

ACTION DE LA VITAMINE C (ACIDE L-ASCORBIQUE) SUR LA TOXINE DU BACILLUS PERFRINGENS

PAR

A. BÜLLER SOUTO et C. LIMA

La gangrène gazeuse est essentiellement une toxémie. La résistance organique joue un rôle capital dans sa pathogénèse. La moindre résistance de l'organisme, conséquence des guerres prolongées, est une des causes de l'extraordinaire fréquence et de la gravité insolite de la gangrène gazeuse.

Au cours d'une série d'expériences portant sur plus de 2.000 souris, nous avons pu constater l'influence *in vivo* de la vitamine C sur la résistance organique aux toxémies gangreneuses, ainsi que son action neutralisante *in vitro*.

L'action de la vitamine C sur les toxines diphtérique et tétanique, parmi d'autres, a été déjà bien observée.

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat d'une culture de *Bacillus perfringens*, de 18 à 20 heures à 37°. Le liquide surnageant recueilli et séché à la température de 2-5°, dans un exciccateur à vide sur acide sulfurique, a été conservé sur l'anhydride phosphorique. La D.M.M. de la toxine était 0,0004.

Vitamine C. — Nous avons employé une solution de vitamine C à 50 mgr. par c.c. et dont le pH était 6,6 ($\pm 0,1$).

Animaux d'épreuve. — Nous avons choisi les souris, qui, parmi les animaux sensibles, donnent des résultats plus constants à cause de leur capacité uniforme de synthétiser la vitamine. Nous avons employé 4 lots étalonnés, de même âge et de poids compris entre 17 et 20 gr.. La D.M.M. a été fixée avec un lot *et* 70 animaux; avec un second lot de 168 animaux nous avons déterminé l'action préventive; avec un troisième de 152, l'action curative et, avec un dernier de 118, l'action neutralisante» Les inoculations de la toxine du *Bacillus perfringens* ont été faites par voie veineuse et les injections de vitamine C par voie musculaire, a

réception des épreuves sur l'action neutralisante. Chaque série de recherches comportait ses témoins correspondants.

Des essais préliminaires ont été effectués afin de vérifier: 1.°) si la toxine supporterait bien la dilution saline a pH 6,6 ($\pm 0,1$) ; 2.°) si des doses de 25 mgr. de vitamine C seraient bien tolérées para les souris et par voie veineuse; 3.°) si les solutions de toxine contenaient du cuivre. Des analyses rigoureuses des solutions des toxines, faites par notre collègue Slotta, ont révélé que ces solutions étaient pratiquement exemptes de cuivre.

Action préventive. — On a utilisé un lot de 168 souris, 112 animaux recevant, pendant 3 jours, 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ce lot a été subdivisé en 2 autres : un de 57 animaux qui ont reçu 1 D.M.M. de toxine et l'autre de 57 animaux, auxquels on donna 2 D.M.M. Comme témoin on a pris un lot «de 56 souris, parmi lesquelles 26 ont reçu 1 D.M.M. et 30, 2 D.M.M.. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I
ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA
TOXINE PERFRINGENS.

| VITAMINE C | | | | | | Doses de toxine en D.M.M. | ANIMAUX | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|---------|---------|---------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| Intervalles entre les injections | | | DOSES | | | | Nombre d' inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % après 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % après 48 h. |
| 24 h. | 24 h. | 24 h. | 10 mgr. | 10 mgr. | 10 mgr. | 1 D.M.M. | 55 | 11/55 | 20% | 14/55 | 25% |
| | | | 10 mgr. | 10 mgr. | 10 mgr. | 2 D.M.M. | 57 | 35/57 | 61,4% | 38/57 | 66,7% |
| | | | T | T | T | 1 D.M.M. | 26 | 11/26 | 42,3% | 13/26 | 50% |
| | | | T | T | T | 2 D.M.M. | 30 | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% |

NOTE:—Il n'y a pas eu aucune changement après 48 heures d'observation.

Action curative. — Nous avons tâché d'établir 1.°) quelle serait la plus longue durée de l'activité curative de la vitamine C contre 1 et 2 D.M.M. de toxine du *Bacillus perfringens* et 2.°) si des doses de 10 mgr., répétées à intervalles de une et 3 heures, auraient une action curative plus forte que des doses uniques. A cette fin, 152 animaux ont été divisés en 5 lots: le premier, de 30 animaux, a été subdivisé en 2 autres de 15 animaux, auxquels on donna, respectivement, 1 D.M.M. et 2 D.M.M., chaque animal recevant, une heure après, 25 mgr. de vitamine C.

