

**Medicine (Chemotherapy).** — *L'action inhibitrice des métaux sur la croissance du B. tuberculeux. VII. Manganèse et rhénium.* By ONG SIAN GWAN. (Communicated by Prof. E. GORTER.)

(Communicated at the meeting of May 29, 1948.)

1. Le manganèse et le rhénium appartiennent au groupe VII, sous-groupe a, du tableau périodique. Le rhénium n'a aucune action inhibitrice sur la croissance de *B. tuberculeux*, le manganèse par contre montre une forte action inhibitrice même en présence de sérum. Ceci explique le bon résultat obtenu par WALBUM depuis 1924 dans le traitement de la tuberculose expérimentale par le chlorure de manganèse. WALBUM (1926, a) a également montré que l'injection préalable de chlorure de manganèse chez un cobaye tuberculeux protège l'animal contre un choc tuberculinique.

HELMS (1925) et HELMS et FREDERIKSEN (1927) ont traité 115 tuberculeux pulmonaires par des injections intraveineuses de chlorure de manganèse. Ils ont constaté l'amélioration dans 77,3 p. 100, la disparition des crachats dans 46 p. 100, la disparition de *B. tuberculeux* dans les crachats de 56,5 p. 100, la disparition de la fièvre dans 70 p. 100 et l'augmentation de poids dans 87 p. 100 des cas avec une moyenne de 2.72 kg et un maximum de 10,5 kg. Un résultat comparable a été obtenu par LUNDE (1926) chez 58 tuberculeux.

Par contre, HÖEG LARSEN et TÖRNING (1927) n'ont obtenu aucun résultat chez 31 malades traités par des injections de chlorure de manganèse.

2. *Action inhibitrice de manganèse et de rhénium sur la croissance de B. tuberculeux.*

Les métaux utilisés dans toutes les expériences sont les suivants: 1. manganum metallicum fusum MERCK, 2. rhénium pursiss. en poudre de HEYL. Dans certaines expériences on utilise le sulfate de manganèse de ANALAR, analytical reagent.

a. *Expérience réalisée avec 5 mg de Mn ou de Re et de 4,06 mg de sulfate de manganèse par 100 cc de milieu de SAUTON. Méthode du carré latin.*

La concentration de Mn dans le milieu contenant le sulfate de manganèse est égale à 1 : 100 000.

La souche de *B. tuberculeux* utilisé 1030 (2) a été aimablement mise à notre disposition par M. L. E. DEN DOOREN DE JONG. La culture est âgée de 57 jours et la durée de l'expérience est de 33 jours. Le tableau 1 et l'analyse de la variance montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les traitements considérés dans leur ensemble. Le coefficient de variation est égal à  $C = 11,8$  p. 100.

b. *Expérience réalisée avec 10 mg de Mn ou de Re et 8,12 mg de*

sulfate de manganèse par 100 cc de milieu de SAUTON. Méthode du carré latin.

La concentration de Mn dans le milieu contenant le sulfate de manganèse est égale à 1 : 50 000. La souche utilisée 1030 (3) est âgée de 33 jours

TABLEAU 1.

Action inhibitrice de 5 mg de Mn ou de Re et de 4,06 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ cc}$ , concentration de Mn 1 : 100 000. Poids en mg. Méthode du carré latin.

## I. Tableau des observations.

	Colonnes				Total
Rangées	Mn 615,4	T 713,9	Mn 524,7	Re 720,0	2574,0
	T 685,7	$\text{MnSO}_4$ 747,6	Re 691,2	Mn 869,8	2994,3
	Re 737,6	Mn 768,4	T 679,4	$\text{MnSO}_4$ 521,1	2706,5
	$\text{MnSO}_4$ 727,2	Re 729,9	Mn 754,0	T 624,4	2835,5
Total	2765,9	2959,8	2649,3	2735,3	11110,3
Moyenne	T 675,9	Mn 751,9	$\text{MnSO}_4$ 630,2	Re 719,7	

## II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre traitements	33 669	3	11 223
Entre rangées	24 205	3	8 068
Résiduelle	60 270	9	6 697
Total	118 144	15	

T, témoin.

TABLEAU 2.

Action inhibitrice de 10 mg de Mn ou de Re et de 8,12 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ cc}$ , concentration de Mn 1 : 50 000. Poids en mg. Méthode du carré latin.

