

SUR LA PRESENCE DES ANTIGENES SOLUBLES DANS LA CULTURE LIQUIDE ET AEREE DE HEMOPHILUS PERTUSSIS

H. MIRCHAMSY, H. TASLIMI et H. ESTERABADY ()*

Le rôle des antigènes solubles dans l'établissement de l'immunité anti-coquelucheux paraît clair. La plupart des auteurs sont d'accord pour reconnaître que la suspension de *H. pertussis*, phase 1, dans son milieu de culture liquide provoque une immunité plus solide que les germes lavés de ce bactérie. De même, le liquide surnageant seul a une valeur protectrice inférieure par rapport à la culture totale. Il faut se rappeler que malgré l'évidence de l'efficacité de l'antigène soluble du bacille coquelucheux, sa nature ainsi que le processus de sa libération dans le milieu de culture semblent être obscures. Il est d'autre part probable que la substance capsulaire, trouvée pour la première fois par Lawson (22) soit l'élément essentiel de l'antigène soluble de *H. pertussis*. Eldering (7) a pu démontrer que la fraction du bacille riche en hydrates carbonés protège la souris blanche contre l'infection cérébrale avec *H. pertussis*.

De l'absence de létalité pour la souris blanche et la manque de toxicité que l'on observe par l'inoculation intradermique au cobaye Kuwajima et al. (21) concluent que l'antigène soluble de *H. pertussis* n'est qu'une métabolite du bacille ou peut être une «toxoid» formée et libérée spontanément dans la culture par un processus inconnu.

Y a-t'il une relation étroite entre l'antigène soluble et les fractions immunigènes isolées du corps bactérien par différents procédés physico-chimiques?

Nous allons énumérer brièvement les travaux les plus récents à propos des antigènes extraits afin de pouvoir mieux juger sur la relation entre

(*) *Sympos. Intern. de Standard. microbial. opatiya 1960 (yougoslavie).*

les antigènes élaborés dans la culture ou extraits par la désintégration du bacille.

A notre connaissance Cruikshank et Freeman (3) sont les premiers qui ont préparé des extraits qui protègent la souris blanche. Flosdorf et Kimball (11, 12, 13) ont intégré la fraction agglutinogène du bacille par des ondes soniques. Smolens et Mudd (33) ont obtenu le même antigène en chauffant la culture à 56° C à pH 2.5. Hinks et ses collaborateurs (17) arrivent à dissocier le bacille et à extraire l'agglutinogène en utilisant une solution hypertonique de l'urée. Pillemer et al (29) ont séparé et purifié l'antigène protecteur du filtrat de culture d'une souche toxigène de *H. pertussis* par le fractionnement au méthanol dans des conditions bien précises du pH, de force ionique et de la température. Keogh et North (20) ont démontré l'étroite relation entre l'haemagglutinogène et la fraction protectrice pour la souris blanche. Par contre, d'après Standfast (34) l'antigène protecteur de souris est bien distinct des autres fractions du bacille telles que l'agglutinogène ou haemagglutinogène. Masri (23) constate également que l'haemagglutinogène isolée à l'état pur est dépourvue de tout pouvoir de protection ainsi que du pouvoir d'agglutination.

Standfast et Horton (35) ont obtenu par la digestion tryptique d'une suspension de *H. Pertussis* une fraction qui immunise la souris blanche. En utilisant la technique d'Ouchterlony, ces auteurs distinguent 17 lignes différentes sans pouvoir indiquer lesquelles correspondent à l'antigène de protection.

Dolby (6) réussit à isoler les deux antigènes protecteurs et sensibilisant à l'histamine par le traitement d'une suspension de *H. pertussis* par le méthanol et le chlorure de calcium. Verwey et Thiele (36) ont libéré, par l'intermédiaire des ondes soniques et à partir d'une suspension de bacille coquelucheux, l'antigène protecteur. Robbins et Pillemer (32) ont pu isoler la fraction protectrice à partir d'une suspension du bacille nontoxigène par le traitement au méthanol comme nous venons de décrire plus haut. Felton et Verwey (10) ont montré que le milieu liquide, soumis à ultrason puis le surnageant traité à l'alcool et précipité avec l'alun a un pouvoir de protection chez les enfants exposés à l'infection beaucoup plus grand que le vaccin classique.

