

dilatation générale des vaisseaux et une congestion des viscères, surtout marquée aux capsules surrénales. Chez les lapins, c'est surtout le foie qui est congestionné.

Si l'on se sert de même d'une culture plus ancienne, on tue le cobaye encore plus vite (en vingt ou trente heures) ou à des doses très minimes ($\frac{1}{10}$ ou $\frac{1}{15}$ de centimètre cube). Pour tuer un lapin, $\frac{1}{5}$ de centimètre cube de ces liquides de vieilles cultures suffit. Avec des doses plus fortes, on tue ces animaux en quelques heures : deux heures après l'injection, leur poil se hérissé, la respiration devient anxieuse et irrégulière, une diarrhée profuse survient le plus souvent et la mort arrive sans convulsions. Les lésions sont toujours les mêmes.

Si l'on emploie, pour ces expériences, des liquides provenant de cultures jeunes (encore acides) ou de vieilles cultures à doses très minimes, la mort survient moins rapidement et à la suite de paralysies identiques à celles qu'on produit en inoculant les cultures non stérilisées. Ou bien encore les animaux finissent par guérir. En injectant à des pigeons, chaque jour et plusieurs jours consécutifs, de très petites doses de poison diphthérique, Spronk⁽¹⁾ a pu obtenir constamment des paralysies consécutives.

Ce sont les chiens et les lapins qui paraissent présenter la plus grande sensibilité du système nerveux à l'action de la toxine. Babinsky⁽²⁾, qui a examiné les nerfs de lapins ayant succombé à l'intoxication, n'y a rencontré aucune lésion histologique. Stecherbach⁽³⁾, au contraire, a trouvé de la névrite dans des cas analogues. Crocq⁽⁴⁾ a trouvé des altérations des cellules des cornes antérieures de la moelle, et Ceni⁽⁵⁾ a vu les altérations dominer au niveau des prolongements protoplasmiques de ces cellules. Chez des chiens, Henriquez et Hallion⁽⁶⁾ ont provoqué des myélites très étendues. Courmont, Doyon et Paviot⁽⁷⁾ n'ont vu que des lésions nerveuses périphériques accompagnées d'atrophie musculaire.

Plus récemment, Mouravieff⁽⁸⁾ a étudié comparativement chez les cobayes les lésions nerveuses résultant de l'empoisonnement aigu et de l'empoisonnement chronique par les injections de toxine diphthérique. Dans le premier cas, aucun des animaux, morts après quelques jours, ne présentait d'altération des nerfs périphériques ni des ganglions spinaux. Mais chez tous il trouva des lésions très nettes des cellules de la substance grise et surtout de celles des cornes antérieures de la moelle. Ces lésions étaient plus marquées dans certaines régions, la région lombaire en particulier (désintégration de la substance chromatique à début périphérique, puis envahissant toute la cellule; vacuoles). Des altérations analogues, mais bien plus rares, se voyaient aussi dans des cellules du cerveau et de la moelle allongée. Chez les animaux n'ayant reçu que de petites doses de toxine, atteints de paralysies tardives et sacrifiés 5 à 6 semaines après la première injection, Mouravieff trouva dans les centres des lésions analogues, mais moins marquées, et un certain nombre de cellules atrophiées; de plus, il constata des lésions plus ou moins accentuées de névrite au niveau des nerfs des extrémités, surtout des extrémités postérieures. Un très grand

⁽¹⁾ C. R. Académie des Sciences, 1889.

⁽²⁾ Bulletin médical, 1889, p. 70; et Gazette hebdomadaire, mai 1890.

⁽³⁾ Revue neurologique, 1895.

⁽⁴⁾ Arch. de méd. expérimentale, 1898.

⁽⁵⁾ Revue neurologique, 1896.

⁽⁶⁾ Revue neurologique, 1895.

⁽⁷⁾ Archives de physiologie, avril 1896.