## I. Tableau des observations.

	Colonnes				Total
Rangées	Mn 10,7	$\text{MnSO}_4$ 566,5	Re 507,8	T 689,6	1774,6
	Re 532,6	Mn 751,4	T 719,1	$\text{MnSO}_4$ 576,6	2579,7
	T 528,0	Re 626,2	$\text{MnSO}_4$ 589,8	Mn 628,4	2372,4
	$\text{MnSO}_4$ 598,6	T 666,6	Mn 14,6	Re 631,3	1911,1
Total	1669,9	2610,7	1831,3	2525,9	8637,8
Moyenne	T 650,8	Mn 351,3	$\text{MnSO}_4$ 582,9	Re 574,5	

## II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre traitements	203 941	3	67 980
Entre colonnes	171 640	3	57 213
Résiduelle	328 569	9	36 508
Total	704 150	15	

et l'expérience a duré 67 jours. L'analyse de la variance (tableau 2) montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les traitements considérés dans leur ensemble. Une différence significative entre deux moyennes est égale à 305,6 mg. On constate que la différence entre les moyennes obtenues par le témoin et le manganèse est significative. Le coefficient de variation est égal à  $C = 35,4$  p. 100.

c. *Expérience réalisée avec 10 mg de Mn ou de Re par 100 cc de milieu de SAUTON.*

Cette expérience est comparable à la précédente, mais la souche utilisée 1030(1) est plus âgée: 51 jours et la durée de l'expérience est de 57 jours. De plus le poids moyen de B. tuberculeux utilisé pour l'ensemencement est plus petit, il est dans ce cas 1,4 mg de poids sec au lieu de 3,8 mg dans l'expérience précédente. On constate maintenant une différence très significative entre les moyennes de Mn et de témoin (tableau 3).

TABLEAU 3.

Action inhibitrice de 10 mg de Mn ou de Re par 100 cc de milieu de SAUTON. Poids en mg.

	Colonnes			Total
Rangées	Re 0,5	Mn 40,0	T 5,5	46,0
	Mn 0	Re 637,2	T 657,4	1294,6
	T 0	Mn 0	Re 14,4	14,4
	Re 753,5	T 703,8	Mn 0	1457,3
Total	754,0	1381,0	677,3	2812,3
Moyenne	T 341,7	Mn 10,0	Re 351,4	

d. *Expérience réalisée avec 10 mg de Mn et 8,12 mg de sulfate de manganèse par 100 cc de milieu de SAUTON.*

Dans le milieu contenant le sulfate de manganèse la concentration de Mn est égale à 1 : 50 000. On utilise la souche bovine VALLÉE après 15 passages sur milieu de SAUTON:  $V_{15}$ , l'âge de la culture est de 68 jours et la durée de l'expérience est de 30 jours. Le poids sec moyen de B. tuberculeux transplanté est 4,8 mg.

L'analyse de la variance (tableau 4) montre qu'il existe des différences significatives entre les traitements considérés dans leur ensemble. Une différence significative entre deux moyennes pour le seuil de signification  $P = 0,01$  est égale à  $\Delta = 545,9$  mg et pour  $P = 0,001$ ,  $\Delta = 771,7$  mg. L'action inhibitrice de sulfate de manganèse et surtout de manganèse métallique sur la croissance sont donc très marquées.

e. *Expérience réalisée avec 20 mg de Mn ou de Re par 100 cc de milieu de SAUTON.*

La souche utilisée  $V_{12}$  est âgée de 13 jours et la durée de l'expérience est de 25 jours. Le tableau 5 et l'analyse de la variance montrent des différences très significatives entre les traitements considérés dans leur ensemble. L'action inhibitrice obtenu par 20 mg de Mn est très élevée.

TABLEAU 4.

Action inhibitrice de 10 mg de Mn ou de 8,12 de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  par 100 cc de milieu de SAUTON. Poids en mg.

## I. Tableau des observations.

	Colonnes						Total		
Rangées	T	904,8	A	504,6	T	997,2	Mn	67,6	2474,2
	Mn	0	T	1034,3	Mn	276,6	$\text{MnSO}_4$	67,0	1377,9
	$\text{MnSO}_4$	0,3	A	853,0	$\text{MnSO}_4$	347,6	T	990,8	2191,7
	T	1058,4	Mn	635,2	A	1035,6	$\text{MnSO}_4$	758,4	3487,6
	A	1132,4	$\text{MnSO}_4$	1153,7	Mn	14,0	A	1069,0	3369,1
Total	3095,9	4180,8	2671,0	2952,8	12900,5				
Moyenne	T	997,1	Mn	198,7	$\text{MnSO}_4$	465,4	A	918,9	

## II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre rangées	764 037	4	191 009
Entre traitements	2 152 321	3	717 440 ***
Résiduelle	766 481	12	63 873
Total	3 682 839	19	

\*\*\* probabilité < 0,001.

A, substance organique, non déterminée.