Frappier, Guérault et De Repentigny (5, 14, 15) constatent que le simple lavage des cultures avec de l'eau enlève la plus grande partie de substance capsulaire. L'eau de lavage renferme, selon ces auteurs et en appliquant la technique de diffusion dans la gélose, 2 antigènes bien distincts. Ces auteurs ont également constaté que le traitement ménagé et superficiel des bacilles par l'eau salée tamponnée, l'eau bidistillée ou le tampon boraté

hypertonique donnent des eaux de lavage dont l'innocuité ainsi que le pouvoir de protection contre l'infection intracérébrale est évidente. Guéroult et Maitland (15) confirment également la présence du pouvoir de protection dans l'eau de lavage des cultures. Hiltbold, Huber et Regamey (16) ont obtenu, par la congélation-décongélation d'une suspension de *H. pertussis* phase 1, un antigène qui, à la suite du traitement avec le formol (0,3%) et chauffage (10 jours à 37° C), se montre un agent immunisant.

De tout ce qui précède on peut conclure que l'antigène soluble de *H. pertussis*, quelque soit sa composition chimique, se libère dans la culture liquide et continue à être libéré par l'application de différents procédés physico-chimiques ou même par un simple stockage à froid. Etant donné le rôle important de ces antigènes dans la prophylaxie de la coqueluche chez les enfants, il est souhaitable que la culture finale de *H. pertussis* soit riche en cet antigène, sans que cette culture soit traitée d'une façon ou d'une autre. Il est surtout essentiel pour les fabricants de vaccin de produire leur vaccin d'une manière simple et économique avec le maximum d'efficacité. C'est dans ces ordres d'idée et pour comparer nos résultats de culture aérée avec ceux obtenus en utilisant les cultures agitées que ce travail est rédigé.

MATERIELS ET TECHNIQUES

a) Milieu de culture:

La culture liquide de *H. pertussis* se fait, dans la plupart des laboratoires en utilisant le milieu de culture liquide de Hornibrook (18) tenant compte des modifications portées par Verwey et al (37), Wilson (38), Farrell (9) et surtout Cohen et Wheeler (2). Ce milieu renferme de l'hydrolysate acide de caséine, de sels et des facteurs de croissance. Les auteurs déjà mentionnés conseillent d'ajouter au milieu de l'amidon soluble et de charbon activé. Par contre d'après Kuwajima et ses collaborateurs (21) les gros molécules de l'amidon peuvent adsorber l'antigène soluble et empêchent le vaccin d'avoir assez de l'antigène protecteur.

Nous employons actuellement le milieu de Cohen et Wheeler (2) dont voici la composition:

| | |
|---|---------|
| Bacto casamino acides | 10,0 gr |
| Chlorure de sodium | 2,5 gr |
| Phosphate monopotassique, KH_2PO_4 | 0,5 gr |
| Chlorure de magnésium, $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,4 gr |
| Amidon soluble en poudre | 1,5 gr |

| | |
|---|---------|
| Chlorure de calcium, CaCl_2 , sol. 1% | 1,0 ml |
| Sulfate ferreux, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sol. 0,5% | 2,5 ml |
| Sulfate de cuivre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sol. 0,05% | 1,5 ml |
| Chlorhydrate de cystéine, sol. 1% | 3,0 ml |
| Dialysat de levure | 50,0 ml |
| Eau distillée jusqu'à | 1 litre |

Le pH est ajusté à 7.1-7.2

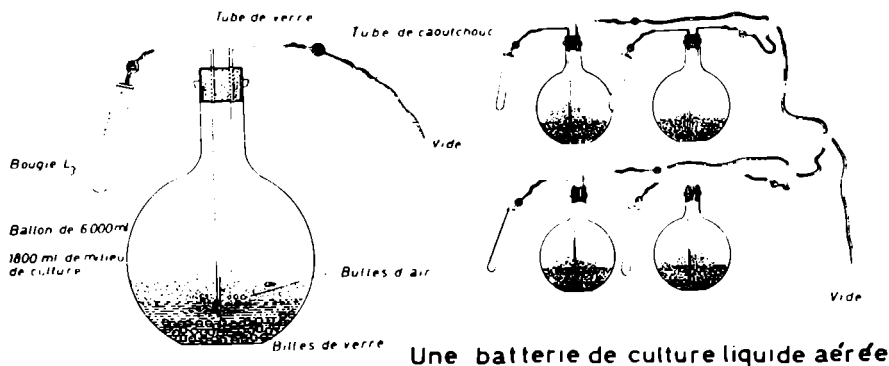
Afin d'empêcher la formation du précipité après autoclavage le milieu est chauffé d'abord à 80° C puis filtré sur papier filtre, ensuite distribué dans des tubes de 18×18 (6 ml) et des boîtes de Roux de 1 litre (150 ml) pour la semence et dans des ballons de 6000 ml, contenant des billes de verre et stérilisés au préalable, à raison de 1800 ml par ballon pour production.

Le milieu est ensuite stérilisé 15 minutes à 115°C.