Le deuxième lot, de 29 animaux a aussi été divisé en 2 autres de 15 et 14 animaux, qui ont reçu, respectivement, 1 et 2 D.M.M. de la toxine et, après 2 h., 25 mgr., de vitamine C. Le troisième lot de 37 animaux, a reçu exactement comme les premiers 1 et 2 D.M.M. — de toxine et 3 h. plus tard, 25 mgr. de vitamine C. Au 4.^o lot nous avons injecté, une et 3 h. après l'inoculation de une et 2 D.M.M. de toxine, 10 mgr. de vitamine C. Le 5.^o lot, témoin, a reçu seulement une et 2 D.M.M. de toxine. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE
DU BACILLUS PERFRINGENS.

| Intervalle entre l'inoculation de la toxine et l'injection de vit. C | Doses de toxine en D.M.M. | Doses de vit. C. en mgrs. | Nombre d'animaux inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 1 heure | 1 D.M.M. | 25 | 15 | 3/15 | 80% | 5/15 | 66,6% |
| | 2 D.M.M. | 25 | 15 | 14/15 | 6,6% | 14/15 | 6,6% |
| 2 heures | 1 D.M.M. | 25 | 15 | 4/15 | 73,3% | 7/15 | 53,3% |
| | 2 D.M.M. | 25 | 14 | 12/14 | 14,2% | 12/14 | 14,2% |
| 3 " | 1 D.M.M. | 25 | 15 | 8/15 | 46,6% | 9/15 | 40,0% |
| | 2 D.M.M. | 25 | 15 | 15/15 | 0,0% | 15/15 | 0,0% |
| 1 et 3 heures | 1 D.M.M. | 10-10 | 16 | 4/16 | 75% | 4/16 | 75% |
| | 2 D.M.M. | 10-10 | 16 | 16/16 | 0% | 16/16 | 0% |
| — | 1 D.M.M. | T | 15 | 7/15 | 53,3% | 7/15 | 53,3% |
| | 2 D.M.M. | T | 15 | 15/15 | 0,0% | 15/15 | 0,0% |

NOTE:—Nulle altération après 48 heures.

Action neutralisante in vitro. — Nous avons tâché de vérifier in vitro 1.^o) si la vitamine C neutraliserait la toxine du *Bacillus perfringens*; 2.^o) si cette neutralisation obérait à la loi des proportions multiples; 3.^o) si le temps de contact aurait quelque influence sur la neutralisation.

Une D.M.M. a été laissée en contact, pendant 30 min., avec 10 et 25 mgr. de vitamine C et ensuite inoculée respectivement à 15 et 13 souris; de même. 2 D.M.M. en contact pendant 30 min. avec les mêmes quantités de vitamine C, ont été inoculées à 2 lots de 15 souris. Une autre série d'expériences a été réalisée en laissant en contact, pendant 60 min., une D.M.M. avec 10 mgr. et 2 D.M.M. avec 25 mgr. de vitamine C. 2 lots de 15 souris étant inoculés avec chaque dose; à 30 souris témoins, en 2 lots de 15 on a inoculé, respectivement, une et 2 D.M.M.

Les résultats sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III

ACTION NEUTRALISANTE DE VITAMINE C SUR LA TOXINE
PERFRINGENS

| Temps de contact | Doses de toxine en mgrs. | Doses de vit. C | Nombre d'animaux inoculés | Nombre de morts en 24 ha. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|------------------|--------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 30 minutes | 1 D.M.M. | 10 | 15 | 7/15 | 53,3% | 9/15 | 40% |
| | 1 D.M.M. | 25 | 15 | 7/15 | 46,1% | 9/15 | 30,7% |
| | 2 D.M.M. | 10 | 15 | 13/15 | 13,3% | 14/15 | 6,6% |
| | 2 D.M.M. | 25 | 15 | 15/15 | 0% | 15/15 | 0% |
| | 1 D.M.M. | 10 | 15 | 9/15 | 40% | 10/15 | 33,3% |
| | 2 D.M.M. | 25 | 15 | 15/15 | 0% | 15/15 | 0% |
| | 1 D.M.M. | T | 15 | 7/15 | 53,3% | 7/15 | 53,3% |
| | 2 D.M.M. | T | 15 | 15/15 | 0% | 15/15 | 0% |

NOTE : Il n'y a pas eu de changement après 48 heures d'observation.

Conclusions. — 1) La vitamine C semble augmenter la résistance organique de la souris, qui devient moins sensible à l'action de la toxine du *Bacillus perfringens*.

2) La vitamine C exerce une action curative durant 1 heure après l'inoculation de la toxine du *Bacillus perfringens*, elle est inactive quand la toxine a été inoculée 2 et 3 heures auparavant. Des doses répétées de 10 mgr. données 1 et 3 heures à la suite de l'inoculation de une D.M.M., ont une action curative nette, mais sont inactives contre 2 D.M.M..