TABLEAU 5.

Action inhibitrice de 20 mg de Mn ou de Re par 100 cc de milieu de SAUTON. Poids en mg.

## I. Tableau des observations.

	Témoins	Manganèse	Rhénium	Total
Rangées	707,3	9,8	726,0	1443,1
	730,5	1,7	723,5	1455,7
	726,0	12,8	788,5	1527,3
	757,0	43,6 <sup>1)</sup>	781,4 <sup>1)</sup>	1582,0
Total	2920,8	67,9	3019,4	6008,1
Moyenne	730,2	17,0	754,9	500,7

## II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre rangées	4 208	3	1 403
Entre traitements	1 404 802	2	702 401 ***
Résiduelle	1 637	4	409
Total	1 410 647	9	

<sup>1)</sup> Valeur calculée.

elle est plus élevée que celle obtenu par 10 mg de Mn en utilisant la même souche VALLÉE (expérience d). Ce résultat inattendu a été constaté plusieurs fois avec d'autres éléments.

3. *Action inhibitrice de manganèse en présence de sérum sanguin sur la croissance de B. tuberculeux.*

a. *Expérience réalisée avec 10 mg de Mn ou 40,6 mg de sulfate de manganèse par 100 cc de milieu de SAUTON.*

La concentration de Mn dans le milieu avec sulfate de manganèse est égale à 1 : 10 000. On ajoute dans les flacons contenant le manganèse et le sulfate de manganèse 5 cc de sérum de chèvre non chauffé, les flacons témoins ne contiennent pas de sérum. La souche utilisée,  $V_{13}$  est âgée de 51 jours et la durée de l'expérience est de 68 jours.

TABLEAU 6.

Action inhibitrice de 10 mg de Mn ou de 40,6 mg de  $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$  en présence de 5 cc de sérum. Concentration de Mn 1 : 10 000. Poids en mg.

	Colonnes			
Rangées	Mn 0	T 948,3	Mn 0	$MnSO_4$ 0
	$MnSO_4$ 0	Mn 0	T (226,7)	T 711,1
	T 1049,8	$MnSO_4$ 0	$MnSO_4$ 0	Mn 0
Total	1049,8	948,3	(226,7)	711,1
Moyenne	T 733,8	Mn 0	$MnSO_4$ 0	

0, pas de croissance.

Dans tous les flacons contenant Mn + sérum ou  $MnSO_4$  + sérum on ne constate pas de croissance de B. tuberculeux pendant toute la durée de l'expérience (tableau 6). Si l'on compare cette expérience avec les expériences précédentes d et e on serait en droit de conclure que l'action

TABLEAU 7.

Action inhibitrice de 10 mg de Mn et de 10 mg de Mn en présence de 5 cc de sérum. Poids en mg. Méthode du carré latin.

## I. Tableau des observations.

	Colonnes				Total
Rangées	Mn+sér 4,1	Mn 497,8	T 967,0	Sér 1227,6	2696,5
	T 860,6	Sér 1210,4	Mn+sér 727,2	Mn 525,0	3323,2
	Sér 1253,2	T 998,7	Mn 94,6	Mn+sér 834,2	3180,7
	Mn 737,4	Mn+sér 36,7	Sér 1377,8	T 857,0	3008,9
Total	2855,3	2743,6	3166,6	3443,8	12209,3
Moyenne	T 920,8	Sér 1267,3	Mn 463,7	Mn+sér 400,6	

## II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre traitements	2 000 509	3	666 836 **
Résiduelle	833 499	12	69 458
Total	2 834 008	15	

Sér = sérum.

\*\* probabilité 0,01.

de Mn en présence de sérum est plus élevée que sans sérum. Pour résoudre cette question l'expérience suivante a été réalisée.

*b. Expérience réalisée avec 10 mg de Mn par 100 cc de milieu de SAUTON avec ou sans sérum.*

L'expérience est réalisée comme suit: 1. témoin contenant le milieu de SAUTON, 2. comme le témoin, et en outre 5 cc de sérum de chèvre non chauffé, 3. comme le témoin, et en outre 10 mg de Mn, 4. comme le témoin, et en outre 10 mg de Mn et 5 cc de sérum de chèvre non chauffé.

Le tableau 7 montre le résultat obtenu, l'analyse de la variance montre des différences significatives entre les traitements considérés dans leur ensemble. Une différence entre deux moyennes est significative si elle est plus grande que 406,1 mg. On constate qu'il n'y a pas de différence significative entre l'action inhibitrice de Mn avec et sans sérum. Le poids moyen de la culture avec sérum est plus élevé que celui sans sérum, mais la différence n'est pas significative. On constate cependant une croissance appréciable dans les cultures avec sérum deux jours après l'ensemencement, celle-ci ne se produit pas dans les cultures témoins.

