite, puisque le nombre total moyen d'unités Lf par Fernbách est passé de 18.350 à 43.000 (soit une augmentation de 134 pour 100 environ) et la valeur Lf/cm² de 65 à plus de 150.

Au point de vue pratique, notre technique permet d'obtenir dans un seul Fernbach et sous le volume d'un litre, les 45 à 50.000 Lf nécessaires pour l'hyperimmunisation d'un cheval.

Nous interprétons ces résultats de la façon suivante. Dans les cultures, le véritable générateur de toxine est le voile qui se forme en surface (Voir Pope et Healey 1933). Il est donc essentiel que le voile soit aussi étendu que possible, ce qui est fonction du diamètre du vase, et qu'il se forme et se renouvelle dans de bonnes conditions, ce qui est fonction du milieu et de l'oxygénation. Mais pour que la multiplication microbienne s'accompagne de production de toxine, il semble qu'un supplément d'éléments nutritifs soit nécessaire. On ne peut donc pas porter au delà de certaines limites le rapport S/V , par réduction de V , sans priver la culture des éléments indispensables à la toxinogénèse.

D'autre part, bien que la nature intime des phénomènes qui aboutissent à la production de toxine soit inconnue, on sait que les limites du pH entre lesquelles cette production est possible sont plus étroites que les limites favorables à la multiplication microbienne. Nous avons montré que, lorsque le volume du milieu est réduit, les variations du pH sont brutales et rapides. Il en résulte qu'une culture en pleine phase de multiplication, perd prématurément son pouvoir toxigène.

Contrairement à ce que l'on a pu croire, l'augmentation de la valeur S/V n'accélère pas et n'intensifie pas la toxinogénèse, et l'élévation plus rapide du titre, qui en résulte, est, comme nous l'avons vu, un simple phénomène de concentration. La réduction de la valeur S/V, ne ralentit pas la toxinogénèse et ne l'intensifie pas, mais elle permet de prolonger sa durée, et de recueillir intégralement toute la toxine qu'une certaine surface de culture est capable de produire.

Il convient donc, pour chaque milieu employé de déterminer la valeur optima du rapport S/V et la durée optima de la période d'incubation. Il est évident que V ne devra pas être inutilement augmenté, puisqu'il en résulterait une dilution inutile de la toxine.

Les résultats que nous avons donné ci-dessus ne sont que provisoires. En effet, pendant la guerre, nous n'avons pas disposé d'un matériel permettant de réaliser dans de bonnes conditions l'aération continue, ni d'abaisser le rapport S/V au dessous de 0,28 sans diminuer la valeur de S. Des expériences actuellement en cours permettent de prévoir qu'en forçant l'oxygénation, il sera possible de fixer plus bas encore la valeur optima de S/V, c'est-à-dire d'obtenir avec un matériel moins encombrant une production plus abondante de solutions toxiques plus concentrées.

La prolongation du temps d'incubation jusqu'à 16 jours peut soulever des objections. Il est classique en effet, de limiter à 10 ou 12 jours le séjour à l'étuve, des cultures destinées à la production de toxine. Au point de vue purement technique, le délai de 10 à 12 jours était justifié lorsqu'on ne pouvait suivre l'évolution des cultures que par la mesure *in vivo* de la toxicité. On voyait alors la toxicité augmenter jusqu'au 8^o au 10^o jour, puis elle commençait à décroître. En effet, la toxine produite au cours des premiers jours est partiellement transformée en toxoïde, et les nouvelles quantités de toxine produites au cours des derniers jours ne compensent pas cette détérioration.

La méthode de floculation nous permet actuellement de mesurer la quantité totale d'antigène (toxine+toxoïde) présente dans le bouillon, et nous montre que le titre en Unités antigéniques

continue à s'élever aussi longtemps que se poursuit la toxinogénèse. Notre but final étant l'obtention de toxine détoxiquée (anatoxine), il nous importe peu que la détoxification commence pendant l'incubation. Donc, pour obtenir une production maxima d'antigène, la culture doit rester à l'étuve, aussi longtemps que la courbe du titre en Lf continue à s'élever. Les anatoxines obtenues avec des cultures de 16 ou 18 jours flocculent aussi rapidement, se prêtent aussi bien à la concentration, et ont un pouvoir immunisant aussi élevé que celles qui sont obtenues avec des cultures de 10 à 12 jours.