3) La vitamine C ne montre aucune action neutralisante in vitro, même après 60 minutes de contact avec la toxine, et ne suit pas la loi des proportions multiples.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU
VIBRION-SEPTIQUE

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat exempt de germes d'une culture de 48 heures à 37°. Le précipité a été recueilli et séché à la température de 7-5°, dans un exsiccateur à vide sur acide sulfurique, et ensuite sur l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

La D.M.M. de cette toxine était 0,00005.

Vitamine C. — Nous avons employé la vitamine C (acide l-ascorbique) chimiquement pure, à la dilution de 50 mgr. par c.c. à pH 6,6 ($\pm 0,1$).

Animaux d'épreuve. — Nous avons utilisé la souris: 4 lots étalonnés, de même âge et de poids compris entre 17 et 20 gr.. Sur un lot de 50 animaux, nous avons fixé la D.M.M.; sur un autre, de 83, l'action préventive a été déterminée et, avec un troisième lot de 62 animaux, nous avons établi respectivement l'action curative et l'action préventive.

Les inoculations de la toxine du vibron septique ont été faites par voie musculaire veineuse et celles de la vitamine C par voie musculaire, à l'exception des expériences sur l'action neutralisante.

Chaque série de recherches avait ses témoins correspondants. Les expériences parallèles ont montré 1.^o) que la toxine n'est pas modifiée quand on la dilue dans un liquide à pH 6,6 ($\pm 0,1$); 2.^o) que des doses de 25 mgr. par voie veineuse et musculaire n'ont pas d'effet sur la vie des souris; 3.^o) que, dans nos dilutions de la toxine du vibron septique, le cuivre ne dépassait pas la dose de 0,2 gr., selon les analyses effectuées par Slotta.

Action préventive. — Nous avons utilisé un lot de 83 souris, dont 61 ont été injectées pendant 3 jours de suite avec 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ce lot a été divisé en 2 parties; 30 ont reçu 1 D.M.M. et 31 on a injecté 2 D.M.M. de la toxine du vibron septique. 10 animaux témoins ont reçu 1 D.M.M. et à 12 on a injecté 2 D.M.M. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SÉPTIQUE

| VITAMINE C | | | | | | Doses de toxine en D. M. L. | ANIMAUX | | | | |
|----------------------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|---------|--|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Intervalles entre les injections | | | Doses | | | | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
| 24 h. | 24 h. | 24 h. | 10 mgs. 10 mgs. | 10 mgs. 10 mgs. | 10 mgs. | 1 D. M. L. 2 D. M. L. 1 D. M. L. 2 D. M. L. | 30 31 10 12 | 7/30 10/31 5/10 10/12 | 23,3% 32,3% 50% 83,3% | 7/30 15/31 5/10 10/12 | 23,3% 48,4% 50% 83,3% |

NOTE : Il n'y a pas eu aucune changement après 48 heures d'observation.

Action curative. — Notre but était de vérifier 1.°) si la vitamine C aurait une action curative sur la toxine du vibron septique; 2.°) quel serait le plus long intervalle pour qu'une telle action puisse s'exercer ; 3.°) si des doses répétées de 10 mgr. de vitamine C auraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Un lot de 62 souris a été divisé en 5. Les animaux du premier lot ont été inoculés avec 1 D.M.M. et 2 D.M.M. de toxine, et ont reçu, une heure après, 25 mgr. de vitamine C. Dans le deuxième lot, les animaux ont été injectés avec

1 et 2 D.M.M. et 2 heures après, avec 25 mgr. de vitamine C. Au 3.° lot, 1 et 2 D.M.M. ont été données et, au bout de 2 h., 25 mgr. de vitamine C. Le 4.° a été inoculé avec 1 et 2 D.M.M. et reçu, aux intervalles d'une heure de 5 h., 10 mgr. de vitamine C. Le 5.° lot, qui a reçu 1 et 2 D.M.M., a servi de témoin. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau V.

TABLEAU V

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SEPTIQUE

| Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C | Doses de toxine en D. M. L. | Doses de vit. C en D. M. L. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 1 heure | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 2/5 | 60% |
| 1 heure | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 3/5 | 40% |
| 2 heures | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 3/5 | 40% |
| 2 heures | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 3/5 | 40% | 3/5 | 40% |
| 5 heures | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 1/5 | 80% | 2/5 | 60% |
| 5 heures | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 3/5 | 40% | 4/5 | 20% |
| 1 et 3 heures | 1 D.M.M. | 10-10 | 5 | 0/5 | 100% | 0/5 | 100% |
| 1 et 3 heures | 2 D.M.M. | 10-10 | 5 | 4/5 | 20% | 5/5 | 0% |
| -- | 1 D.M.M. | -- | 10 | 5/10 | 50% | 5/10 | 50% |
| -- | 2 D.M.M. | -- | 12 | 10/12 | 16,6% | 10/12 | 16,6% |

NOTA: Nulle altération après 48 heures d'observation.