*4. Addition de 15 mg de manganèse au cours de la croissance de B. tuberculeux.*

L'addition de Mn au cours de la croissance permet de savoir si la croissance est diminuée ou si elle est complètement arrêtée. Dans le dernier cas le B. tuberculeux pourrait être tué.

Pour savoir si la croissance est arrêtée on compare à la fin de l'expérience le poids moyen des cultures avec Mn avec celui des cultures témoins au moment de l'addition de Mn. Enfin, pour savoir si la croissance est diminuée

TABLEAU 8.

Addition de 15 mg de Mn au cours de la croissance de B. tuberculeux. Poids en mg.  
I. Tableau des observations.

Mn <sub>15</sub> 671,1	T <sub>31</sub> 585,5	Mn <sub>31</sub> 658,4	T <sub>40</sub> 668,6	T <sub>8</sub> 4,7	Mn <sub>8</sub> 604,4	T <sub>15</sub> 57,6
T <sub>15</sub> 116,1	Mn <sub>15</sub> 845,6	T <sub>31</sub> 633,4	Mn <sub>31</sub> 677,4	T <sub>40</sub> 702,0	T <sub>8</sub> 2,7	Mn <sub>8</sub> 680,6
T <sub>40</sub> 672,0	T <sub>8</sub> 1,7	Mn <sub>8</sub> 687,7	T <sub>15</sub> 34,1	Mn <sub>15</sub> 474,9	T <sub>31</sub> 589,1	Mn <sub>31</sub> 731,0
Mn <sub>8</sub> 846,6	T <sub>15</sub> 58,0	Mn <sub>15</sub> 701,0	T <sub>31</sub> 631,0	Mn <sub>31</sub> 599,7	T <sub>40</sub> 626,4	T <sub>8</sub> 32,4
Moyenne	T <sub>8</sub> 10,4 Mn <sub>8</sub> 704,8	T <sub>15</sub> 66,4 Mn <sub>15</sub> 673,2	T <sub>31</sub> 609,8 Mn <sub>31</sub> 666,6	T <sub>40</sub> 667,3		

II. Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variance moyenne
Entre rangées	18 678	3	6 226
Entre traitements	3 952	3	1 317
Résiduelle	93 917	10	9 392
Total	116 547	16	

T<sub>i</sub>, poids de culture témoin au bout de *i* jours.

Mn<sub>i</sub>, poids de culture au bout de 40 jours et après addition de Mn au bout de *i* jours.

on compare à la fin de l'expérience le poids moyen des cultures avec Mn avec celui des cultures témoins de même âge.

L'expérience est réalisée avec la souche  $V_{12}$ , âgée de 42 jours, la durée de l'expérience est de 40 jours.

La figure 1 et le tableau 8 montrent le résultat obtenu. On constate que

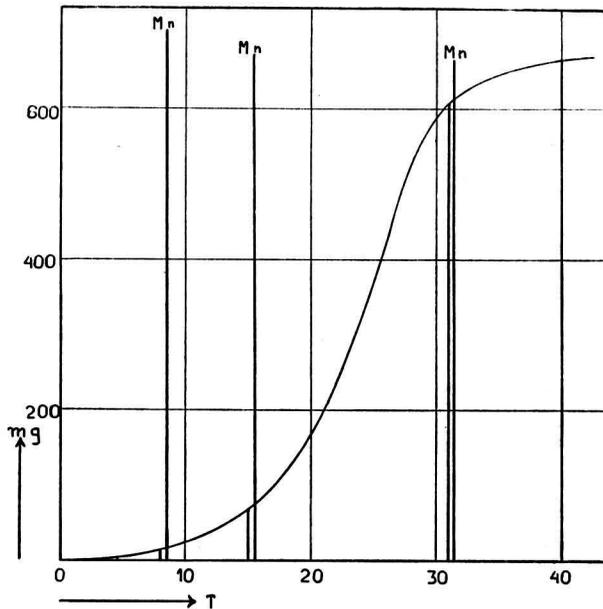


Fig. 1. Addition de 15 mg de manganèse au cours de la croissance de *B. tuberculeux*. Poids en mg. T, temps en jours. Mn, poids moyen des cultures de *B. tuberculeux* de 40 jours après addition de Mn au bout de 8, 15 et 31 jours.

l'addition de Mn au bout de 8, 15 et 31 jours n'a aucune influence sur la croissance de *B. tuberculeux*. Les poids obtenus par le manganèse ont été comparés dans l'analyse de la variance avec le poids témoin de 40 jours.

