

PURIFICATION ET CONCENTRATION DES PLASMAS ANTITOXIQUES.

I - HISTORIQUE, TECHNIQUES INDUSTRIELLES ET CHOIX DE LA MÉTHODE ADOPTÉE EN IRAN.

par J.-L. DELSAL et H. MIR CHAMSY

HISTORIQUE

I - TRAVAUX ANCIENS.

La digestion enzymatique des plasmas antitoxiques, principe fondamental des purifications industrielles modernes est connue depuis très longtemps.

Le brevet de IMRAY (31) datant de 1903 avait déjà attiré l'attention des chercheurs sur la méthode de purification des antitoxines par les enzymes. Cependant ce brevet n'a pas eu le retentissement souhaitable; c'est qu'en effet les travaux de PICK (66), de MELLANBY (44), de SCHMIDT & TULITSCHINSKAYA (85) étaient peu encourageants puisqu'ils montraient que les anticorps étaient rapidement détruits par la pepsine et cependant moins rapidement par la trypsine. Les travaux de BERG & KELSER (3) puis de BERG (4) dans le but de purifier l'antitoxine tétanique par action peptique furent infructueux puisque la destruction de l'anticorps semblait se produire à la même vitesse que celle de la protéine; cependant l'anticorps peut résister, sous certaines conditions, à une digestion enzymatique comme l'a montré ROSENHEIM (74). Il faut se rendre compte qu'à cette époque la réalisation de telles expériences était très difficiles. POPE (67) dans son premier mémoire explique pourquoi, à son avis, les travaux anciens n'avaient pas été pris plus sérieusement en considération. Il y avait d'abord la difficulté de contrôler le pH de la digestion; puis le défaut d'une méthode simple de titrage de l'activité antitoxique. Les titrages, *in vivo*, pratiqués à cette époque ne permettaient pas d'entreprendre les expériences en série par suite de l'emploi d'un trop grand nombre d'animaux. L'introduction

de la méthode de floculation de RAMON (73) en 1922 a fourni aux chercheurs un moyen simple, rapide et suffisamment précis pour le titrage, *in vitro*, de l'activité antitoxique et a permis d'entreprendre les nombreuses expériences nécessaires pour préciser les conditions expérimentales de la digestion enzymatique.

Vers 1930, la purification des antitoxines était surtout faite par fractionnement au sulfate d'ammonium. MOERCH (51) montre que les euglobulines (précipitées entre 0 et 33 % de sulfate d'ammonium) et les albumines sont exemptes d'anticorps, tandis que les pseudoglobulines (précipitées entre 33 et 50 % de sulfate d'ammonium) constituent le support de l'antitoxine. C'est d'après ce principe que l'on orientait les recherches (52) et on se contentait, pour la purification, d'isoler les pseudoglobulines du sérum. Cependant les choses étaient beaucoup plus compliquées. Pour chaque sérum à purifier MOERCH traçait la courbe de précipitation de l'antitoxine en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium (ce qu'il appelle le «spectre antitoxine protéine») et se plaçait dans les conditions les meilleures pour obtenir un rendement et une purification acceptables. Cependant certains sérums se prêtaient très mal à la purification, l'antitoxine étant présente également dans les euglobulines.

Des essais de purification avaient aussi été tentés par adsorption. Des expériences sur l'adsorption de l'antitoxine diphtérique avaient été faites dès 1893 par ARONSON (2) et plus tard par MARSCHALL & WELKER (43). Mais c'est le travail fondamental de WILLSTAETTER sur la séparation et la purification des ferments par adsorption qui incita de nombreux chercheurs à l'appliquer aux antitoxines. La méthode est basée sur le fait qu'il est possible de séparer l'antitoxine du sérum par adsorption sur alumine ou kaolin commercial. Après élution l'antitoxine passe en solution. Ces méthodes développées par FOSLER & SPIEGEL-ADOLF (13), TASHMAN & PONDMAN (93), KLIGLER & OLEZKI (37), A. HANSEN (22), nécessitent la détermination des conditions optimales d'adsorption et les rendements obtenus sont très variables. Von KLOBE-SITZKY (38) se basant sur la technique de FRANKEL (17) adsorbe un sérum antitétanique, dilué avec 3 volumes d'eau, sur kaolin à pH 8,8. Après une agitation de 6 heures à la température du laboratoire il enlève le kaolin par centrifugation. L'élution de l'antitoxine est faite à pH 9,3 - 9,4 en s'inspirant de la méthode de FOPOR, BOONBERG & SCHROEDER (15) pour la séparation des peptidases de la levure. Le produit mis en suspension dans une solution de glycocolle est amené à pH 9,4 par de la soude. Après une agitation de 3 heures à 30°, la solution est centrifugée et amenée à pH 7,4. La solution est ensuite ultrafiltrée (colloïdion à 10%). L'auteur obtient une antitoxine titrant 1400 *u/ml* avec un rendement de 56%. Cependant la lyophilisation se fait régulièrement et il n'est

est pas de même pour l'élué dont le rendement est irrégulier : de 8 à 56%.

Une autre méthode employée par VON KROBETSZKY (38) est basée sur la précipitation des pseudoglobulines par le sulfate d'ammonium, dialyse et électro-ultrafiltration. Par cette méthode l'auteur arrive à une antitoxine titrant 35 u/ml, 12,4 u par mg N, avec un rendement de 70, 7%.

Faisons ressortir que l'auteur montre que l'antitoxine tétanique ne perd pas son activité à des pH de 3,8 à 9,4, à 21-24°, pendant 8 jours.