⁽⁸⁾ Archives de méd. expérimentale, 1897.

nombre de fibres (près de la moitié dans un cas) présentaient des altérations très avancées: la myéline était fragmentée et en grande partie dissoute; beaucoup de cylindres-axes manquaient, et d'autres étaient gonflés et mal colorés. Dans d'autres, on observait des phénomènes de régénération; un filet très fin de myéline normale, à contours irréguliers, passait entre les boules de myéline et les noyaux accumulés. Dans d'autres fibres, le processus irritatif n'était qu'à son début. Les racines, surtout antérieures, présentaient des lésions analogues, plus légères. Enfin quelques cellules des ganglions spinaux correspondants étaient altérées, çà et là, comme celles de la moelle. Il n'y avait pas d'atrophies musculaires. L'auteur conclut de ses observations que le poison diphthérique porte d'abord son action de préférence sur les cellules motrices de la moelle, et y détermine des altérations spéciales. Ces altérations guérissent dans un très grand nombre de cellules, et entraînent la destruction des autres. Elles n'entraînent pas de paralysies immédiates, mais (même celles qui sont curables) suffiraient à influencer sur la nutrition des fibres nerveuses auxquelles les cellules malades servent de centres trophiques, et à déterminer secondairement leurs altérations.

Sur les muqueuses des animaux, les instillations prolongées de toxine diphthérique déterminent la formation de fausses membranes. Roger et Bayeux⁽¹⁾ ont ainsi provoqué chez des lapins un croup avec fausses membranes laryngo-trachéales. Chez des animaux de même espèce, Morax et Elmasian⁽²⁾ ont obtenu une conjonctivite pseudo-membraneuse.

Les souris et les rats présentent à l'action de ces cultures filtrées une résistance semblable à celle qu'ils montrent à l'action des cultures non stérilisées. Pour tuer une souris de 10 grammes, il a fallu à Roux et Yersin lui injecter sous la peau un centimètre cube de liquide concentré par l'évaporation, et correspondant à 17 centimètres cubes de liquide de culture, quantité suffisante pour tuer 80 cobayes.

Caractères chimiques et nature du poison diphthérique. — Nous ne savons pas encore exactement quelle est la nature de ce poison. Pour résoudre cette question, il faudrait l'isoler et en faire l'analyse; mais jusqu'ici les tentatives des expérimentateurs ont échoué, ou n'ont donné que des résultats incomplets ou douteux.

Roux et Yersin ont conclu de leurs recherches que le poison diphthérique était un corps voisin des diastases, car il possède de nombreux caractères qui le rapprochent de cette classe de ferments, bien qu'il soit sans action sur le sucre et sur les albuminoïdes. En effet, comme les diastases, ce poison est modifié par la chaleur et par l'action de l'air; il est précipité par l'alcool; il a la propriété d'adhérer facilement aux précipités.

Lorsqu'on le chauffe à 58° pendant une heure, le liquide perd en grande partie sa toxicité; car, avec 2 centimètres cubes, on ne peut plus tuer un cobaye. Chauffé pendant deux heures à la même température, il ne produit plus chez l'animal qu'un léger œdème. Si l'on porte la température à 100° pendant quelques instants, il devient inoffensif pour le cobaye à la dose de 55 centimètres cubes dans les veines. Cependant les liquides chauffés ne perdent pas tout leur pouvoir toxique: injectés sous la peau et dans les veines des animaux en quantité suffisante, ils les tuent presque toujours avec des accidents

⁽¹⁾ C. R. Soc. biologie, mars 1897.

⁽²⁾ Annales de l'Institut Pasteur, 1898, p. 210.

paralytiques. L'addition d'iode (solutions iodées), d'eau oxygénée, de liqueur de Labarraque, d'acide lactique, de permanganate de potasse, diminue la toxicité de ces liquides, comme le chauffage.

Conservé en vase clos (tube scellé à la lampe) dans l'obscurité, le liquide filtré conserve très longtemps son activité. Roux et Yersin l'ont trouvé, au bout de cinq mois, aussi actif que le jour où ils l'avaient mis en tubes scellés. Lorsqu'on laisse ces tubes exposés à la lumière solaire, leur contenu perd un peu de sa toxicité. Il en est de même si on conserve dans l'obscurité des tubes bouchés seulement avec un tampon de coton permettant le passage de l'air. Mais s'ils sont alors exposés à la lumière, la toxicité du liquide diminue très rapidement.

Lorsqu'on concentre dans le vide le liquide filtré et qu'on y ajoute cinq à six fois son volume d'alcool, il se forme un précipité abondant contenant la matière toxique. Ce précipité peut être recueilli et redissous dans l'eau, mais alors il a perdu une partie de sa toxicité.

