



MISE EN APPLICATION DES THÉORIES
SUR L'EXTRACTION
DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOCELLULAIRE

I. — ACTION DE LA PÉNICILLINE

par

H. MIR CHAMSY et A. SADEGH. (*)

Pour la préparation de l'anatoxine tétanique, il est essentiel de filtrer la culture de *Pl. tetani* après cinq jours d'incubation à 33° C ou dans les jours suivants, afin d'éliminer les corps bactériens, et de formoler le filtrat toxique. Des recherches effectuées au cours de ces dernières années ont montré, d'autre part, la possibilité d'extraire à partir des bacilles tétaniques, en dehors de la culture, des quantités importantes de toxine. Ces recherches étant effectuées dans des conditions particulières, nous les avons reprises et modifiées pour extraire la toxine endobacillaire au sein de la culture même, ce qui peut augmenter à la fois la toxicité du filtrat et son pouvoir antigène.

Sans faire l'historique complet du problème de l'extraction des toxines à partir des corps microbiens, nous donnerons un aperçu des recherches antérieures.

Raynaud (2, 3, 4, 5) est le premier qui a montré la possibilité d'extraire la toxine tétanique des corps bactériens lavés.

Rappelons les principales conclusions de cet auteur et de ses collaborateurs (6): la quantité de toxine extractible est d'autant plus faible que les cultures sont plus âgées; lorsque la culture est effectuée à 35° toute la toxine se trouve bien élaborée à la fin de la période de croissance exponentielle. Elle passe ensuite dans le milieu de culture, à la faveur d'un processus dont la nature exacte reste à préci-

* Annales de l'Institut Pasteur — Tome 94, pp. 396-399., 1958.

ser, mais qui est indépendant des processus de synthèse liés à la croissance microbienne.

Raynaud extrait les bactéries lavées à l'eau distillée, par des solutions hypertoniques à 0°. D'après lui, il n'y a pas intérêt à prolonger la durée de l'extraction au-delà de cinq jours. Les extractions trop prolongées, sans augmenter notablement le taux de toxine extraite, provoquent une solubilisation élevée de l'azote bactérien.

L'action de la pénicilline sur la libération de la toxine a été également étudiée. Katitch (1) observe que la culture à laquelle a été ajoutée la pénicilline a le même aspect à l'examen microscopique que la culture témoin. Il remarque ainsi que l'addition de pénicilline, même en grande quantité, n'a aucune action sur la production de la toxine. Raynaud (7) constate, d'autre part, que les suspensions du bacille tétanique par séjour à 33° C et en présence de pénicilline libèrent des quantités notables de toxine en même temps qu'une lyse bactérienne importante se produit.

Stone (8) a essayé de provoquer la lyse de *Pl. tetani* par addition de lysozyme. Il a remarqué que dans les cultures jeunes de 2-3 jours, le traitement par des doses massives de lysozyme provoque seulement la réduction du temps de floculation sans qu'il y ait une augmentation des unités floculantes. L'effet du lysozyme est nul dans le cas des cultures âgées de 5-6 jours.

Tels sont, à notre connaissance, les travaux récents effectués dans ce domaine; nous allons décrire un résumé de nos expériences et des résultats que nous avons obtenus par traitement des cultures avec la pénicilline.

TABLEAU 1

Action de la pénicilline sur la culture tétanique.

	Culture pénicillinée					Culture témoin				
	1 ^o j	2 ^o j	3 ^o j	4 ^o j	5 ^o j	1 ^o j	2 ^o j	3 ^o j	4 ^o j	5 ^o j
Lf/ml	3	6	14	18	29	0	0	8	16	27
Kf/ml	63	55	55	20	11	—	—	45	25	12
DMM/ml	1 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵			2,5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴			1 x 10 ⁶
Lf/mg. N.P			325	400	700			372	415	725
Lyse bactérienne %	80	70	90	90	95	0	1	10	15	20

Matériel et Technique. — On ensemence 50 erlenmeyers de 1 l contenant chacun 750 ml de milieu Mueller (9). La semence est de 1 ml de la culture de 24 heures en milieu au thioglycollate. La souche utilisée est la souche Harvard. L'ensemencement a lieu immédiatement après autoclavage et refroidissement du milieu. La culture s'effectue à 33° C. A la fin de chaque vingt-quatre heures d'incubation, 5 erlenmeyers reçoivent 1.000 U. O. de pénicilline G par millilitre de culture; les cultures pénicillinées restent encore vingt-quatre heures à 33° C, puis on les filtre sur papier filtre en présence d'hyfflosupercel. A titre de témoins, 5 erlenmeyers de culture normale sont filtrés.