Les méthodes que nous venons d'examiner permettent d'obtenir ces sérums 1,5 fois environ plus riches en antitoxines. Les travaux de PARFENTJEV (58) et de POPE (67 à 70), que nous allons examiner maintenant permettent de pousser beaucoup plus loin la purification : 3 à 5 fois environ.

II. TRAVAIL DE PARFENTJEV ET DE POPE.

Déjà en 1935 les laboratoires LEDERLE (41) signalaient une méthode de purification des antitoxines par autolyse sélective suivie d'une précipitation, ultrafiltration et dialyse. La publication d'une référence parue dans le même journal (cité par POPE (67) par le «Council of Pharmacy NNR» traite de la même question. Ces articles sont-ils en rapport avec les brevets de PARFENTJEV, travaillant aux laboratoires LEDERLE? - C'est vraisemblable, mais nous n'avons pas pu élucider ce point n'ayant pas la possibilité de consulter ce journal. Quoiqu'il en soit le travail des Laboratoires LEDERLE a donné aux chercheurs une impulsion nouvelle. Quel était exactement la méthode de PARFENTJEV. Nous n'avons pu lire que la seule publication de WEIL, PARFENTJEV & BOWMAN (105) traitant de la valeur antigénique de l'antitoxine purifiée. Ils donnent dans ce mémoire le principe de leur purification. «Les protéines d'un sérum antitoxique peuvent être digérées par un excès de pepsine jusqu'à un point où 70-80% des protéines sont rendues incoagulables par la chaleur. La digestion peptique est conduite pendant 4 à 24 heures à 37° et à un pH compris entre 4 & 4,5. L'acide seul, à cet intervalle de pH, détruit les anticorps, mais la pepsine exerce une protection contre cette action. Le reste protéinique, après digestion, est séparé des produits de la digestion par dialyse et précipitation par le sulfate d'ammonium à 50%. Le précipité dissout est dialysé, il contient l'antitoxine. Il est traité ensuite par une suspension fraîchement préparée de phosphate de calcium dans le but d'éliminer la pepsine résiduelle.» Avec une telle méthode PARFENTJEV arrive à une antitoxine diphtérique (Globuline modifiée) titrant 5.400u/ml; le degré de pureté du sérum obtenu est de 29%.

PAPPENHEIMER & ROBINSON (54), dans leur étude sur la réaction de floculation de RAMON, ont employé un sérum purifié selon le brevet de PARFENTJEV; 30% de cette préparation sont spécifiquement précipitables par la toxine.

Cette méthode de purification a eu un grand retentissement et a incité les chercheurs à reprendre les recherches sur le traitement enzymatique des antitoxines.

MODERER & ROFF (45) publient le 5 Mai 1938 un travail sur la désintégration protéolytique du sérum antidiphthérique. Ces auteurs reprennent les expériences de PARFENTJEV en effectuant la digestion peptique à un pH compris entre 3 et 4, sur un sérum dilué au 1/2, avec 0,2% de pepsine, pendant 24 heures à 40-50°. L'adsorption est faite ensuite sur phosphate de calcium.

HANSEN (23) le 24 Juin 1938 publie une note sur l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sur l'antitoxine diphthérique. La digestion est faite à 22°, pH 3,2 et 0,1% de pepsine. Cet auteur note que dans un sérum dilué l'antitoxine est plus stable.

Cependant un fait expérimental nouveau d'une grande importance pratique a été publié le 28 Juin 1938 par POPE (67). Dans cette note préliminaire sur la désintégration des protéines par les enzymes, il montre que la fibrinolyse est capable de produire un changement dans la molécule pseudoglobulinique antitoxique. Il se produit une désintégration en composés protéiniques ayant des propriétés physiques et chimiques différentes. Cette action n'est d'ailleurs pas limitée à la fibrinolyse, mais est donnée par toutes les enzymes protéolytiques et notamment par la pepsine. Dès 1938 la méthode de dénaturation par la chaleur était découverte et s'est révélée comme une méthode industrielle de choix pour la purification des antitoxines.

POPE montre que l'enzyme coupe la protéine spécifique en molécules de taille plus petite (1/2 à 1/3). Les propriétés chimiques (notamment la stabilité et pH de stabilité) de la forme initiale de l'antitoxine et de sa forme scindée par hydrolyse enzymatique sont différentes. L'action limitée de l'enzyme désagrège l'anticorps en deux fragments protéiniques: le portion non antitoxique est coagulée par la chaleur en présence d'électrolyte et d'antiseptique, le portion restant soluble étant antitoxique.

Le pouvoir adsorbant vis à vis du gel d'alumine est aussi différent: si la forme originale est adsorbée par le gel d'alumine, il n'y a plus d'adsorption lorsque la molécule a été coupée en deux fractions par action de l'enzyme. Dans cette note préliminaire POPE mentionne la production d'autres résultats. Deux longs tableaux détaillés (58, 62) l'un sur la digestion des protéines, l'autre sur la dénaturation par la

chaleur après digestion partielle enzymatique furent remis le 23 Janvier 1939 pour la publication.

Ces deux mémoires ont mis au point le principe de la purification des antitoxines : digestion à pH 3,2; température 20 à 30° pendant 30 minutes; plasma dilué au 1/3; avec 0,25% de pepsine. L'addition de toluène avant le chauffage est destinée à entraîner les lipides par les protéines coagulées à 55° et pH 4,2 en présence de 15% de sulfate d'ammonium. POPE note qu'avec le Na Cl utilisé comme électrolyte la filtration, après la dénaturation par la chaleur, est lente, le précipité formé étant gélatineux; par contre avec le sulfate d'ammonium la filtration est bien meilleure sans modifier les résultats. Par cette méthode POPE arrive à des sérums antitoxiques titrant 167 u/mg N. A une concentration finale en protéines de 16% le produit obtenu montre un coefficient de concentration de 8 à 12 fois, un coefficient de purification de 5, et un rendement de 60%.