Les irrégularités dans l'action antitoxique de la vitamine C qu'on peut nettement constater dans le tableau V, ont été observées par Harde et Greenwald, Grooten et Bezssonoff.

Action neutralisante. — Nous avons tâché encore ici d'établir; 1.°) si la vitamine C neutraliserait la toxine du vibron septique; 2.°) si cette neutralisation

obéirait à la loi des proportions multiples; 3.°) si le temps de contact aurait de l'influence sur le pouvoir neutralisant de la vitamine C.

Des doses de 10 et 25 mgr. de vitamine C ont été mises en contact, durant 30 min. à 30°, avec 1 et 2 D.M.M. de toxine du vibrion septique. Dans une autre série d'essais nous avons laissé des doses égales de vitamine C en contact, pendant 60 min. à 30°, respectivement avec 1 et 2 D.M.M. de toxine du vibrion septique; tous les mélanges ont été injectés par voie veineuse. Les résultats sont résumés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SEPTIQUE

| Temps de contact | Doses de toxine en D. M. M. | Doses de vit. C. en mgrs. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 30 minutes | 1 D.M.M. | 10 | 5 | 0/5 | 100% | 0/5 | 100% |
| 30 minutes | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 0/5 | 100% | 0/5 | 100% |
| 30 minutes | 2 D.M.M. | 10 | 5 | 3/5 | 40% | 3/5 | 40% |
| 30 minutes | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 2/5 | 60% |
| 60 minutes | 1 D.M.M. | 10 | 10 | 0/10 | 100% | 0/10 | 100% |
| 60 minutes | 2 D.M.M. | 25 | 10 | 0/10 | 100% | 1/9 | 90% |
| — | 1 D.M.M. | — | 10 | 4/10 | 60% | 4/10 | 60% |
| — | 2 D.M.M. | — | 12 | 10/10 | 16,6% | 10/12 | 16,6% |

NOTE: Il n'y a pas eu d'altération au bout de 24 heures d'observation.

Conclusions. — 1) La vitamine C (acide 1-ascorbique) semble conférer à la souris une plus grande résistance à l'action de la toxine du vibrion septique.

2) La vitamine C (acide 1-ascorbique) possède une action curative contre 1 et 2 D.M.M., jusqu'à 1 heure après son inoculation; inoculé au bout de 2 heures, l'action antitoxique est inégale. L'action curative se manifeste jusqu'à après, ce qui est la limite actuelle de nos recherches. Des doses répétées de 10 mgr. 1 et 3 heures après l'injection de 1 D.M.M. de toxine du vibrion septique, confèrent la protection à 100p. 100 des animaux inoculés.

3) La vitamine C exerce sur la toxine du vibrion septique une action neutralisante qui semble obéir à la loi des proportions multiples. Le pouvoir neutralisante de la vitamine C sur la toxine du *Cl. oedematis-maligni* (vibrion septique) augmente avec le temps de contact.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU
BACILLUS OEDEMATIENS

Nous avons recherchés l'action de la vitamine C sur la toxine du B. oedematiens.

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée par précipitation du filtrat exempt de germes, d'une culture de 6 jours à 37°, par le sulfate d'ammonium en atmosphère inerte. Le précipité a été recueilli et séché à la température de 2 à 5°. sur du chlorure de calcium te ensuite sur de l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. Trituré et tamisé, il a été conservé dans des ampoules fermées dans le vide. La D.M.M. de cette toxine était 0,000242.

Vitamine C. — Nous avons employé la vitamine C (acide 1-ascorbique) chimiquement pure à la dilution de 50 mgr. par c.c., le pH 6,6 (\pm 0,1).

Animaux d'épreuve. — Nous avons utilisé des souris réparties en 4 lots étalonnés, du même âge et de poids oscillant entre 15 et 20 gr. Avec un lot de 60 animaux nous avons déterminé la D.M.M. ; avec un autre, de 68 animaux, l'action curative; avec un troisième, de 73, l'action préventive et avec un dernier, de 100, l'action neutralisante.

Malgré les recherches de Grotova sur la voie d'inculation qui doit être choisie pour les dosages de la toxine du B. oedematiens, nous avons donné la préférence à la technique indiquée par la Société des Nations, c'est-à-dire que nous avons fait les inoculations de la toxine du Bacillus oedematiens par la voie musculaire ; la vitamine C a été introduit par la même voie.

Des témoins correspondaient à chaque série de recherches. Des tests préliminaires ont révélé 1.° que la toxine supporte bien la dilution en solution physiologique a pH 6,6 ($-$ 0,1) ; 2.° que des doses de 25 mgr. sont bien tolérées par voie musculaire ; 3.° que nos solutions de toxine oedematiens ne contiennent pas de cuivre, selon les analyses faites par Slotta.