A titre de comparaison et pour préparer la culture agitée on prépare également le milieu liquide de Kuwajima (20) ayant 10 gr par litre de Bacto casaminoacides, des vitamines qui remplacent le dialysat de levure et des sels. Ce milieu ne renferme pas d'amidon soluble.

Pour enlever l'effet toxique des acides gras (8,30) on traite une heure la solution de casaminoacide avec le charbon Darco G. 60. On prépare généralement des lots de 250 à 500 litres qu'on distribue dans des ballons de 6000 ml.

Sur le bouchon des ballons une bougie Chamberland L3 et des tubes, selon la figure 1, sont prévus.



Une batterie de culture liquide aérée

Fig. 1

On intercommunique tous les ballons déjà encemencés dans la chambre d'étuve pour faire le vide et barboter l'air, passé à travers les bougies, dans toute la durée de la culture.*

b) Souches :

Pour la production de vaccin nous utilisons les souches américaines Nos 40103, 41405, 44122 et 18323.

Ces souches sont conservées à l'état lyophilisé et sont remises en culture sur milieu de Bordet-Gengou au sang de mouton selon la technique de la Santé Publique, Grand Rapid, U.S.A. (26).

Afin de comparer nos résultats avec ceux des auteurs japonais qui agitent la culture à 200 t.p.m., nous utilisons dans un certain nombre d'expériences uniquement la souche No. 18323 employée également par ces auteurs. Des cultures d'essai sont faites suivant la formule de Kuwajima et al. dans les ballons de 6000 ml, à raison de 500 à 600 ml de milieu par ballon et sont agitées à 130-150 t.p.m.

Les cultures aérées restent 72 heures à 36° C tandis que les cultures agitées ne restent que 48 heures à la même température. Le titre final de nos cultures, mesuré par néphélomètre oscille entre 18 et 30 milliard/ml.

c) Séparation de l'antigène soluble :

Aux cultures aérées ou agitées on ajoute du merthiolate à raison de 1 p. 5000 et centrifuge à 6000 t.p.m. pendant 45 minutes. Le surnageant resté 3 jours à +4° C est utilisé comme antigène soluble dans les différentes expériences.

d) Tests Biologiques :

1) *Intradermo réaction chez le cobaye:* On injecte 0,1 ml de l'antigène soluble dans le derme de 3 cobayes. La réaction locale est notée après 48 heures. D'une manière générale les filtrats ainsi que les antigènes solubles, quelque soit le mode de leur préparation, ne provoquent aucune réaction sur le derme du cobaye.

2) *Toxicité:* 0,5 ml de l'antigène soluble ou dilué au 1/2 et 1/5 est inoculé dans la veine des souris blanches de 13-16 gr. Ces antigènes sont généralement atoxiques et les souris ne démontrent aucune réaction dans les jours qui suivent l'inoculation; de même leur poids augmente d'une manière régulière.

3) *Pouvoir de protection :* On applique la technique de Kendrick (19)

(*) *C'est une modification de la technique de culture de Dr Billaudelle de l'Institute de la Santé Publique, Stockholm.*

et celle adoptée en 1953 par l'OMS (26). Des groupes de 20 souris de 3 à 4 semaines sont vaccinés par voie intraperitonéale, avec 0,5, 0,1 et 0,02 ml de l'antigène soluble. La vaccination se fait en deux temps dans un intervalle de 4 jours. 12 jours après la deuxième injection on éprouve les souris vaccinées par voie intracérébrale avec $1,5 \times 10^5$ de germes vivants de *H. pertussis*, phase 1. souche 18323 sous volume de 0,03 ml, soit 1500 à 2000 DL 50. Dans le cas de vaccins on immunise les souris en un seul temps avec différentes doses de vaccin par voie intrapéritonéale et éprouve les animaux après 12 jours de la même manière.

e) Préparation de sérum hyperimmun.

5 groupes de 6 lapins sont hyperimmunisés avec les antigènes suivants:

1) Antigène soluble, culture aérée, méthode de l'Institut Razi.

2) Antigène soluble, culture agitée.

3) Vaccin anticoquelucheux lot 15/38 (culture totale aérée, merthiolatée et stokée 3 mois à +4°C).

4) Suspension de *H. pertussis* phase 1, culture raclée sur milieu au de Bordet-Gengou.

5) Suspension du corps microbien obtenue par la centrifugation de culture agitée et suspendue dans l'eau physiologique.

Dans les 3 derniers cas la suspension microbienne est ajustée à 20×10^9 /ml.