POPE note que les chevaux qui sont immunisés rapidement et qui donnent des sérums de titre élevé sont plus aptes à fournir une bonne purification. Les variations de l'immunisation d'un cheval à l'autre peuvent produire des degrés très variables de digestion et des pertes imprévisibles d'antitoxine.

La trypsine peut remplacer la pepsine pour la digestion, mais aux faibles concentrations où elle est employée il faut détruire, au préalable par la chaleur, le «facteur antitrypsique» du sérum ou faire la digestion tryptique à pH 4,0. La papaïne peut également être employée.

En 1939 et 1940 SANDOR (76 à 83), MODERN & RUFF (47 à 50) appliquèrent les principes édictés par PARFENTJEV ou POPE et confirmèrent en tous points les expériences de ces auteurs. Toutefois les cinq facteurs intervenant dans la digestion : concentration en protéines, concentration en enzyme, pH, température, temps de réaction sont différents. MODERN & RUFF par exemple adoptent pour la digestion : sérum non dilué, 0,4% de pepsine, pH 4,0, température 46° pendant 1 heure. La thermocoagulation étant faite à 60° pendant 20 minutes en présence de 5% de NaCl à pH 4,3-4,4. Le coefficient de purification est de l'ordre de 5 avec un rendement de 50%.

III - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES :

Il est capital, pour bien appliquer ces méthodes de digestion suivie soit d'adsorption, soit de thermocoagulation, de bien comprendre le mécanisme de ces actions. La digestion modifie les caractères d'adsorbabilité et de coagulabilité des divers constituants protéiniques, mais comment le fait-elle et quelle en est l'incidence sur la purification

obtenue? Les techniques modernes d'électrophorèse et d'ultracentrifugation ont apporté des éléments nouveaux que nous allons examiner maintenant.

PAPPENHEIMER, LUNDGREN & WILLIAMS (57) ont montré les premiers, que les pseudoglobulines antitoxiques purifiées sont homogènes à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation. La mobilité de la fraction antitoxique est intermédiaire entre celle des gamma-globulines et des beta-globulines. Déjà dans le sérum antitoxique non purifié apparaît une nouvelle fraction dans cette région. VAN DER SCHEER & WYCKOFF (99 à 102) ont désigné ce nouveau composé par T. FELL, STERN & COHILL (14) ont également effectué une étude physico-chimique des sérums de chevaux normaux et immunisés. KEKWICK & RECORD (34) ont montré qu'il existait deux types d'antitoxines chez un cheval immunisé intra musculairement par de l'anatoxine diphtérique purifiée (avec un rendement très élevé). Incidemment faisons remarquer que le sérum antitoxique produit n'est essentiellement différent de celui obtenu à partir de chevaux immunisés avec l'anatoxine brute. Ces deux composés associés aux gamma et beta globulines ont été isolés par électrophorèse, ils ont des caractères différents: Le rapport de l'activité *in vivo* déterminé par le test L + à l'activité *in vitro* mesurée par la méthode de floculation de RAMON de ces deux types d'antitoxine sont différents, le rapport est de 0,9 pour la fraction antitoxine beta-globuline et 2,0 pour la fraction antitoxine gamma-globuline. Ces deux antitoxines ont des différences dans le temps de floculation, l'antitoxine gamma-globuline se combine plus rapidement à la toxine que l'antitoxine beta-globuline, cependant elle serait moins stable. La quantité d'azote contenue dans le flocculat avec la toxine est différente également: avec l'antitoxine beta-globuline le flocculat a la constitution $(TA 2)_n$ tandis qu'avec l'antitoxine gamma-globuline la constitution serait $(TA 3)_n$. La proportion de ces deux antitoxines varie au cours de l'immunisation, la gamma-globuline est produite d'abord et atteint une valeur à peu près fixe au cours de l'immunisation. Après une immunisation plus poussée la beta-globuline augmente jusqu'à atteindre 45% du total des protéines; tandis que les albumines subissent une baisse très importante. Cette fraction beta-globuline est identique à la fraction T de VAN DER SCHEER. L'électrophorèse de sérums de chevaux immunisés avec l'anatoxine tétanique décele également l'existence des deux types d'antitoxine tétanique. Au point de vue physico-chimique ces globulines ont un poids moléculaire de 181.000, une constante de floculation $s_{20,100}$ de 7,2 et une constante de diffusion D. 10^7 de 3,90.

Voilà maintenant ce que deviennent ces fractions après la digestion peptique. VAN DER SCHEER & WYCKOFF (99,102) par une étude électrophorétique montrent que le composé T se transforme

par la digestion peptique en un autre composé de mobilité plus faible qui se déplace avec les gamma-globulines. PETERMANN & PAPPENHEIMER (59) étudient les propriétés physico-chimiques des antitoxines non traitées et digérées. Ils confirment le travail de POPE puisque le poids moléculaire de l'antitoxine non purifiée est de 184.000 (poids moléculaire d'une globuline normale) et que le poids moléculaire de l'antitoxine purifiée par digestion est de 98.000; la molécule protéinique a bien été clivée par la digestion en deux parties égales; une partie active et une autre inactive. Le point isoionique de l'antitoxine (83) digérée est pH 7,0 alors que pour les globulines non digérées le point isoionique est 5,8 à 6,0. Cette augmentation du point isoionique prouve que sous l'effet de la pepsine, il y a eu départ de fonctions ionisées.