La floculation s'effectue avec une solution d'antitoxine étalon contrôlée par comparaison avec l'étalon danois et celui de l'Institut Pasteur de Garches. La pureté s'exprime en milligrammes d'azote précipitable par l'acide trichloracétique. Etant donné que le milieu noircit dans les premiers jours pour redevenir clair à la fin de la culture, il était difficile de suivre la marche exacte de la lyse bactérienne au photomètre; nous nous bornons donc à apprécier la lyse par examen microscopique de 20 à 30 champs au microscope. Les bacilles lysés et colorés au Gram ont une morphologie particulière; ils sont souvent vidés de leur contenu; on ne voit que leur cytosquelette déchiré et même, quand la lyse est avancée, la distinction de la forme bactérienne devient difficile. La DMM est déterminée sur souris blanches de 16-18 g. Les dilutions sont faites dans l'eau peptonée. On injecte 0,5 ml par voie sous-cutanée.

En étudiant le tableau I, on voit d'abord que la pénicilline agit à toutes les phases de la culture en libérant la toxine. La quantité de toxine supplémentaire libérée par action de la pénicilline et exprimée en Lf est importante dans la phase exponentielle de la culture; elle devient faible à la fin de la culture. Cependant, exprimée en DMM, elle est toujours importante. En effet, la culture de 24 heures pénicillinée renferme 100.000 DMM/ml. alors que le témoin ne contient que 10.000 DMM/ml. De même, la culture de 5 jours traitée à la pénicilline a une toxicité de l'ordre de 2.500.000 DMM/ml. son témoin de 5 jours a seulement 1.000.000 DMM/ml.

La libération de la toxine par la pénicilline est associée à la lyse presque complète des bacilles dans toute la durée de la culture.

Enfin, le produit pénicilliné est moins pur car la libération de toxine par la lyse amène forcément l'augmentation de l'azote bactérien.

Nous avons étudié l'action de la pénicilline sur 10 lots de milieu Mueller dans des conditions semblables. D'une manière générale, malgré la différence remarquable de toxicité entre les cultures

pénicillinées et les témoins, la valeur en Lf/ml gagnée n'est pas considérable. Cette valeur ne dépasse pas dans nos expériences 35 p. 100 du titre initial.

Résumé. — Si on emploie le milieu de Mueller et la souche Harvard, on peut extraire, au cours et à la fin de la culture, la toxine tétanique incluse dans les bacilles par addition de la pénicilline.

Les valeurs en Lf/ml et DMM/ml sont nettement augmentées par rapport au témoin. L'extraction se fait dans le milieu même de la culture.

SUMMARY

APPLICATION OF THEORIES ON THE EXTRACTION OF ENDOCELLULAR TETANUS TOXIN.

1. — ACTION OF PENICILLIN.

By using Mueller's medium and Harvard strain, it is possible to extract the excess of tetanus toxin contained in the bacterial cells in the culture by addition of penicillin.

BIBLIOGRAPHIE

1. Katitch (R. V.). *Rev. Immunol.*, 1951, 15, 371.
2. Raynaud (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 225, 543.
3. Raynaud (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, 31, 98.
4. Raynaud (M.). Nisman (B.) et Prudhomme (R. O.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 1370.
5. Raynaud (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 80, 356.
6. Raynaud (M.). Saissac (R.), Turpin (A.) et Rouyer (M.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 693.
7. Raynaud (M.), Saissac (R.), Turpin (A.) et Rouyer (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 693.
8. Stone (J. L.) *J. Bact.*, 1952, 64, 299.
9. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.). *J. Bact.*, 1954, 67, 271.