En ce qui concerne les anatoxines destinées à l'usage humain, les règlements de certains Pays limitent la durée maxima de l'incubation. Il est probable que cette précaution a pour but d'éviter l'emploi de bouillons renfermant un taux élevé de protéines provenant de la lyse des corps microbiens. On suppose en effet d'une part que la quantité de corps microbiens lysés est d'autant plus grande que le temps d'incubation est plus long, d'autre part que les protéines microbiennes peuvent provoquer des réactions chez les sujets vaccinés.

Ce sont là des suppositions : le premier point n'a jamais été vérifié par des mesures précises. Quand au second point, nous n'avons jamais observé, et il ne nous a jamais été signalé par les médecins qui emploient nos anatoxines, des réactions pouvant être rattachées à la prolongation de l'incubation.

Néanmoins, si l'on veut pour des raisons quelconques respecter la règle des 8, 10 ou 12 jours, il est facile de réserver pour l'usage humain les bouillons ayant atteint un titre assez élevé dans le délai prescrit. Avec la technique que nous avons décrite, plus de 50 pour cent des lots atteignent ou dépassent dès le 8^e jour le titre de 40 Lf/cc. (1)

Conclusion

Les conditions d'isolement ou nous nous sommes trouvés par

(1) Mentionnons à ce propos que d'après la technique officielle de l'Institut d'Etat de Tarrasevitch (U.R.S.S.), le temps de culture doit être limité à 6-8 jours, mais que les bouillons sont simplement filtrés sur papier et non sur bougie. Les anatoxines doivent titrer au moins 15 Lf cc.

suite de la guerre nous ont amenés à chercher des solutions pratiques à différents problèmes relatifs à la production de la toxine diphtérique. Nous n'avons pas cherché à obtenir des échantillons d'un titre particulièrement élevé, mais à préparer par semaine, sous une concentration moyenne de 40 à 45 Lf/cc, environ 2.000.000 d'Unités flocculantes.

1— La dessiccation d'émulsions bacillaires en sérum frais de cheval dans le vide et à la température du laboratoire (25°) permet de stabiliser la fonction toxigène pendant au moins deux ans.

2— En substituant à la digestion Martin, ou aux peptones du commerce, une peptone de laboratoire, en remplaçant les sucres du commerce par une digestion de malt, et en employant la levure selon la technique de Bordet, on peut se dispenser de l'emploi de pan-ses de porc et éviter des échecs attribuables à la qualité incertaine des produits du commerce.

Le milieu ainsi préparé, cultivé selon la technique habituelle permet d'obtenir des solutions toxiques dont le titre est dans 90 pour 100 des cas compris entre 30 et 50 Lf/cc.

3— L'aération réalisée dans les vases de culture (quelle que soit leur forme et leur capacité) par la seule diffusion des gaz au travers du bouchon de coton, est toujours insuffisante, et peut être entravée plus ou moins complètement par diverses causes inévitables dans la pratique courante. Ceci explique les irrégularités de toxinogénèse fréquemment constatées entre les divers ballons d'un même lot, et qui peuvent être évitées en assurant le renouvellement journalier ou continu de l'atmosphère des ballons.

4— La surface de culture doit être aussi grande que possible, mais il convient de respecter une certaine proportion entre cette surface et le volume du milieu (rapport S/V). En augmentant la valeur S/V par diminution de V, de façon à cultiver le milieu sous une faible épaisseur, on obtient une élévation du titre, c'est-à-dire de la concentration en toxine par centimètre cube de milieu, mais la quantité totale de toxine produite est considérablement diminuée. En effet, l'alcalinisation progresse très rapidement, et les conditions

favorables à la toxinogénèse (pH : 7,0 à pH : 8,4) ne sont réalisées que pendant 4 à 5 jours. En maintenant la valeur S/V aux environs de 0,30 (environ 3,5 cc de milieu par centimètre carré de surface), l'alcalinisation est considérablement ralentie et le milieu reste dans la zone favorable à la toxinogénèse pendant 10 à 19 jours.

Dans nos conditions d'expérience, l'abaissement de la valeur S/V de 0,56 à 0,28 (la durée d'incubation étant portée de 12 à 16 jours) a élevé la production moyenne de toxine par centimètre carré de surface de 65 Lf à plus de 150 Lf, et la concentration est passée en moyenne de 36,8 Lf/cc. à 43 Lf/cc.

La prolongation de la durée d'incubation n'a aucune action fâcheuse sur la qualité des antigènes obtenus.