Action préventive. — Pendant 3 jours consécutifs 46 animaux ont reçu 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Parmi eux, 22 ont reçu une D.M.M., et 24 deux D.M.M.; 22 animaux ont servi de témoins; 11 ont été inoculés avec une D.M.M. et 11 avec deux D.M.M..

Le temps d'observation a été prolongé a 72 heures, car certains cas ont présenté des modifications après 48 heures d'observation. Les résultats sont réunis dans le tableau VII.

TABLEAU VII

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. OEDEMATIENS

| Intervalles entre les injections | | | Doses | | | Doses de toxine en D. M. M. | | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. | Nombre de morts en 72 h. | % sur 72 h. |
|----------------------------------|-------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|----------|-------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------------------|-------------|
| 24 h. | 24 h. | 24 h. | 10 mgrs. 10 mgrs. | 10 mgrs. 10 mgrs. | 10 mgrs. 10 mgrs. | 1 D. M. M. 2 D. M. M. | 22 24 | 2/22 9/24 | 9,09% 37,5% | 5/22 9/24 | 22,73% 37,5% | 5/22 9/24 | 22,73% 37,5% | |
| | | | | | | 1 D. M. M. 2 D. M. M. | 11 11 | 4/11 6/11 | 36,36% 54,5% | 5/11 8/11 | 45,45% 72,73% | 5/11 8/11 | 45,45% 72,73% | |

NOTE : Il n'y a pas eu d'altération après 72 heures.

Actions curative. — Nous avons tâché d'établir 1.°) quelle est la période maxima pendant laquelle la vitamine C pourrait exercer une action curative ; 2.°) si des doses répétées de vitamine C auraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Soixante-treize animaux ont été distribués en 5 lots; à 3 lots, 25 mgrs. de vitamine C ont donnés, respectivement une, deux et cinq heures après l'inoculation d'une et deux D.M.M. de toxine de B. oedematiens ; le quatrième lot a reçu 2 doses de 10 mgr. de vitamine C à des intervalles de une et trois heures après avoir reçu la toxine de B. oedematiens, et le cinquième lot a servi de témoin. Les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. OEDEMATIENS

| Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C | Doses de toxine en D. M. M. | Doses de vit. C en mgrs. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. | Nombre de morts en 72 h. | % sur 72 h. |
|---|-----------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 1 heure | 1 D. M. M. | 25 | 8 | 0/8 | 100% | 2/8 | 25% | 5/8 | 62,5% |
| 1 heure | 2 D. M. M. | 25 | 8 | 0/8 | 100% | 4/8 | 50% | 5/8 | 62,5% |
| 2 heures | 1 D. M. M. | 25 | 8 | 0/8 | 100% | 3/8 | 37,5% | 5/8 | 62,5% |
| 2 heures | 2 D. M. M. | 25 | 8 | 0/8 | 100% | 3/8 | 37,5% | 5/8 | 62,5% |
| 5 heures | 1 D. M. M. | 25 | 8 | 3/8 | 37,5% | 4/8 | 50% | 5/8 | 62,5% |
| 5 heures | 2 D. M. M. | 25 | 8 | 0/8 | 100% | 0 | 0% | 5/8 | 62,5% |
| 1 et 3 heures | 1 D. M. M. | 10—10 | 8 | 0/8 | 100% | 0 | 0% | 5/8 | 62,5% |
| 1 et 3 heures | 2 D. M. M. | 10—10 | 6 | 2/6 | 33,3% | 0 | 0% | 5/6 | 83,3% |
| — | 1 D. M. M. | — | 10 | 1/10 | 10% | 4/10 | 40% | 5/10 | 50% |
| — | 2 D. M. M. | — | 7 | 2/7 | 28,6% | 4/7 | 57,1% | 5/7 | 71,4% |

NOTE : Il n'y a pas eu d'altération après 72 heures d'observation.

Action neutralisante. — Nous nous proposons de chercher 1.°) si la vitamine C neutraliserait la toxine du *Bacillus oedematiens*; 2.°) si cette neutralisation obéirait à la loi des proportions multiples; 3.°) si le temps de contact avait une influence sur le pouvoir neutralisant.

TABLEAU IX

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. OEDEMATIENS

| Temps de contact | Doses de toxine | Doses de vit. en mgr. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. | Nombre de morts en 72 h. | % sur 72 h. |
|------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 30 minut. | 1 D. M. M. | 10 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| 30 minut. | 1 D. M. M. | 25 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| 30 minut. | 2 D. M. M. | 10 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| 30 minut. | 2 D. M. M. | 25 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| 60 minut. | 1 D. M. M. | 10 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| 60 minut. | 1 D. M. M. | 25 | 10 | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % | 0/10 | 100 % |
| — | 1 D. M. M. | T | 20 | 6/20 | 30 % | 13/20 | 65 % | 13/20 | 65 % |
| — | 2 D. M. M. | T | 20 | 14/20 | 70 % | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % |

NOTE : Nulle altération au bout de 72 heures d'observation.