Si l'on ajoute au bouillon stérilisé une certaine quantité de chlorure de calcium, on obtient un abondant précipité de phosphate de chaux, qui, recueilli sur un filtre, lavé et séché, se montre très toxique. En ajoutant de nouveau du chlorure de calcium au liquide précédemment traité de la même manière, on obtient encore un précipité, souvent plus toxique que le premier. Mais, ensuite, la toxicité des produits obtenus successivement devient de moins en moins marquée, jusqu'à ce qu'il ne s'en forme plus. Cependant toute la substance toxique du liquide n'est pas entraînée de cette façon : le bouillon ainsi traité tue encore les animaux en quelques jours. Quant au poison fixé au phosphate de chaux desséché, il n'est plus aussi sensible à l'action de la chaleur que lorsqu'il est dissous dans les bouillons de culture. En inoculant des cobayes avec une très petite dose de ces précipités préalablement chauffés à l'air à 100°, on les tue constamment. Ils meurent en trois ou quatre jours seulement; ce qui prouve que la chaleur n'a produit qu'une simple atténuation de la toxicité.

En évaporant dans le vide, à 25°, des bouillons de vieilles cultures, on obtient un résidu dont une partie seulement est soluble dans l'alcool, qu'il colore en jaune. Ces solutions alcooliques ne sont pas toxiques. Le poison reste dans le résidu insoluble dans l'alcool : ce résidu, dissous dans l'eau, donne un liquide extrêmement toxique.

Mais ce liquide ne contient pas le poison diphthérique à l'état de pureté; et on n'a pu réussir à l'en isoler. Brieger et Fränkel⁽¹⁾ en ont extrait une substance azotée, une *toxalbumine*, mais leurs expériences, pas plus que celles de Wassermann et Proskauer⁽²⁾, de Gamaleia⁽³⁾, etc., n'ont fait que montrer que le poison diphthérique était en réalité un *mélange de diverses substances*, dont la nature reste à déterminer.

Un caractère particulier du poison diphthérique signalé par Roux et Yersin est sa très faible diffusibilité. En soumettant le bouillon filtré à la dialyse et en pratiquant des inoculations successives avec le liquide qui passe chaque jour, on reconnaît que celle-ci est très lente. On s'explique ainsi les paralysies expérimentales tardives qu'on peut observer chez les lapins et surtout chez les chiens après l'injection sous-cutanée d'une faible dose de poison, de même que

⁽¹⁾ *Berliner klin. Wochens.*, mars 1890.

⁽²⁾ *Deutsch. med. Woch.*, 1891.

⁽³⁾ *C. R. Soc. Biol.*, février 1892. — *Les Poisons microbiens*, Paris, 1892, p. 129.

les accidents d'ordre paralytique qu'on voit assez souvent survenir chez l'homme longtemps après la disparition des fausses membranes gutturales.

Gamaleia a constaté que certaines diastases, telles que la pepsine et la pancréatine, décomposent énergiquement le poison diphthérique, en donnant pour produit une substance précipitable par l'alcool, et décomposable par le chauffage avec les alcalis fixes. Cette action des ferments digestifs sur le poison explique son innocuité relative lorsqu'il est absorbé par les voies digestives. Roux et Yersin, en effet, ont pu faire ingérer ainsi aux animaux, sans qu'ils parussent en souffrir, une dose de liquide de culture filtré, plus de vingt fois supérieure à celle qui les tue en trois jours en injection sous-cutanée.

Variations de la toxicité des liquides de culture. — Pour évaluer le degré de toxicité des bouillons filtrés, on détermine pour chacun d'eux la dose suffisante pour tuer, en vingt-quatre à quarante-huit heures, un cobaye de 500 grammes en injection sous-cutanée. En général, pour les liquides filtrés composés de bouillon de veau peptonisé à 2 pour 100, $\frac{1}{10}$ de centimètre cube suffit pour tuer l'animal. On dit alors que la toxine est active *au dixième*. Mais cette toxicité est bien loin de représenter un maximum. On peut, en effet, obtenir, par des procédés particuliers qui vont être signalés ci-après, des toxines actives au $\frac{1}{50}$ (Roux et Yersin), au $\frac{1}{200}$ (Park et Williams), et même au $\frac{1}{500}$ (L. Martin). — Il importe de remarquer que ces variations de toxicité des liquides de culture peuvent être obtenues par l'ensemencement d'un même microbe. Il s'agit donc d'une modification de son pouvoir toxigène, *in vitro*, due à la composition du bouillon dans lequel il se développe.