L'effet de la chaleur a été étudiée par électrophorèse par VAN DER SCHEER (100). Les composés protéiniques d'un sérum chauffé à 65° se transforment en un seul composé ayant une mobilité électrophorétique identique à celle des beta-globulines. Dans le sérum antitoxique ce nouveau composé se forme également au dépend des gamma-globulines. KREJCI, SMITH & DIETZ (39, 40) ont fait aussi des observations semblables. Bien que KLECZKOWSKI (35, 36) ait travaillé avec les anticorps-lapin, il montre qu'ils forment des complexes par chauffage avec d'autres protéines non spécifiques. Ces complexes peuvent se combiner à l'antigène à des degrés variables dépendant de la nature de la protéine non spécifique présente en solution pendant le chauffage. Si la combinaison se fait avec les euglobulines la floculation avec l'antigène a encore lieu; mais si le complexe se forme avec l'albumine les anticorps ne floculent plus avec l'antigène, mais peuvent encore se combiner à lui. La formation de ces complexes est influencée par la présence de sels. Ces conclusions peuvent-elles s'appliquer aux anticorps antitoxiques? - Il est impossible actuellement de répondre convenablement à cette question.

MELVIN COHN & PAPPENHEIMER (9) ont montré qu'il existe une identité d'action entre l'antitoxine de cheval et celle de lapin. En effet celles-ci peuvent être chauffées quelques heures à 56° sans perdre leur pouvoir précipitant. Il n'en est pas de même pour l'antitoxine humaine et celle de cobaye qui chauffées à 56°, seulement pendant peu de temps, ne précipitent plus avec la toxine. Il y a donc une différence très nette entre l'antitoxine humaine et celle de cheval, et il serait très intéressant de connaître d'où vient cette différence.

LEVINE (42), dans un récent article, a séparé deux groupes de protéines antitoxiques: l'un précipitant par chauffage à 57° pendant 1,5 heures en présence de 30% de sulfate d'ammonium; l'autre précipitant entre 30 et 50% de sulfate d'ammonium. Le premier groupe

contient des gamma et beta2-globulines, le second surtout des beta2-globulines. L'auteur trouve que les gamma-globulines antitoxiques ne sont pas supérieures, au point de vue thérapeutique, aux beta-globulines. Les protéines étudiées sont des mélanges et de plus le chauffage à 57°, en présence d'albumine et de protéines inertes, donne naissance à des complexes. Ceux-ci n'ont certainement pas les mêmes propriétés que des protéines électrophorétiquement pures.

IV - DISSOCIATION DU FLOCCULAT TOXINE-ANTITOXINE.

Le produit final digéré n'est pas entièrement précipitable par la toxine, il contient encore des protéines inertes. L'antitoxine purifiée floccule plus rapidement que l'antitoxine brute et peut se combiner à presque deux fois plus de toxine que l'antitoxine non purifiée de même teneur en azote. Nous sommes amenés maintenant à parler du traitement enzymatique du flocculat toxine-antitoxine. POPE & HEALEY (76) ont publiés les premiers (23 janvier 1939) leurs expériences sur cette question. Le flocculat toxine-antitoxine (purifié par traitement enzymatique) est lavé deux fois avec une solution phénolée saline, et une fois à l'eau distillée. Il est remis en suspension dans l'eau distillée et soumis à une digestion peptique à pH 3,0 pendant 30 minutes à 18°. Dans ces conditions 70% de l'antitoxine sont libérés. La solution est neutralisée et fractionnée au sulfate d'ammonium. Les auteurs obtiennent une antitoxine titrant 135 unités antitoxiques par mg de protéine. SANDOR (77) présente le 25 Mars 1939 un travail sur la même question. Il effectue la digestion des flocculats toxine-antitoxine diphtérique par la pepsine à 38°; pH 3 à 4 pendant 3 jours. Il obtient, avec un rendement de 25 à 30%, des protéines antitoxiques titrant 60 à 94 unités par mg de protéine. Le rendement est sans doute diminué par une digestion plus poussée; cependant le travail de SANDOR confirme celui de POPE & HEALEY.

NORTHROP (54, 55) purifie l'antitoxine diphtérique en digérant le flocculat toxine-antitoxine par la trypsine à pH 3,5. Après une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, il obtient des préparations qui sont au moins 90% précipitables par la toxine. La fraction précipitable entre 1/3 et 1/2 saturation en sulfate d'ammonium, est homogène à la fois à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation mais n'avait pas une solubilité constante. NORTHROP obtient une petite fraction d'antitoxine cristallisée en fines plaques et montrant une solubilité constante. Les propriétés physico-chimiques de cette fraction ont été mesurées par ROMAN (75). Le poids moléculaire est 90.000, la constante de sédimentation 5,5 et la constante de diffusion 5,7. *In vivo* elle titre 700 unités par mg. d'azote protéinique et *in vitro* de 700 à 1000. La digestion tryptique, comme la digestion peptique, coupe la molécule

antitoxique en molécules de taille moitié. PETERMANN (60, 61) a montré que la pepsine coupe aussi l'antitoxine diphtérique en deux fragments égaux. Ces fragments peuvent être coupés encore en deux par une digestion plus prolongée et un de ces fragments floccule encore avec la toxine. PETERMANN & PAPPENHEIMER (59) BRIGMAN (5); DEUTSCH, PETERMANN, & WILLIAMS (10), sont arrivés aux mêmes conclusions. La méthode de STERNBERGER & PRESSMAN (91) pourrait aussi être appliquée pour obtenir l'antitoxine pure. STERNBERGER & PETERMANN (92) ont vérifié que cette méthode ne modifiait pas la structure moléculaire de l'anticorps. Ces méthodes de dissociation du flocculat toxine-antitoxine qui permettent d'arriver à une pureté maximum de l'antitoxine ne peuvent être employées industriellement, mais nous les avons citées car elles sont d'un très grand intérêt au point de vue théorique.