Les lapins sont hyperimmunisés par voie intraveineuse avec des doses croissantes de ces antigènes. Il faut se rappeler que les antigènes utilisés sont tous préparés avec la souche 18323. Les doses inoculées sont: 0,3, 0,5, 0,8, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, et 8 ml. On saigne les lapins 10 jours après la dernière injection.

f) Gel diffusion.

Pour détecter le nombre des antigènes par la technique de diffusion on emploie soit la technique d'Ouchterlony (27) soit celle d'Oudin (28) tenant compte de la modification apportée par Oakley (25) telle que nous avons décrit ailleurs (31).

g) Haemagglutination.

On applique la technique déjà développée par l'un de nous en collaboration avec R. Néel (24) dont voici le principe:

A partir du sang citaté de mouton (100 ml de sang additionné de 5 ml d'une solution à 2% de citrate trisodique) on prépare une suspension à 2,5% de globules rouges 3 fois lavés avec de l'eau physiologique à 9

grammes de NaCl par litre. La suspension globulaire se fait dans le tempon phosphaté à pH 7.2 dont voici la formule:

Eau physiologique 40 ml
Sol. PO₄ KH₂ à 0,15 M 12 ml
Sol. PO₄ Na₂ H à 0,15 M q.s. pour pH 7.2.

A un volum de cette suspension globulaire on ajoute un volume d'une solution fraîche à lp. 15000 d'acide tannique, le mélange reste 10 minutes à la température du laboratoire puis on le centrifuge 3 minutes à 1500 t.p.m. Le sédiment sera resuspendu dans son volume initial d'eau physiologique.

Afin de sensibiliser les globules rouges tannés on mélange une partie de la suspension globulaire avec 4 parties de l'antigène soluble de H. pertussis à étudier. Le mélange reste 15 minutes à 30° C puis on le centrifuge, 3 minutes à 1500 t.p.m. Le sédiment est une fois lavé avec de l'eau physiologique contenant le sérum normal inactivé de lapin à raison de 0,4% on amène finalement la suspension tannée et sensibilisée des globules rouges de mouton à son volume initial en utilisant de l'eau physiologique à 0,4% de sérum inactivé de lapin.

Pour l'étude de hémagglutination on choisit le sérum hyperimmun de lapin, préparé avec l'antigène soluble de la culture agitée pendant 48 heures, souche 18323, milieu Kuwajima, ou l'antigène soluble de la culture aérée.

Le sérum est chauffé 30 minutes à 56° C.

Dans une série du tubes d'hémolyse on met d'abord 0,5 ml des dilution de sérum puis on ajoute à chaque tube 0,05 ml de suspension tannée et sensibilisée de globules rouges.

Le mélange agité est chauffé 30 minutes à 37° C puis centrifugé une minute et demi à 1000 t.p.m. puis on note les résultats.

RESULTATS

Absence de toxicité des antigènes solubles

Sur 5 lots consécutifs de cultures agitées ou aérées on a cherché la toxicité du surnageant pour la souris. Dans tous les cas cet animal ne présente aucun signe dans les 5 jours qui suivent l'inoculation et son poids s'augmente régulièrement.

Le tableau 1 illustre les résultats.

Tableau 1 — Innocuité des antigènes solubles

| Antigène soluble | Nombre d'essais | Dose injectée ml | Survie des souris/ total inoculé |
|------------------|-----------------|---------------------|----------------------------------|
| Culture aérée | 5 | 0,5 0,25 0,10 | 9/9 |
| Culture agitée | 5 | 0,50 0,25 0,1 | 6/6 |

EFFICACITE

5 lots d'antigène solubles d'origine des cultures aérées ou agitées sont comparés au point de vue de leur pouvoir de protection chez la souris blanche. D'une manière générale quand on vaccine les souris par 2 doses d'antigène, ce pouvoir est presque le même dans les 2 cas. Nous n'avons pas cherché à comparer le pouvoir de protection des lots de vaccin de routine avec ces antigènes solubles, mais l'injection d'une seule dose de ces vaccins (15 lots) provoque un degré de protection inférieur à celui de deux doses de l'antigène soluble (tableau 2).

Dénombrement des antigènes par la diffusion dans la gélose

Si on applique la technique d'Oudin ou celle d'Ouchterlony en utilisant l'antigène soluble de H. pertussis et le sérum hyperimmun de lapin préparé avec ces antigènes on aura des lignes de précipitation (voir les figures 2, 3, 4 et 5).

De l'ensemble de nos observations, nous ne pouvons pas à l'heure actuelle démontrer quelle ligne correspond à l'antigène de protection, mais comme nous verrons ci-après il est évident qu'il y a un rapport direct entre la présence des antigènes protecteurs et ceux décelables par la diffusion dans la gélose.