TABLEAU II

Groupement par fréquence des titres des toxines obtenues sur 152 lots, par 3 techniques différentes.

Colonne I : Milieu de Loiseau et Philippe (1939) 500cc. par Fernbach

Colonne II: Milieu personnel, 500 cc. par Fernbach, cultivé 12 jours.

Colonne III. Milieu personnel, 100cc. par Fernbach, cultivé 15 jours avec aération intensifiée.

La fréquence des titres obtenus est calculée pour 100 lots.

Lf/cc	I	II	III
0	5,6	0	0
12	3,7	0	0
14	3,7	0	0
18	5,6	0	0
20	5,6	0	0
22	1,8	0	0
24	7,4	1,7	0
25	3,7	3	0
26	5,6	1,7	0
27	1,8	1,7	0
28	3,7	2,7	2,5
30	20,0	17,0	7,7
32	1,8	8,5	5,1
34	5,6	6,7	1,5
36	3,6	4,7	7,7
38	1,8	8,7	12,6
40	9,2	11,5	18,0
42	3,7	6,7	7,7
44	5,4	10,2	7,6
46	0,8	10,2	2,5
48	0	3,0	5,1
50	0	1,7	7,7
52	0	0	5,1
54	0	0	2,5
56	0	0	5,0

TABLEAU III

Titres moyens et extrêmes par centicube et rendements moyens et extrêmes par Fernbach, calculés sur 152 lots

Colonne I: Milieu de Loiseau et Philippe (1939), 500cc. par Fernbach.
Colonne II: Milieu personnel, 500cc. par Fernbach, cultivé 12 jours.
Colonne III: Milieu personnel, 100cc. par Fernbach, cultivé 15 jours avec aération intensifiée.

	I			II			III		
	Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.
Lf/cc	0	27,8	46	24	36,7	50	28	43	56
Total Lf par Fernbach	0	13.900	23.000	12.000	18.350	25.000	28.000	43.000	56.000

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

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWES, F. W.** *et al* 1923—"Diphtheria" London (H. M. Stationery Office)
- ARONSON, H.** —1900—Arch. f. Kinderh.—30 p. 25
- BARR, GLENNY, POPE and LINGGOOD** — 1941 — The Lancet, Sept. 13—p. 301
- BERTHELOT et Melle G. AMOUREUX**—1923—Bull. de la Soc. de Chimie Biol. 14—p. 286.
- BORDET, P.** 1937—C. R. de la Soc. de Biol.—125—p. 1044.
- BORDET, P.** 1938—Rapport au 1er. Congrès de l'Ass. des Microbiol. de langue française. Octobre 1938.
- BRAUN, HOFMEIER et MUNDEL** — 1929 — Zentralbl. für Bakteriol. etc. 113—530
- BUNKER, J.W.M.**—1919—J. Bact. 4—p. 389
- ERISHMANN**—1933—Zentralbl. für Bakteriol. 127—p. 111
- HARTLEY, P. et HARTLEY. O.**—1922—J. Path. and Bacteriol. 25p. 458 et 468
- JOHNSON, PAPPENHEIMER et ROBINSON**—1938—J. of Bacteriol. 35—p. 8.
- LOISEAU et PHILIPPE**—1939—Ann. de l'Inst. Pasteur 62—p. 469
- MARBE et Al.**—1933—C. R. Soc. Biol.—113—p. 489

- MUELLER**—1937— J. of Bacteriol. 34—p. 163 et 429.
- MUSTAPHA** — 1936—C. R. de la Soc. de Biol. 126—p. 1044.
- PAPPENHEIMER, A. M.**— 1936—Brit. J. Exp. Path. 17—p. 342
- POPE et HEALEY** —1933—Brit. J. of Exp. Path. 14—p. 77
- POPE et LINGGOOD** —1939—The British J. of Exp. Path XX - p. 297.
- RAMON, G.** —1929—C. R. Acad. des Sc. 189—p. 64.
- RAMON, G.** — 1939— Rev. d'Immunologie—5— p. 385.
- RAMON et BERTHELOT.**—1932—C.R. de la Soc. de Biol. 110—p.530.
- ROUX et MARTIN** — 1894— Ann. de l'Institut Pasteur 8—p. 609
- TAYLOR, E.** —1935—C. R. Soc. de Biol. 119—p. 510 et Ann. de l'Inst. Pasteur, 55—p 474.