V - CARACTÈRES IMMUNOLOGIQUES.

Un des principaux but d'une bonne purification des antitoxines est d'obtenir un produit qui élimine les réactions sériques. Les sérums purifiés par digestion répondent bien à cette condition; mais leur antigénicité subit une altération marquée. WEIL, PARFENTJEV & BOWMAN (105) l'avaient déjà observé. COGHILL, FELL, CREIGHTON & BROWN (7) éliminent la spécificité par digestion du plasma antitoxique avec la taka-diastase (obtenue à partir d'*Aspergillus Oryzae*). Les conditions de la digestion sont: plasma dilué au 1/3 - 5 g d'enzyme par litre de plasma - pH 3,8 - 37° pendant 3 à 5 jours. Le filtrat est ensuite ajusté à pH 7,0 et l'antitoxine est précipités par le sulfate d'ammonium; la solution obtenue est ensuite dialysée. L'antitoxine obtenue a la même constante de sédimentation et la même mobilité électrophorétique que l'antitoxine non traitée. Sa teneur en polysaccharide a diminué. Cette antitoxine ainsi traitée a perdu beaucoup de sa spécificité pour le sérum de cheval. Elle peut être injectée aux cobayes sensibilisés au sérum de cheval sans l'apparence d'aucun symptôme anaphylactique. La molécule antitoxique, d'après ces auteurs, a été modifiée très peu mais suffisamment pour changer sa spécificité. KASS, SCHERAGO & WEAVER (33) montrent qu'une digestion avec la pepsine ou la takadiastase ou la diastase du malt conduit à des antitoxines diphtériques antigéniquement semblables. Ces trois enzymes peuvent purifier le plasma antitoxique et aussi rendre la molécule antitoxique résistante à la chaleur. Les auteurs pensent que le procédé de purification des antitoxines par les enzymes est essentiellement protéolytique. Donnons les caractéristiques de la digestion peptique effectuée: plasma antidiphtérique merthiolaté au 1/10.000 - dilué au 1/2 - 5 g de pepsine par litre de plasma - phénol 0,25% - pH 4,0 - 37° pendant 24 heures - chauffage 1 heure à 60° et pH 4,0.

Mais le traitement par la chaleur affecte le caractère antigénique des antitoxines digérées. Le tableau 1 emprunté à ces auteurs fera comprendre cette question assez complexe de l'antigénicité:

TABLEAU I
Caractères Antigéniques

Plasma utilisé pour sensibiliser les animaux	Réactions avec plasma				
	Normal non digéré non chauffé	Normal digéré non chauffé	Antitoxine digérée non chauffée	Antitoxine digérée non chauffée	Antitoxine digérée chauffée
Normal non digéré non chauffé	+	0	+	0	0
Normal digéré non chauffé	+	+	+	0	
Antitoxine non digérée non chauffée	+	0	+	0	0
Antitoxine digérée non chauffée	+	+	+	+	
Antitoxine digérée chauffée	+	0	+	0	+

La comparaison entre les propriétés immunologiques d'un sérum purifié par digestion et un sérum purifié par précipitation avec le sulfate d'ammonium a été faite par CHENNY & LAWRENCE-JONES (21). Le sérum purifié par digestion est absorbé plus rapidement, éliminé plus lentement et a un plus grand effet thérapeutique.

SANDOR, LEMETAYER & NICOL (22) montrent qu'il est possible qu'une différence puisse exister au point de vue thérapeutique entre les sérums bruts et les sérums purifiés. Les auteurs concluent à l'absence d'anticorps bactériens dans les sérums antidiptériques de cheval et ils concluent qu'en dehors de l'antitoxine les sérums

thérapeutiques de chevaux ne paraissent contenir aucun autre anticorps.

HARTLEY (23) indique qu'au cours de la digestion peptique il se produit une dénaturation avec conservation des propriétés antitoxiques, mais un changement de spécificité et une acquisition du caractère hétérologue même pour l'espèce qui a fourni le sérum.

VI - PURIFICATION PAR FRACTIONNEMENT PAR LES ALCOOLS A FROID.

Les méthodes modernes de fractionnement par l'éthanol à froid ont été appliquées, avec succès, pour la purification des sérums antitoxiques. Il ne nous est pas possible actuellement à l'Institut Razi d'appliquer ces méthodes: mais dès que la construction de la chambre froide à -5° sera terminée, les recherches seront orientées dans cette voie car, à notre avis, ce sont les méthodes d'avenir.

SMITH & GERLOUGH (88), en utilisant la méthode moderne de E. J. COHN et collaborateurs. (8) pour le fractionnement du plasma humain par l'éthanol à froid, ont isolé, à partir d'un plasma anti-tanique, trois composés: une gamma-globuline contenue dans la fraction II, une T-globuline contenue dans la fraction III, et une troisième fraction très importante contenue dans la fraction IV; par dialyse cette fraction beta-pseudoglobuline riche en activité antitoxique peut être séparée de la fraction alpha-globuline riche en lipides et dépourvue d'activité antitoxique. Les fractions gamma et T ont des différences dans leurs propriétés physiques: solubilité, point isoélectrique, mobilité électrophorétique, spectre d'absorption (SMITH & COY) (87) ainsi que dans leurs propriétés chimiques: acides aminés (SMITH, GREENE & BARTNER) (86) (SMITH & GREENE) (89). La précipitation spécifique n'a jamais été satisfaisante pour l'évaluation de la puissance des antitoxines. Les auteurs pensent que l'explication réside dans le fait que le sérum contient ces trois types de protéines distinctes associées à l'activité antitoxique et différentes dans leur capacité floculante. Il est de plus bien connu que la protection peut être conservée par des anticorps qui ne floculent plus (HORSEFALL & GOODNER) (30) (TYLER & SWINGLE) (95); ou qui ont un temps de floculation considérablement augmenté (KRUEGER & HEIDELBERGER) (40 bis).