La vitamine C aux doses de 10 et 25 mgr., a été laissée en contact, a 30° et pendant 30 min., avec une et deux D.M.M. de toxine du *Bacillus oedematiens*. Dans une autre série d'essais, 10 et 25 mgr. de vitamine C sont restés en contact à 30° pendant 60 min. avec une et deux D.M.M. de toxine. Les mélanges ont été injectés par voie musculaire. Les résultats sont résumés dans le tableau IX.

Conclusions. — 1) La vitamine C (acide l-ascorbique), en augmentant la résistance organique, produit chez les animaux une plus grande résistance contre une D.M.M. de toxine du *Bacillus oedematiens*.

2) La vitamine C a sur la toxine du *B. oedematiens* une faible action curative, qui se manifeste jusqu'à deux heures après l'inoculation d'une et deux D.M.M. de la toxine. La vitamine C n'exerce nulle action curative 5 heures après l'inoculation d'une et deux D.M.M. de toxine. Des doses de 10 mgr. de vitamine C répétées à intervalles d'une et trois heures, ont une action curative nette contre une et deux D.M.M. de la toxine du *Bacillus oedematiens*; elles sont cependant inactives contre deux D.M.M..

3) La vitamine C a une action neutralisante nette sur la toxine du *B. oedematiens*. Il n'a pas été possible d'observer si cette action, neutralisante suit la loi des proportions multiples. Un contact prolongé augmente l'action neutralisante de la vitamine C sur la toxine du *Bacillus oedematiens*.

Nous n'avons pas recherché le pouvoir antigénique des mélanges neutralisés. Des doses de 10 mgr. de vitamine C, ont pouvoir inactivant plus grand sur deux D.M.M. qu'une dose de 25 mgr.. Il semble exister une relation on un facteur pondéral pour la meilleure neutralisation.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU BACILLUS HISTOLYTICUS

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat, exempt de germes, d'une culture de 18 à 20 heures à 37°. Le précipité a été recueilli et séché à basse température sur du chlorure de calcium et ensuite sur de l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. La D.M.M. de cette toxine était 0,00003.

Vitamine C. — Nous avons employé de la vitamine C (acide l-ascorbique) chimiquement pure à la dilution de 50 mgr. par c.c. a pH 6,6 ($\pm 0,1$).

Animaux d'épreuve. — Nous avons choisi la souris. Nous en avons utilisé 4 lots étalonnés, de même âge et pesant de 17 a 20 gr. Avec un lot de 60 animaux, nous avons déterminé la D.M.M. ; avec un autre de 50, l'action préventive ; avec un troisième de 60, l'action curative et, avec un dernier de 61. l'action neutralisante, Les inoculations de toxine ont toujours été faites par voie veineuse et les injections de vitamine C par voie musculaire, à exception des mélanges neutralisants.

Chaque série de recherches avait ses témoins correspondants. Il a été vérifié 1.°) que la toxine supporte la dilution en solution physiologique à pH 6,6 ($\pm 0,1$) ; 2.°) que des doses de 25 mgr. sont bien tolérées par les voies musculaire et veineuse; 3.°) que les solutions de toxine ne contenaient pas de traces de cuivre, suivant les analyses par Slotta.

TABLEAU X
ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU
CL. HISTOLYTICUM

| VITAMINE C | | | | | | ANIMAUX | | | | | |
|----------------------------------|-------|-------|---------|---------|---------|---------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Intervalles entre les injections | | | DOSES | | | Doses de toxine en D.M.M. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
| 24 h. | 24 h. | 24 h. | 10 mgr. | 10 mgr. | 10 mgr. | | | | | | |
| | | | 10 mgr. | 10 mgr. | 10 mgr. | 2 D.M.M. | 18 | 16/18 | 11,1% | 16/18 | 11,1% |
| | | | | | | 1 D.M.M. | 15 | 6/15 | 40 % | 6/15 | 40 % |
| | | | | | | 2 D.M.M. | 15 | 15/15 | 0 % | 15/15 | 0 % |

NOTA: Il n'y a pas eu nulle altération après 48 heures d'observation.

Les résultats sont restés les mêmes après 48 heures d'observation.

Action préventive. — Trente-six animaux ont reçu, pendant 3 jours consécutifs, 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ensuite 18 ont reçu une D.M.M. et 18, deux D.M.M. de toxine du *B. histolyticus* ; 30 animaux ont servi de témoins; 15 ont été inoculés avec une D.M.M. et 15 avec deux D.M.M..

Des observations ont été poursuivies pendant 92 heures, des variations n'apparaissant que dans les 48 heures.