Tout d'abord, ainsi que Roux et Yersin l'ont établi, les cultures ne sont jamais énergiquement toxiques qu'après être redevenues alcalines. Tant qu'elles sont acides, elles sont peu toxiques; et si, après qu'elles sont devenues alcalines, on y ajoute un acide (acide lactique), on diminue leur toxicité, qui atteint son minimum lorsque la réaction est redevenue franchement acide. Au contraire, la toxicité des cultures augmente en même temps que son alcalinité.

Comme les cultures en bouillon, alcalines au moment de l'ensemencement, deviennent acides dès les premiers jours et conservent cette acidité assez longtemps avant de redevenir alcalines, Roux et Yersin ont cherché, pour obtenir plus vite une toxine active, à abrégé cette période d'acidité. Ils sont parvenus à la réduire beaucoup en aérant largement leurs cultures, dès qu'elles étaient bien développées, à l'aide d'une trompe aspirante mise en communication avec des récipients à fond plat et y produisant un courant d'air constant. Ils ont obtenu de cette façon, en quinze jours, des liquides dont la toxicité était égale à celle qu'ils n'eussent présentée qu'au bout d'un mois sans aération.

Park et Williams⁽¹⁾ sont arrivés à produire plus rapidement des liquides beaucoup plus toxiques, en cultivant le bacille dans des bouillons très alcalins. Avant d'ensemencer, ils neutralisent d'abord le bouillon, puis ils l'alcalinisent en y ajoutant 7 centimètres cubes de soude normale par litre. Dans ce milieu, où l'acidité ne dure que deux à trois jours, se forment des toxines actives au $\frac{1}{100}$ et même au $\frac{1}{200}$.

Spronck a réussi récemment à cultiver le bacille dans un liquide préparé sans viande. Il emploie une décoction de levure, additionnée de sel marin et de

⁽¹⁾ *Journ. of. experiment. Medicine*, janvier 1896.

peptone, puis alcalinisée. Avec ce milieu de culture, il a obtenu en six jours une toxine active au $\frac{1}{5000}$, sans que le bouillon ait perdu à aucun moment son alcalinité⁽¹⁾.

Les toxines les plus actives ont été obtenues par L. Martin. En cultivant le bacille dans un milieu dont la préparation est assez complexe, obtenu par la macération dans l'eau d'un hachis de viande de veau et le mélange du liquide filtré avec du bouillon peptonisé préparé avec des estomacs de porc, additionné de sel marin et alcalinisé avec de la soude, il est parvenu à obtenir, sans acidification du liquide, une toxine active à $\frac{1}{5000}$ ⁽²⁾.

Immunsation des animaux contre le virus et le poison diphthériques.

— Dès que l'agent spécifique de la diphthérie fut connu, on s'efforça, en utilisant les moyens antérieurement reconnus applicables dans d'autres maladies infectieuses, de donner artificiellement aux animaux sensibles à la diphthérie l'immunité que certains d'entre eux, les rats surtout, présentent naturellement.

C. Fraenkel⁽³⁾, le premier, réussit à immuniser des cobayes contre la diphthérie, en leur injectant de petites doses de toxine modifiée par le chauffage à 70°, prolongé pendant une heure environ. Presque en même temps, Behring⁽⁴⁾ arrivait au même résultat par des injections de toxine additionnée de trichlorure d'iode. Brieger et Wassermann, au lieu des liquides filtrés, utilisèrent des cultures pures du bacille dans le bouillon de thymus, qu'ils injectèrent à doses graduellement croissantes, après les avoir modifiées par le chauffage pendant un quart d'heure à 65° ou 70°. Puis Behring renonça à son premier procédé, et ne se servit plus que de toxines pures, injectées à très petites doses d'abord, et à longs intervalles. Ces premiers essais avaient réussi sur des cobayes et des lapins; mais les succès étaient inconstants: beaucoup d'animaux succombaient, et quelques-uns seulement arrivaient, après un long traitement vaccinal, à l'immunsation.