GJESSING, LUDEWIG & CHANUTIN (19) HESS & DEUTSCH (29) ont indiqué que la séparation correcte de protéines bien définies, pour un animal donné, demande des conditions spécifiques et que la méthode décrite pour le plasma humain ne peut s'appliquer aux plasmas d'autres animaux sans modification. DEUTSCH & NICHOL (12) en appliquant une modification de la méthode de fractionnement à l'éthanol froid séparent les gamma-globulines en gamma 1-globulines et gamma 2-globulines. Le rendement de la précipitation des fractions antitoxiques

est très élevé. Il est donc possible en étudiant convenablement les facteurs d'un bon fractionnement d'obtenir un rendement pratiquement théorique. C'est ce qu'ont fait WITTLER & PILLEMER (104) en étudiant la précipitation de l'antitoxine tétanique par le méthanol à basse température. FOWELL & JOHNSON (16) ont également appliqué la méthode de fractionnement à l'éthanol aux plasmas antitoxiques digérés par la pepsine. Il est certain que la combinaison des méthodes de digestion enzymatique (et vraisemblablement avec un extrait pancréatique bien plus économique que la pepsine) et des méthodes de fractionnement par l'éthanol à froid permettront d'obtenir des sérums antitoxiques ayant des coefficients de purification et de concentration satisfaisants, mais avec un rendement beaucoup plus élevé que par les méthodes industrielles actuelles de digestion et thermo-coagulation.

VII - TRAVAUX MODERNES DE POPE.

Nous avons vu que non seulement la pepsine, mais aussi d'autres enzymes telles que la trypsinolysine, la trypsine, la papaïne, la diastase de *Aspergillus Oryzae*, la diastase du malt étaient capables de provoquer la scission de la molécule protéinique antitoxique et de rendre une des fractions résistante à la chaleur. Récemment POPE & STEVENS (72) ont publié des études complémentaires sur les enzymes qui ont la propriété de couper la molécule antitoxique. Ils confirment que l'action de la pepsine est bien optimum à pH 3,8 et 37° ou à pH 3,2 à une température plus basse. Un optimum semblable a été trouvé pour toutes les autres enzymes examinées. A partir du pancréas de bœuf ou de mouton ils préparent un extrait enzymatique, partiellement purifié, dont l'optimum d'action est aussi dans cette région de pH. La trypsine et la chymotrypsine cristallisées ont une faible activité à pH 3,8, due à la présence d'une autre enzyme contaminant ces enzymes cristallisées. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'enzyme nécessaire et responsable de la coupure de la molécule antitoxique appartient au groupe cathépsine et est présente dans toutes les enzymes examinées.

Dans un autre mémoire POPE et collaborateurs (71) montrent bien la complexité du problème. Par des expériences de diffusion à travers la gélatine ils prouvent que les filtrats de toxine diphtérique contiennent au moins 24 antigènes et que les antitoxines purifiées par digestion peptique contiennent les anticorps correspondants. La précipité spécifique résultant de l'action toxine-antitoxine ne consiste donc pas seulement en toxine et antitoxine, mais d'autres systèmes antigènes-anticorps précipitent également. Il en résulte que dans la méthode de coagulation de RAMON la précipitation simultanée de ces antigènes et anticorps peut produire une distorsion du maximum par rapport à ce qui que l'on obtiendrait avec la toxine pure et l'antitoxine correspondante.

Les dosages d'azote du flocculat ne permettent donc pas de connaître rigoureusement le degré de pureté soit de la toxine soit de l'antitoxine. Nous avons déjà vu que SMITH et collaborateurs (86 à 89) avaient isolé trois anticorps différents dans l'antitoxine diphtérique. Il est probable que des séparations de plus en plus fines permettront d'isoler encore d'autres fractions. Mais en ce qui nous concerne nous retiendrons seulement le fait que les sérums antitoxiques purifiés par digestion enzymatique contiennent bien cette multitude d'anticorps et que la purification ne diminue en rien les propriétés thérapeutiques de tels sérums.

•

TECHNIQUES INDUSTRIELLES.

Nous donnons, sous forme de schéma, les principales méthodes industrielles de purification des sérums antitoxiques dont nous avons eu connaissance :

I - TECHNIQUE DE HANSEN (26).

(Institut d'Etat des sérums de Copenhague).

1°) *Enlèvement de la fibrine et des facteurs antiprotéolytiques.*

Le sang est recueilli dans une solution tampon à pH 5,5, avec addition d'HCl et de bentonite à 2%. Pour chaque fraction de 8 litres de sang prélevé par cheval l'auteur ajoute 22 litres de solution tampon, 450 ml HCl N et 1280 ml de suspension de bentonite à 2%. La dilution initiale du sang est environ au 1/4.

— Après centrifugation la fibrine est éliminée et la dilution du sérum est environ 1/3,5.

— Une deuxième précipitation à la bentonite est effectuée pour enlever complètement la fibrine et surtout les facteurs antiprotéolytiques. La teneur en bentonite à ajouter est déterminée par un essai préalable.