Ce phénomène nous permet d'apprécier, d'une manière approximative, la richesse d'un vaccin en antigène protecteurs.

Nous allons exposer le résultat de nos observations à ce sujet:

Tableau 2

EFFICACITE DES ANTIGENES SOLUBLES DE H. PERTUSSIS

| Antigène | Nombre d'injections | Dose | Epreuve: 15000-2000 DI/50 |
|------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------|
| | | | Survivant/total |
| Antigène soluble Culture aérée | 2 | 0,5 ml | 18/20 |
| | | 0,1 ml | 15/20 |
| | | 0,02 ml | 10/20 |
| Antigène soluble Culture agitée | 2 | 0,5 ml | 20/20 |
| | | 0,1 ml | 15/20 |
| | | 0,02 ml | 11/20 |
| Vaccin lot 8/36 Culture agitée | 1 | 15×10^8 germs | 13/20 |
| | | 3×10^8 " | 10/20 |
| | | $0,6 \times 10^8$ " | 5/20 |
| Vaccin standard | 1 | 15×10^8 germs | 11/20 |
| | | 3×10^8 " | 9/20 |
| | | $0,6 \times 10^8$ " | 6/20 |

- 1) Surnageant de culture liquide, milieu Cohen-Wheeler de 72 heures à 10 milliards/ml Pas de lignes de précipitation
- 2) Le même surnageant après une seule congélation-décongélation de culture Pas de lignes de précipitation
- 3) Surnageant de l'émulsion microbienne à 20 milliards/ml, préparée à partir du milieu solide de Bordet-Gengou, immédiatement après la récolte Pas de lignes de précipitation
- 4) Le même surnageant après 3 fois de congélation-décongélation de l'émulsion microbienne 3 lignes de précipitation
- 5) L'antigène soluble de culture liquide agitée de 48 heures, milieu sans amidon de Kuwajima à 26 milliards/ml 9-10 lignes de précipitation
- 6) L'antigène soluble de culture liquide aérée de 72 heures à 18 milliards/ml, immédiatement à la fin de culture Pas de lignes de précipitation