Bardach et Aronson réussirent plus facilement en opérant sur le chien. Behring parvint à immuniser des moutons et des chèvres, Erlich des vaches. Les chèvres et même les vaches sont tellement sensibles à la toxine que beaucoup d'entre elles succombent.

Roux et Martin⁽⁵⁾ recoururent à la méthode que Roux et Vaillard avaient déjà utilisée dans leurs recherches sur le tétanos: ils se servirent de toxines iodées. En injectant d'abord au lapin un demi-centimètre cube d'un mélange de deux volumes de toxine et un volume de liqueur de Gram, tous les quatre ou cinq jours, pendant quelques semaines, puis en augmentant ensuite les doses, et en diminuant la proportion d'iode, ils arrivèrent à la toxine pure, et à l'immunsation. Mais celle-ci n'est obtenue que très lentement: on doit interrompre les injections dès que l'animal diminue de poids, sous peine de les mener à une cachexie mortelle. Ces mêmes auteurs répétèrent leurs expériences sur la chèvre, le mouton, la vache, l'âne, et se heurtèrent toujours aux mêmes difficultés: la sensibilité, très grande, de ces divers animaux à la toxine, expose à des mécomptes et à des accidents inattendus. Ils arrivèrent, au contraire, très faci-

⁽¹⁾ *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 701.

⁽²⁾ Pour les détails de la préparation de ce bouillon, voy.: *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 26 et suivantes.

⁽³⁾ *Berl. klin. Wochens.*, 1890, n° 40.

⁽⁴⁾ *Deutsch. med. Woch.*, 1890, n° 49 et 50.

⁽⁵⁾ *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894-1898, passim.

lement à immuniser des chevaux. En injectant, au début, à un cheval de 400 kilogrammes de petites doses de toxines iodées, puis, au bout de quinze jours, de toxines pures, ils peuvent ensuite augmenter progressivement les doses, et injecter, au bout de trois mois, 250 centimètres cubes de toxine pure, sans causer autre chose qu'un léger œdème passager et une élévation de température de 1° au plus dans la soirée. L'immunité contre les inoculations de cultures pures est alors absolue. Les mêmes auteurs se servirent encore avec succès de toxines additionnées d'hypochlorite de soude ou de chaux, au lieu d'iode; puis de toxines chauffées; et même d'inoculations répétées de très petites quantités de cultures pures suivies au bout d'un mois et demi ou deux mois d'injections intra-veineuses de toxines. Enfin ils employèrent uniquement la toxine pure, en commençant par de très petites doses, attendant pour les augmenter qu'elles fussent devenues inoffensives. C'est à ce procédé et à celui des toxines iodées qu'ils ont recours aujourd'hui à l'Institut Pasteur; le cheval, au bout de soixante-dix jours environ, a reçu sous la peau une quantité de toxine équivalente à un litre de toxine active au $\frac{1}{16}$. Il suffit alors, pour maintenir l'immunsation, de faire chaque semaine une injection d'une dose modérée de toxine; ou plutôt, ce qui est plus simple, une injection d'une forte dose de toxine toutes les trois semaines.

Propriétés du sérum des animaux immunisés. — Le sérum des animaux immunisés contre la diphthérie présente les propriétés immunisantes et curatives qui avaient déjà été reconnues, antérieurement, au sérum des animaux immunisés contre d'autres maladies infectieuses. A cette constatation, qu'il a faite le premier, Behring a ajouté une découverte d'une importance considérable, et tout à fait inattendue, celle des propriétés antitoxiques de ce sérum: lorsqu'on le mélange, *in vitro*, à de la toxine diphthérique, il atténue la toxicité de celle-ci; et, si les deux liquides sont mélangés dans des proportions convenables, la toxine devient absolument inoffensive pour l'animal qu'elle tuait rapidement seule. Ce sérum se comporte donc comme un antidote de la toxine. Il semble qu'il la neutralise et supprime son activité.