##### 5. Culture de *B. tuberculeux* ayant été en contact avec le manganèse.

L'expérience a pour but de savoir si le *B. tuberculeux* qui a été en contact avec le manganèse pendant un temps déterminé et ensuite transplanté dans un milieu normal montre une croissance diminuée ou arrêtée. Pour cela on compare le poids moyen obtenu avec le poids moyen des cultures témoins dans les mêmes conditions.

L'expérience est exécutée comme suit: on prend deux flacons contenant le milieu de SAUTON et deux autres flacons contenant le même milieu et en outre 20 mg de Mn. Les quatre flacons sontensemencés avec la souche  $V_{12}$  de 42 jours. Au bout de 8, 15 et 31 jours on fait de chaque culture deux cultures dans un milieu de SAUTON. On obtient ainsi quatre cultures de *B. tuberculeux* ayant été en contact avec Mn et quatre cultures de *B. tuberculeux* témoin. On place les cultures à l'étuve et on détermine le poids sec après 31—32 jours.

Le tableau 9 montre le résultat obtenu. Malheureusement la plupart des cultures témoins sont tombées dans le liquide au cours de l'expérience de sorte que les poids obtenus entre parenthèses sont trop petits. Néanmoins le résultat obtenu est très net. On constate qu'après huit jours de contact

TABLEAU 9.

Culture de *B. tuberculeux* ayant été en contact avec le Mn; 20 mg de Mn par 100 cc de milieu de SAUTON. Poids en mg.

Durée de contact avec Mn en jours	Durée de l'expérience en jours	Témoins	Manganèse
8	32	743,1	3,8
		(58,1)	477,3
		(109,5)	(53,2)
		(139,5)	62,4
<b>Total</b>		1050,2	596,7
<b>Moyenne</b>		262,6	149,2
15	31	(99,5)	0
		(110,4)	1,4
		(47,0)	0,4
		759,2	0,1
<b>Total</b>		1016,1	1,9
<b>Moyenne</b>		254,0	0,5
31	31	573,6	0,7
		542,3	2,7
		(61,5)	1,9
		(29,0)	1,0
<b>Total</b>		1206,4	6,3
<b>Moyenne</b>		301,6	1,6

Les poids entre parenthèses représentent des cultures tombées dans le liquide pendant l'expérience, ils sont donc trop petits.

avec le manganèse la croissance est diminuée et qu'après 15 et 31 jours de contact la croissance est complètement arrêtée et le *B. tuberculeux* est probablement tué.

Nous remercions vivement MM. E. VAN DER LAAN et J. VAN DEN DULK de ses précieux conseils dans l'analyse de la variance.

*Résumé.* 1. Le rhénium n'a aucune action inhibitrice sur la croissance de *B. tuberculeux*.

2. Le manganèse et le sulfate de manganèse ont une action inhibitrice marquée même en présence de sérum sanguin.

3. L'addition de manganèse au cours de la croissance n'a aucune influence inhibitrice.

4. Par contre, la culture de *B. tuberculeux* ayant été en contact avec le manganèse montre une croissance diminuée. Si le contact avec le

manganèse est prolongé la croissance est complètement arrêtée et le B. tuberculeux est probablement tué.

*Kamerlingh Onnes Laboratorium, Leiden.*

BIBLIOGRAPHIE.

- HELMS, O., Ugeskrift f. Læger, no. 44 (1925).  
 HELMS, O. et J. FREDERIKSEN, Ugeskrift f. Læger, no. 18 (1927).  
 ———, Zeitschr. f. Tuberkulose, 49, 18—26 (1927).  
 HÖEG LARSEN, A. et KJELD TÖRNING, Ugeskrift f. Læger, no. 2, 24 (1927).  
 LUNDE, N., Zeitschr. f. Tuberkulose, 46, 186—213 (1926).  
 WALBUM, L. E., C. R. Soc. Biol., 90, 888—890 (1924).  
 ———, Acta path. et microbiol. scand., 1, 378—411 (1924).  
 ———, Zeitschr. f. Immunitätsf., 43, 433—464 (1925).  
 ———, C. R. Soc. Biol., 94, 1106—1108 (1926a).  
 ———, Zeitschr. f. Immunitätsf., 47, 213—276 (1926b).  
 ———, Ugeskrift f. Læger, no. 28, 29 et 30 (1927).  
 ———, Zeitschr. f. Tuberkulose, 48, 193—216 (1927); 51, 209—222 (1928); 53, 292—299 (1929); 60, 204—208 (1931).  
 ———, Ugeskrift f. Læger, no. 25, 26, 27, 28 et 29 (1928).