2°) *Digestion peptique.*

Après filtration, la solution parfaitement claire est amenée à pH 3,2 par HCl N/2.

— Pepsine 2 unités U S P par ml de solution.

— Digestion à 20° pendant 18 heures. Après une heure de digestion le pH est réajusté à 3,2.

3°) *Adsorption sélective sur gel d'alumine.*

La digestion enzymatique terminée le pH est amené à 6,5 par addition de soude 0,8 N.

— La protéine non spécifique est ensuite adsorbée sur gel d'alumine. Filtration sur Scitz EK.

4°) *Ultrafiltration.*

Sous toluène sur bougies spéciales recouvertes de collodion (acétique 1%).

5°) *Précipitation des globulines spécifiques.*

Par le sulfate d'ammonium à 50 %.

— Filtration sur filtre-presse.

6°) *Dialyse.*

Dans des tubes de cellophane contre de l'eau courante pendant 72 heures.

7°) *Résultats obtenus.*

Le coefficient de concentration dépend du titre de départ, il est de l'ordre de 5.

— Rendement : 70 à 80 %.

— Electrophorèse : Un seul constituant protéinique de poids moléculaire 100.000.

II - TECHNIQUE DE G. AMOUREUX ET P. YEU (1).

(Institut Pasteur de Paris).

1°) *Digestion peptique.*

Dilution du sérum au 1/2.

— Addition de HCl dilué pour amener le pH à 3,2.

— Pepsine 1/1000, 3 g par litre de sérum.

— Température : 31°,5 : 30 minutes.

2°) *Thermo-coagulation sélective.*

Après la digestion ajouter 0,1% de toluène et 1% de sulfate d'ammonium.

— Le pH est amené à 4,25.

— Température : 53°,5-57° pour les sérums antidiptériques titrant 250 à 650 unités et 55°,5 pour les sérums antitétaniques titrant 0,5 à 100 unités.

— Durée : 1 heure.

3°) Séparation par filtration des protéines coagulées.

Sur filtre-pressé (12 toiles filtrantes, surface totale filtrante 4 m²).
— Lavage du précipité par une solution de sulfate d'ammonium 14‰.

4°) Chauffage à 68° et à pH 8,0 en présence de kaolin et charbon.

— Le filtrat est amené à pH 7,0.
— Addition de 5 pour 1000 de kaolin lavé, chauffage.
— Dès que la température a atteint 65° ajouter 5 pour 1000 de charbon végétal.
— Le pH est amené à 7,8 - 8,0 et la température est maintenue 30 minutes à 68°.
— Le liquide est filtré sur filtre-pressé (3 toiles).
— Le précipité est lavé avec du sulfate d'ammonium 14‰.

5°) Précipitation par le sulfate d'ammonium et filtration.

Addition de 18 à 20‰ de sulfate d'ammonium, le pH étant amené à 7,3. Après un repos de 1 à 2 heures filtration sur filtre-pressé (3 toiles).
— Dessiccation légère du précipité sous air comprimé.

6°) Dialyse.

Effectuée dans des sacs en cellophane avec agitation.
— Durée de la dialyse 30 heures environ.

7°) Filtration stérilisante.

Addition de 0,8‰ de NaCl.
— De 0,0045‰ de bicarbonate de sodium.
— De 0,3‰ de tricrésol.
— pH amené à 6,5.
— Le sérum purifié est chauffé à 54,5-55° pendant 1 heure 30; l'opalescence qui apparaît quelquefois est supprimée par action de gel de phosphate tricalcique à pH 7,7 - 7,8 et chauffage jusqu'à 50°.
— Filtration.

8°) Résultats obtenus.

8 à 11‰ de protéines pour les sérums antidiphthériques titrant 1000 u/ml.
— 5 à 8‰ de protéines pour les sérums antitétaniques titrant 1500 u/ml.
— Rendement : 50 à 55‰ pour les sérums antidiphthériques et de 40 à 45‰ pour les sérums antitétaniques.
— Electrophorèse : Une seule fraction.

III - TECHNIQUE ANGLAISE DE HARMS (27).

(Laboratoires Wellcome).

1°) *Traitement peptique.*

Dilution du plasma au 1/3.

- Addition de HCl dilué pour amener le pH à 3,2.
- Pepsine 1/2500, 5 g par litre de plasma.
- Température : 30°; 30 minutes.

2°) *Dénaturation thermique.*

Pendant le traitement peptique ajouter 0,1% de toluène (calculé sur le volume total).

- A la fin de la digestion ajouter 0,2% de pyrophosphate de sodium, puis lentement 13% de sulfate d'ammonium.
- Le pH doit être 4,3; chauffer à 55° aussi rapidement que possible et laisser 1 heure à cette température.

3°) *Filtration.*

Sur filtre-presse du liquide encore chaud (50°).

- Lavage du filtre avec une solution de sulfate d'ammonium à 14%.

4°) *Précipitation de la protéine antitoxique.*

Le pH est élevé jusqu'à 6,8 par addition de solution de pyrophosphate de sodium à 0,2%; la concentration en sulfate d'ammonium est amenée à 30% pour les plasmas de titre faible et à 32% pour les plasmas de titre élevé.

5°) *Filtration.*

Sur filtre-presse pour séparer la protéine spécifique. Le gâteau protéinique est desséché à l'air comprimé.

6°) *Dialyse.*

Dans des sacs de cellophane pour éliminer le sulfate d'ammonium.

- Après la dialyse l'extrait sec doit être de l'ordre de 20%, si le sérum est trop dilué on peut le concentrer par ultrafiltration.