Ces effets du sérum sur la toxine se produisent de même lorsque le mélange, au lieu d'être pratiqué *in vitro*, se fait dans l'organisme animal: si, en effet, au lieu d'injecter à un animal un mélange de sérum et de toxine, on lui injecte successivement, aux doses proportionnelles, et dans deux régions différentes, le sérum et la toxine, l'intoxication ne se produit pas. Si on injecte à un animal de la toxine, et qu'ensuite seulement, mais sans trop attendre, on lui injecte une dose suffisante de sérum, les accidents ultérieurs d'intoxication ne se produisent pas ou ne sont que très légers, et l'animal guérit assez rapidement. Si après une injection préalable de sérum, on a pratiqué à l'animal une inoculation d'une culture pure vivante, au lieu d'une injection de toxine, l'animal reste indemne. L'inoculation sur les muqueuses peut donner une fausse membrane; mais elle disparaît rapidement et il n'y a pas de phénomènes généraux. Enfin, si après avoir inoculé à l'animal une culture pure virulente, on lui injecte ensuite, sans attendre trop longtemps, une dose suffisante de sérum, l'intoxication générale est prévenue, et l'animal guérit en même temps que les lésions locales des muqueuses et les bacilles disparaissent. Toutefois, les fausses membranes peuvent récidiver et ne céder qu'après une seconde injection de sérum, si la première dose a été insuffisante.

Le sérum agit donc à la fois sur la toxine et le microbe. Son action sur le

bacille n'est pas appréciable *in vitro*; dans ces conditions, il ne le tue pas. C. Fränkel, Spronk, ont constaté que le bacille diphthérique pouvait être cultivé facilement dans le sérum antidiphthérique.

Sa valeur curative est nulle à l'égard des lésions anatomiques que la toxine a déjà eu le temps de déterminer, depuis qu'elle a pénétré dans l'organisme; en ce cas, elle ne s'exerce qu'en empêchant la toxine [déjà absorbée, et celle qui baigne encore les surfaces ou les foyers où siège et se cultive le bacille, d'aggraver les lésions actuelles ou d'en provoquer de nouvelles : on conçoit dès lors que son action sera d'autant plus efficace qu'on l'injectera moins longtemps après l'inoculation du virus dont il doit combattre les effets pathogènes. Sa valeur préventive sera de même d'autant plus certaine que l'inoculation du virus aura suivi de plus près l'injection de sérum. On n'a pas encore de notions bien positives sur la durée de cette action préventive du sérum antidiphthérique. Elle est en général de courte durée. Il semble bien probable qu'elle ne dépasse pas six à sept semaines.

L'efficacité des sérums est d'ailleurs sujette à des variations aussi étendues que l'activité des toxines. Elle varie suivant l'animal dont le sérum provient, suivant la méthode qui a été employée pour l'immuniser, suivant que cette immunisation est plus ou moins récente et plus ou moins complète.

En général, on n'utilise pas le sérum recueilli chez un animal dont l'immunisation est toute récente et qui a été soumis peu auparavant à de fortes doses de toxine. Roux et Martin, avant de recueillir le sérum de leurs chevaux immunisés, les laissent reposer trois semaines, pour leur donner le temps d'éliminer toute la toxine qu'ils ont absorbée.

Pour apprécier avec une exactitude suffisante la valeur comparative des divers sérums antidiphthériques, il est nécessaire de mesurer, d'une part, son pouvoir antitoxique *in vitro*, et de l'autre son pouvoir préventif immédiat chez l'animal.

Pour mesurer le pouvoir antitoxique d'un sérum, on détermine la quantité de ce sérum nécessaire pour neutraliser un centimètre cube d'une toxine active au $\frac{1}{10}$. Si, pour cela, il faut 0^{cc},10 de sérum, on dit par convention que le sérum possède une unité immunisante; s'il n'en faut que 0^{cc},01, le sérum sera titré à dix unités, etc. Pour mesurer son pouvoir préventif, on prend un certain nombre de cobayes de même poids (500 grammes par exemple) et on injecte au premier 5 centimètres cubes de sérum, au second 0^{cc},5 seulement, au troisième 0^{cc},05, au quatrième 0^{cc},005. C'est-à-dire qu'on injectera au premier le centième de son poids de sérum, au second le millième, au troisième le dix-millième. On laisse reposer les animaux vingt-quatre heures et ensuite on leur injecte à tous une dose donnée d'une même culture pure, toujours la même. Si le cobaye n° 3 meurt et que le n° 2 résiste, on dira que le sérum est actif au millième et inactif au dix-millième.