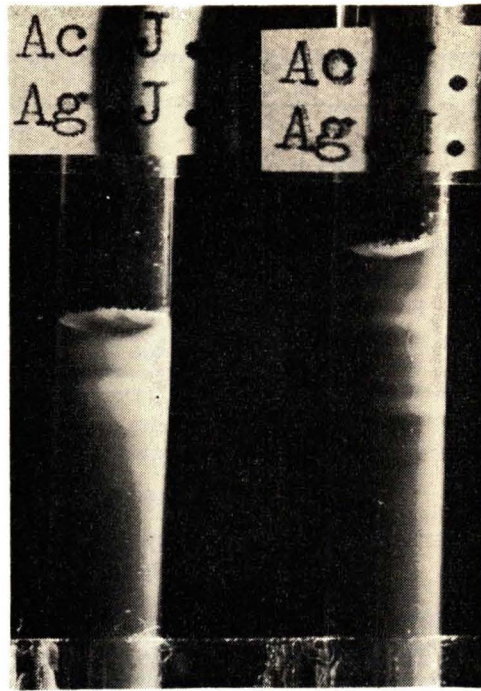


Fig. 2

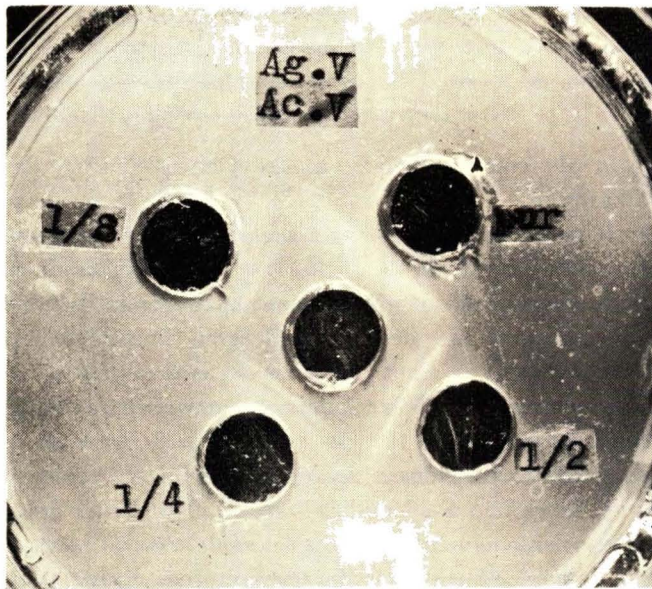


Fig. 3

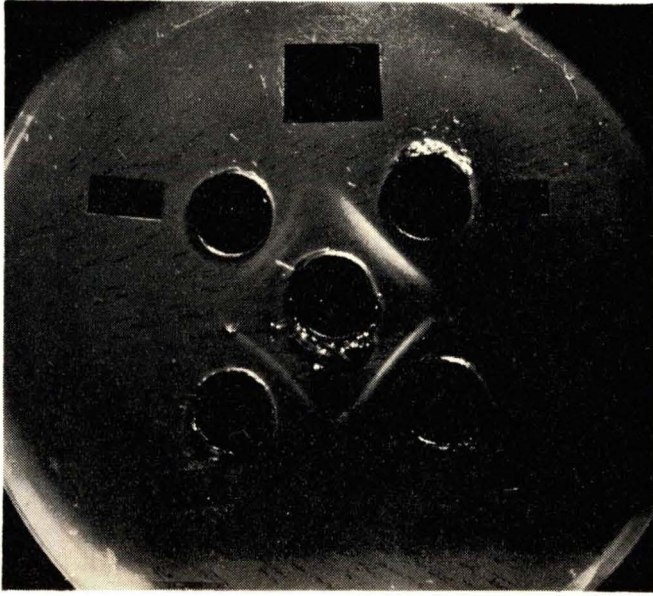


Fig. 4

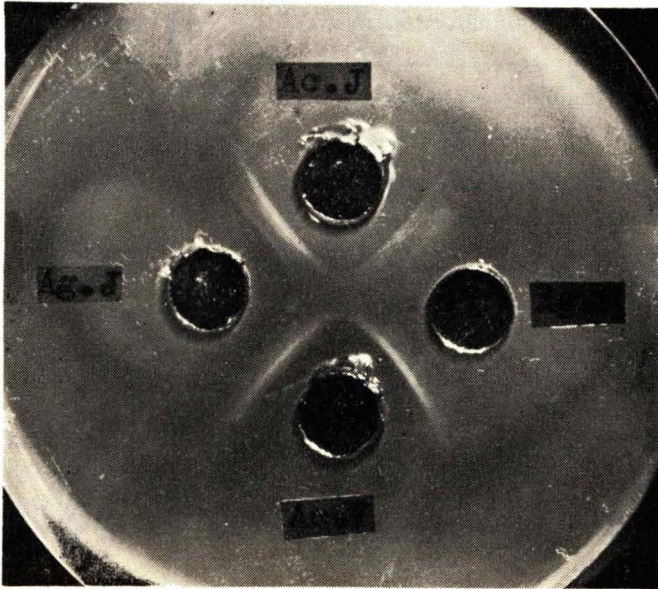


Fig. 5

- 7) Le même antigène, après sotckage de 72 heures de culture aérée à + 4° C
3 lignes de précipitation
- 8) Le même antigène, après 3 mois de conservation de culture à +4° C
9—12 lignes de précipitation

De ce qui précède et tenant compte des observations d'autres auteurs on peut aisement comprendre la relation étroite qui existe entre le pouvoir de protection d'un antigène coquelucheux et la présence d'un certains nombres d'antigènes dans les plaques de gélose.

Pouvoir agglutinant de différents sérums anticoquelucheux

Nous avons donné plus haut en détail la technique de l'hyperimmunisation des lapins avec différents antigènes solubles ou microbiens. On cherche le pouvoir agglutinant de ces sérums en mélangeant 0,5 ml de différentes dilutions de ces sérums avec 0,5 ml d'une suspension de H. pertussis, phase 1, souche 18323 à 1 milliards/ml.

Les résultats sont notés après une incubation de 30 minutes à 37° C et 2 minutes de centrifugation à 1000 t.p.m.

Voici ces résultats dans le tableau No. 3.

Tableau 3

POUVOIR AGGLUTINANT DE DIFFERENTS SERUMS ANTICOQUELUCHEUX

| Sérum hyperimmun préparé avec : | Limite d'agglutination |
|--|------------------------|
| 1) Antigène soluble, culture agité de 48 heures, conservée 3 jours à +4° C | 1 : 20480 — 1 : 40960 |
| 2) Antigène soluble, culture aérée de 72 heures, conservée 3 mois à +4° C | 1 : 20480 — 1 : 40960 |
| 3) Vaccin anticoquelucheux lot 15 (culture totale à 20 milliards/ml, stockée 3 mois à +4° C | 1 : 20480 — 1 : 40960 |
| 4) Suspension microbienne à 20 milliards/ml, recoltée sur milieu de Bordet-Gengou | 1 : 20480 |
| 5) Corps microbiens lavés et ajustés à 20 milliards/ml (culture liquide agitée) | 1 : 2560 — 5120 |
| 6) Corps microbiens lavés 3 fois et ajustés à 20 milliards/ml (culture sur milieu Bordet-Gengou) | 1 : 2560 — 5120 |