Action curative. — Nous nous proposons d'établir; 1.°) la période maxima, pendant laquelle la vitamine C exercerait son action curative; 2.°) si des doses répétées de vitamine C auraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Soixante animaux ont été divisés en 5 lots ont reçu 25 mgr. de vitamine C, une, deux et cinq heures après avoir été inoculés avec une et deux D.M.M. de la toxine du *B. histolyticus* ; le 4.° lot a reçu 2 doses de 10 mgr. de vitamine C a intervalle d'une et trois heures après l'inoculation de la toxine histolytique ; le 5.° lot a servi de témoin. Les résultats sont résumés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU
CL. HISTOLYTICUM

| Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C | Doses de toxine en D. M. M. | Doses de vit. C en mgr. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|---|-----------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 1 heure | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 1/5 | 80% | 2/5 | 60% |
| 1 heure | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 4/5 | 20% | 2/5 | 20% |
| 2 heures | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 4/5 | 20% |
| 2 heures | 2 D.M.M. | 25 | 5 | 3/5 | 40% | 5/5 | 0% |
| 5 heures | 1 D.M.M. | 25 | 5 | 2/5 | 60% | 2/5 | 60% |
| 1 et 3 heures | 1 D.M.M. | 10-10 | 5 | 0/5 | 100% | 3/5 | 40% |
| 1 et 3 heures | 2 D.M.M. | 10-10 | 5 | 5/5 | 0% | 5/5 | 0% |
| — | 1 D.M.M. | T | 10 | 6/10 | 40% | 6/10 | 40% |
| — | 2 D.M.M. | T | 10 | 10/10 | 0% | 10/10 | 0% |

NOTE : Il n'y a pas eu d'altération après 48 heures d'observation.

Les résultats sont restés les mêmes après 48 heures d'observation.

Action neutralisante. — Nous avons tâché d'établir: 1.°) si la vitamine C neutraliserait la toxine du *B. histolyticus*; 2.°) si cette action neutralisante obérait

à la loi-des proportions multiples; 3.°) si le temps de contact exercerait quelque influence sur le pouvoir neutralisant.

La toxine du *B. histolyticus* a été mise en contact avec une D.M.M. de vitamine C, pendant 30 min. à 37°, dans une autre série d'essais une et deux D.M.M. de toxine ont été laissées en contact pendant 60 min. à 30°, respectivement avec 10 et 25 mgr. de toxine.

TABLEAU XII

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU *CL. HISTOLYTICUM*

| Temps de contact | Doses de toxine en D. M. M. | Doses de vit. C en mgrs. | Nombre d'inoculés | Nombre de morts en 24 h. | % sur 24 h. | Nombre de morts en 48 h. | % sur 48 h. |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 30 minutes | 1 D. M. M. | 10 | 5 | 1/5 | 80% | 1/5 | 80% |
| 30 minutes | 1 D. M. M. | 25 | 5 | 1/5 | 80% | 1/5 | 80% |
| 30 minutes | 2 D. M. M. | 10 | 5 | 1/5 | 80% | 3/5 | 40% |
| 30 minutes | 2 D. M. M. | 25 | 5 | 3/5 | 40% | 4/5 | 20% |
| 60 minutes | 1 D. M. M. | 10 | 10 | 0/10 | 100% | 1/10 | 90% |
| 60 minutes | 2 D. M. M. | 25 | 10 | 7/10 | 30% | 9/10 | 10% |
| — | 1 D. M. M. | T | 11 | 4/11 | 63,6% | 6/11 | 45,4% |
| — | 2 D. M. M. | T | 12 | 10/12 | 16,6% | 10/12 | 16,6% |

NOTE: Il n'y a pas eu d'altération après 48 heures d'observation.

Les résultats sont résumés dans le tableau XII.

Conclusions. — 1) La vitamine C (acide l-ascorbique) semble augmenter la résistance organique des animaux, qui deviennent moins sensibles à une et deux D.M.M. de toxine du *B. histolyticus*.

2) La vitamine C exerce une action curative contre une D.M.M. de toxine. Cette action ne se manifeste qu'une heure après l'injection de toxine. Au bout de 2 heures, elle devient inégale. Des doses répétées de 10 mgr. de vitamine C à des intervalles d'une et trois heures après l'injection d'une et deux D.M.M. n'exercent point d'action curative sur la toxine du *B. histolyticus*.

3) La vitamine C paraît avoir sur la toxine du *B. histolyticus* une action neutralisante, qui ne suit pas la loi des proportions multiples. Le temps de contact n'augmente pas le pouvoir neutralisant de la vitamine sur la toxine.