Ces méthodes de mesure, surtout la dernière, ne sont guère utilisables que pour l'appréciation de sérums provenant d'un même laboratoire. Mais dans ces conditions, surtout en les contrôlant l'une par l'autre, elles permettent de faire une évaluation comparative assez exacte de l'efficacité des sérums provenant de différents animaux.

L'efficacité du sérum de cheval s'est montrée, à l'Institut Pasteur, d'autant plus grande que les animaux qui le fournissent ont été soumis à l'action de toxines plus actives. En immunisant des chevaux avec des toxines actives à $\frac{1}{500}$, L. Martin est arrivé à faire produire à quelques animaux des sérums antitoxiques à 500 unités et préventifs à $\frac{1}{150000}$.

Le mode d'action du sérum antidiphthérique est encore imparfaitement connu. On sait que la neutralisation de la toxine qui semble résulter de l'addition du sérum, *in vitro*, n'est qu'apparente : le sérum n'agit pas chimiquement sur la toxine; les deux corps se mélangent sans se détruire. En effet, Roux et Martin ont constaté que la proportion de sérum qui doit être ajouté à un volume donné d'une même toxine varie suivant l'espèce de l'animal auquel le mélange est injecté. Ainsi un mélange complètement inerte pour le cobaye donne au lapin un œdème sous-cutané très marqué, et, en injection intra-veineuse, le tue; comme le cobaye est plus sensible que le lapin à la toxine pure, il faut conclure de cette expérience que l'action du sérum s'exerce en réalité sur l'animal, comme celle de la toxine, et non sur cette dernière : le lapin, moins sensible que le cobaye à la toxine, est encore moins sensible que lui au sérum. Autre expérience : en opérant sur deux animaux de même espèce et de même poids, dont l'un est neuf, tandis que l'autre a souffert antérieurement d'infections expérimentales non diphthériques dont il a guéri, ou a été soumis à des injections sous-cutanées de produits microbiens non diphthériques, on constate que la dose préventive de sérum, rendant complètement inoffensive l'injection consécutive d'un volume donné de toxine ou l'inoculation d'une culture pure chez le premier animal, est inefficace chez le second, et que ce dernier n'est même pas préservé de la mort par des doses de sérum beaucoup plus fortes. Il faut donc admettre que les effets bienfaisants du sérum antidiphthérique sont dus à l'action qu'il exerce sur les cellules fixes de l'organisme, qu'il rend réfractaires à l'action de la toxine, et sur les leucocytes, dont il accroît à la fois la résistance à la toxine et l'activité phagocytaire; mais que ces cellules sont moins sensibles à son action lorsque antérieurement déjà elles ont été impressionnées par d'autres produits microbiens.

Variations de virulence du bacille diphthérique. — Atténuation et renforcement du virus. — Pour se rendre compte de la virulence des bacilles contenus dans une fausse membrane, il faut d'abord isoler des colonies sur sérum, les ensemercer dans d'égales quantités de bouillon légèrement alcalin, et après vingt-quatre heures, quarante-huit heures, etc., en inoculer une même quantité, 1 centimètre cube par exemple, à des animaux de plus en plus résistants au virus, pigeons, cobayes, lapins. Les bacilles les plus virulents tueront les animaux le plus rapidement. Ces expériences montrent que tous les bacilles diphthériques n'ont pas la même virulence pour une même espèce animale, car si le plus souvent 1 centimètre cube de culture tue le cobaye en vingt-quatre heures ou quarante-huit heures, une dose égale d'une culture de même âge d'une autre provenance peut ne tuer le cobaye qu'au bout d'une semaine ou deux, ou même ne pas le tuer du tout. En procédant ainsi et en variant leurs expériences, Roux et Yersin ont reconnu que les cultures provenant de fausses membranes recueillies dans les cas graves étaient, en général, plus virulentes que dans les cas légers. Mais ce n'est pas là une règle sans exception, car, dans certains cas bénins, ils ont obtenu des cultures très virulentes; plus virulentes même que dans certains cas très graves. De plus, ils ont obtenu avec une même fausse membrane des colonies très virulentes à côté de colonies peu virulentes ou même inoffensives.

En général, à mesure que la maladie marche vers la guérison, la virulence des bacilles diminue dans les fausses membranes. Mais lorsque celles-ci ont