Tableau 4

REACTION D'HEMAGLUTINATION DE DIFFERENTS ANTIGENES SOLUBLES DE H. PERTUSSIS

| Antigènes sensibilisant les globules tannés | Dilution de sérum hyperimmun | | | | | | |
|---|------------------------------|------|--------|--------|--------|---------|---------|
| | 1/25 | 1/50 | 1/1600 | 1/3200 | 1/6400 | 1/12800 | 1/25600 |
| Antigène soluble culture aérée après 3 mois de stockage | | | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + |
| Antigène soluble culture aérée après 3 jours de stockage | | | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ |
| Antigène soluble culture aérée après 3 jours de récolte | | | ++++ | +++ | ++ | + | |
| Antigène soluble culture aérée après 3 jours de récolte, et 3 fois congelé et décongelé | | | ++++ | +++ | ++ | + | |
| Antigène soluble culture liquide en boîte de Roux sans aération ni agitation | — | — | | | | | |
| Surnageant de culture à 20 milliards/ml sur milieu Bordet-Gengou, 3 fois congelé et décongelé | | | + | — | | | |

Le tableau No. 3 nous montre que la présence des antigènes solubles influe sur l'élaboration des agglutinines dans le sang des lapins hyperimmunisés. Les suspensions lavées de bacille coquelucheux, quel que soit leur milieu de culture d'origine sont moins favorables pour la formation de ces anticorps.

Hémagglutination

On sensibilise des globules rouges tannés de mouton avec différents antigènes solubles de *H. pertussis*. Les résultats sont décrits dans le tableau No. 4. On utilise comme témoin soit des globules tannés et le sérum normal du lapin, soit des globules tannés et sensibilisés avec le sérum physiologique. Dans les deux cas les tubes témoins ont la réaction négative.

DISCUSSION

Le but principal de ces recherches est d'améliorer la qualité du vaccin anticoquelucheux destiné à l'immunisation des enfants. Après de longues enquêtes un Comité d'Experts Anglais (1) a confirmé que l'antigène coquelucheux qui protège la souris blanche contre l'infection cérébrale de *H. pertussis* est le même qui protège l'enfant contre la coqueluche.

Le rôle de ces antigènes solubles dans la protection de souris blanche a été d'autre part largement démontrée au cours de ces dernières années. Il est donc essentiel que nos vaccins soient riches à ces antigènes.

Déjà la culture aérée, telle que nous venons d'exposer nous permet de produire, à une échelle assez large, le vaccin en question. La culture aérée de 72 heures, merthiolatée et conservée 3 jours à + 4° C est déjà riche en antigènes solubles.

D'autres recherches en cours, nous permettent de simplifier également la production du vaccin sur une grande échelle. Sous certaines conditions par exemple, on peut remplacer le Bacto casaminoacide par un hydrolysat acide de caséine de fabrication locale. On peut également remplacer l'amidon par la résine Amberlite pour obtenir des titres de 20 à 30 milliards/ml et éliminer après la culture la résine. D'autres expériences en cours nous permettent de prévoir que l'antigène soluble adsorbé sur des composés d'alumine pourrait remplacer la suspension de bacille de Bordet-Gengou dans la vaccination des enfants.

Il nous semble que l'antigène soluble de *H. pertussis* est en grande partie lié à la surface de bactérie et qui se libère facilement dans la culture et diffuse après l'arrêt de la culture à l'extérieur par un simple hydrolyse des bactéries. Nous avons démontré en 1949 en collaboration avec L. P. Delpy (4) qu'à la suite de stockage des suspensions de *Pasteurella septica*

dans l'eau distillée merthiolatée l'antigène immunisant se libère facilement. De même, l'hydrolyse enzymatique nous a permis d'extraire les antigènes immunigènes d'un certain nombre de bactéries.

Dans le cas de bacille coquelucheux le même phénomène se passe. Une partie des antigènes solubles se diffuse dans le milieu de culture, le reste sera libéré graduellement par vieillissement de culture ou sous l'influence des agents physicochimiques.

Il est digne de remarquer qu'on peut mettre en évidence la présence des antigènes solubles par la diffusion dans la gélose. Déjà dans la culture aérée et stockée 3 mois à froid nous avons pu démontrer 9 à 12 antigènes bien distincts sans reconnaître le vrai antigène protecteur.

RESUME

La méthode simple de la culture liquide aérée de *H. pertussis* phase 1 est décrite.