Nous n'avons pas vérifié si les mélanges neutralisants sont antigéniques. Des doses de 10 mgr. de vitamine C semblant avoir sur deux D.M.M. de toxine du *B. histolyticus* une action inactivante plus grande que des doses de 25 mgr. Il paraît donc y avoir une zone optima de neutralisation.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — *Harde, E.* — Acide ascorbique (vitamine C) et intoxications — C. R. Acad. Se. 199 (13) :618.1934.
- 2 — *Harde, E. & Philippe, M.* — Observations sur le pouvoir antigène du mélange toxine diphtérique et vitamine C — C. R. Acad. 199(16) :739.1934.
- 3 — *Harde, E. & Greewall, C. K.* — Vitamine C., and diphtheric toxine — Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 32(7) :1157.1935.
- 4 — *Jungeblut, C. W. & Zwemer, R.* — Inactivation of diphtherie toxine *in vivo* and *in vitro* by crystalline Vitamin C (ascorbic acid) — Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 32(8) : 1229.1935.
- 5 — *Grooten, O. & Bezssonoff, N.* — Action de la vitamine C sur la toxine diphtérique sensibilité du bacille de la coqueluche vis-à-vis de l hydroquinol et de la vitamine C — Ann. Inst. Pasteur 56(4) :413.1936.
- 6 — *Zilva, S. S.* — The alleged antitoxine action of vitamin C in diphtherie — Brit. J. of Exp. Path. 18(6) :440.1937.
7. *Jungebult, W. C.* — Inactivation of tetanus toxine by crystalline vitamin C (ascorbic acid) — J. of. Immunology 33(3) :203.1937.
- 8 — *Schulze, E. & Hecht, U.* — Uber die Wirkung der Ascorbinsäure auf Diphterie — Formoltoxoid und Testanustoxin — Klin. Wschr. 16(42) : 1460.1937.
- 9 — *Diechhoff, J.* — Diphterie Formoltoxoid und Ascorbinsäure — Klin. Wschr. 16(42): 1463.1937.
- 10 — League of Nations — Health Organization Permanent Commission on Biological Standardization — Geneve, C.M./c.P.S.B/23. 1925.
- 11 — *Rohmer, P.; Bezssonoff, N.; Stoerr, E. & Perrier, I.* — La teneur en vitamine C su sang et des urines après injections massives — C. R. Soc. Biol. 118(11) : 1090.1935.
- 12 — *Barron, G.; De Meio, R. H. & Klemperer, F.* — Cooper and hemochromogens as catalists for the oxydation of ascorbic acid. The Mechanism of the oxydation — J Biol. Chem 17:625.1914.
- 13 — *Mawson, C. A.* — The influence of animal tissues on the oxydation of ascorbic acid. — Bioch. J. 29(3) :569.1935.
- 14 — *Kellie, A. E. & Zilva, S. S.* — The catalytic oxydation of ascorbic acid. — Bioch. J. 29(5):1028.1935.
- 15 — *Lyman, C. M.; Schulze, M. O. & King, C. G.* — The effect of meta-phosphoric acid and some other inorganic acids on the catalytic of ascorbic acid — J. Biol. Chem. 118(3) :757.1937.
- 16 — *Hartley, P. & White, I. B.* — Étalon international proposé pour le sérum anti-vibrien septique. — Bull. Trimestriel de l'organization d'Hygiene — No. especial: 13.1935.
- 17 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (Vibrien septique). — Publ. Health Reports. 49(52) :1557. 1934.

A. BÜLLER SOUTO & C. LIMA — *La vitamine C sur le Bacillus perfringens* 311

- 18 — *Walburn, L. R. & Reymann, C.* — Étalon International proposé pour le sérum anti-oedematiens — Bull. Trimestriel de l'Organisation d'Hygiène — No. especial: 42.1935.
- 19 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (*oedematiens*) — Publ. Health Reports 51(5) :526.1937.
- 20 — *Grotova, H. W.* — Étude comparé des sérums étalons antigangreneux internationaux et soviétique — Ann. Inst. Pasteur 59(5) :526.1937.
- 21 — *Walburn, L. E. & Reymann, C.* — Memorandum concerning a proposed international standard for gas gangrene antitoxin (*histolyticum*) Dept. of Biol. Standards H. I. M. 1,35 Copenhagen, 1935.
- 22 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (*histolyticum*) — Publ. Health Reports 51(37) : 1263.1936.

(Publicado *in* Compt. Rend. Soc. Biol. 129 (24, 31). 1938 e *in* Brasil-Medico 52 (26, 27, 28 e 29). 1938. Comun. Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro em Abril de 1938).

Buller 1939

This text was scanned and changed to characters using an Optical Character Recognition program. With small letters the program generates a few errors, but they have been corrected, although few may remain.

This file (version Sept 25, 2012):

http://www.mv.helsinki.fi/home/hemila/CT/Buller_1939_ch.pdf

The **bitmap version** of this paper is available at:

http://www.mv.helsinki.fi/home/hemila/CT/Buller_1939_bm.pdf

Harri Hemilä

Department of Public Health

University of Helsinki, Helsinki, Finland

harri.hemila@helsinki.fi

Home: <http://www.mv.helsinki.fi/home/hemila/>