Malgré la présence de l'amidon cette culture est riche en antigènes solubles. Son pouvoir de protection chez la souris blanche vaccinée et éprouvée par l'injection intracérébrale est comparable à celui de l'antigène soluble de la culture agitée et sans amidon. On peut suivre l'élaboration de ces antigènes par la technique de diffusion dans la gélose.

SUMMARY

A simple method for preparing an aerated liquid culture of *H. pertussis* phase 1 has been described.

The culture was found to be rich in soluble antigens. The presence of starch did not seem to interfere with the release of these antigens. The ability of the antigen to immunize swiss mice, when the animals were first inoculated with this antigen followed by intracerebral challenge, was found to be equal to the antigen which is prepared in shaking culture in the absence of starch.

The elaboration of the soluble antigen may be detected by using gel diffusion techniques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Annual Rep. Lister Inst. 1957, p : 8.
2. Cohen, S. M. et Wheeler, M. W. 1946 — Am. J. Pub. Health, 36 : 371.
3. Cruickshank, J. C. et Freeman, G. G. 1937 — Lancet, 2, 567.
4. Delpy, L. P. et Mirchamsy, H. 1949 — C. R. Ac. Sci., 228, 1768.
5. De Repentigny, J. et Frappier, A. 1956 — Canada J. Microb., 2, 667.

6. Dolby, 1959 — Annual Rep. Lister Inst. p : 11.
7. Eldering, G. 1942 — Am. J. Hyg., 36, 294.
8. Ensminger, P. W., Culbertson, C. G. et Powell, H. M. 1953 — J. Inf. Dis. 93, 266.
9. Farrel, L. et Taylor, E. M. 1945 — Canad. J. Pub. Health, 36, 326
10. Felton, H. M. et Verwey, W. F. 1955 — Pediatrics, 16, 637.
11. Flosdorf, E. W., Kimball, A. C. et Chambers, L. A. 1939 — Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 41, 122.
12. Flosdorf, E. W. et Kimball, A. C. 1940 — J. Immunol., 39, 287.
13. Flosdorf, E. W. et Kimball, A. C. 1940 — J. Immunol., 39, 475.
14. Frappier, A. et Guérault, A. 1955. — Rev. Canad. Biol., 14, 193.
15. Guérault, A. et Maitland, H. B. 1958 — Nature, 181, 122.
16. Hiltbold, B., Huber, L. et Regamey, A. A. 1958 — Schweiz. Z Pathol. Bakt., 21, 939.
17. Hinks, J. H., Frederick, F. Johnson 1947 — J. Immunol., 57, 323.
18. Hornibrook, J. W. 1939 — U. S. Public Health, 54, 1847.
19. Kendrick, P. L., Eldering, G., Dixon, M. K. et Misner, J. 1947 — Am. J. Publ. Health, 37, 803.
20. Keogh, E. V. et North, E. A. 1948 — Aust. J. Exper. Biol. & Med. Sc., 26, 325.
21. Kuwajima, Y., Masui, M., Asano, A. et Matsui, T. 1956 — J. Immunol., 76, 175.
22. Lawson, G. M. 1940 — J. Lab. & Clin. Med., 25, 435.
23. Masri, L. 1951 — Annual Rep. Lister Inst., p : 6.
24. Néel, R. et Taslimi, H. 1954 — Annales Biol. Clin., 12, 98.
25. Oakley, C. L. et Fulthorpe, A. J. 1953 — J. Path. Bact., 65, 49.
26. Org. Mond. Santé 1953 — Ser. Rapp. Techn., 61.
27. Ouchterlony, O. 1948 — Acta Path. Microbiol. Scand., 25, 186.
28. Oudin, J. 1946 — C. R. Acad. Sci., 222, 115.
29. Pillemer, L., Burrnell, J. I. et Ross, O. A. 1947 — Science, 106, 36.
30. Pollock, M. R. 1947 — Brit. J. Exp. Path., 28, 295.
31. Rafyi, A., Mirchamsy, H. et Delsal, J.L. 1954 — Rev. Immunol., 18, 391.
32. Robbins, K. C. et Pillemer, L. 1950 — J. Immunol., 65, 393.
33. Smolens, J. et Mudd, S. 1943 — J. Immunol., 47, 155.
34. Standfast, A. F. B. 1950 — Annual Rew. Lister Inst., p : 6.
35. Standfast, A. F. B. et Horton, J. 1954 — Annual Rep. Lister Inst., p : 6.
36. Verwey, W. F. et Thiele, E. H. 1949 — J. Immunol., 61, 27.
37. Verwey, W. F., Thiele, E. H., Sage, D. N. et Schuchardt, L. F. 1949 — J. Bact., 58, 127.
38. Wilson, R. J. 1945 — Canad. J. Pub. Health, 36, 321.