7°) *Constitution du lot.*

Isotoniser avec du chlorure de sodium contenant 0,1% de bicarbonate de sodium. Addition de 0,35% tricrésol.

- Ajuster le pH entre 6,0 et 6,5.
- Stériliser sur bougies ou filtre Seitz.

8°) *Résultats obtenus.*

Coefficient de purification de l'ordre de 35.

- Rendement 65%.
- Titre maximum 100.000 u/g.

IV - TECHNIQUE AMÉRICAINE DE MICHIGAN (*). (Michigan State Laboratory of Health).

1°) *Digestion peptique.*

Dilution du plasma au 1/3; ajouter 0,8% de NaCl pour éviter la précipitation des protéines insolubles dans l'eau.

- Addition de HCl 10% pour amener le pH à 3,2.
- Pepsine Difco 1/10.000, 3,33 g par litre de mélange.
- Température : 23°,30 minutes.

2°) *Dénaturation thermique.*

Après la digestion ajuster le pH à 4,2 avec de la soude N. Ajouter 10% de sulfate d'ammonium et 0,2% de toluène. Amener à la température de 56° aussi rapidement que possible et maintenir cette température (54° - 56°) pendant 3 heures avec agitation continue.

3°) *Séparation par filtration des protéines coagulées.*

Sur filtre-presse lavage du précipité avec une solution de sulfate d'ammonium à 10%.

4°) *Première précipitation de l'antitoxine.*

Ajuster le pH à 6,8 par addition de soude N et addition de sulfate d'ammonium 26% (dans certains cas peut être amené à 32%).
— Filtrer sur filtre-presse.

5°) *Dialyse.*

Le précipité est mis dans des sacs de cellophane et dialysé contre l'eau courante pendant 48 heures.

- Recueillir le sérum et ajouter 0,5% de phénol (phénol dissout dans l'éther à parties égales).
- Dosage de l'extrait sec.

6°) *Dépigmentation par l'alun de potassium.*

Diluer le sérum dialysé pour avoir un extrait sec de 3%.

(*) L'un de nous H. M. C. remercie bien vivement les Docteurs G. D. COMMINGS, Directeur et H. D. ANDERSON, sous-Directeur, ainsi que Mme J. GLASSEN, Chef du Service de Production, de leur très cordiale hospitalité dans leur laboratoire du «Michigan Department of Health» et de nous avoir autorisé à publier leur technique de purification des plasmas antitoxiques.

- Ajouter 100 ml d'une solution d'alun à 2% par litre de solution.
- Ajuster le pH à 6,8 avec de la soude N et laisser reposer une nuit. Eliminer le précipité par filtration.

7°) *Deuxième précipitation de l'antitoxine.*

Mesurer le volume du filtrat et ajouter une solution saturée de sulfate d'ammonium pour amener la concentration à 37%. Laisser reposer une nuit à la température du laboratoire. Eliminer le précipité. Mesurer le volume du filtrat et ajouter une solution saturée de sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration de 50%.

- Agiter continuellement pendant 30 minutes.
- Ajouter ensuite une solution saturée de sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration de 55%.
- Laisser reposer une nuit à la température du laboratoire. Filtrer. Dessécher le gâteau des protéines antitoxiques à 37° et éliminer le plus possible de sulfate d'ammonium à la presse hydraulique.

8°) *Dialyse.*

Comme au paragraphe 5.

9°) *Constitution du lot.*

Ajuster le pH à 6,8.

- Phénoler pour que la concentration finale soit 0,5%.
- Dosage de l'extrait sec; diluer si nécessaire avec le NaCl 0,5% contenant 0,5% de phénol pour obtenir un extrait sec de 18%.
- Stériliser l'antitoxine par filtration.

♦♦

CHOIX DE LA TECHNIQUE ADOPTÉE EN IRAN.

Nous avons été guidé dans notre choix par l'idée directrice d'obtenir un sérum purifié répondant aux normes de la Pharmacie Internationale (62). Nous voulions avoir également un coefficient de purification le plus élevé possible tout en maintenant le rendement à un taux acceptable. De plus nous avons été limités dans notre choix par le manque de matériel et de produits chimiques convenables.

La méthode danoise, basée sur les principes de digestion et d'adsorption, nécessite une ultrafiltration qu'il ne nous est pas possible d'effectuer actuellement à l'Institut Bazi. Cependant cette méthode est

séduisante; car le rendement est très élevé et le coefficient de purification satisfaisant, (pour l'exemple du sérum antitétanique, cité par HANSEN (26) rendement : 85,3% : litre du sérum 208 u/mg. N).

La méthode française nécessite du charbon végétal pour la dépigmentation. Cette méthode n'a pu être appliquée avec succès, car le charbon dont nous disposons à l'Institut ne permet pas d'obtenir une bonne dépigmentation et le sérum obtenu était trop coloré.

Nous avons donc du surtout étudier les méthodes anglaise et américaine. Des petits lots de 15 litres de plasma ont été traités par les deux méthodes. Il serait trop long de relater les résultats expérimentaux obtenus, mais d'une façon générale les méthodes de digestion et de thermocoagulation américaine ou anglaise arrivent à peu près au même résultat (coefficient de purification, rendement). Mais si on continue la méthode américaine en pratiquant la technique de dépigmentation à l'alun décrite par WANSWORTHY (103) et perfectionnée par le «Biologic Products Section of the Michigan Department of Health» le sérum obtenu est bien moins coloré que par la méthode anglaise. Nous avons donc choisi la méthode américaine à peu près *in extenso*. Dans le but cependant d'économiser de la pepsine la digestion a été faite sur des plasmas dilués seulement au 1/2, la dénaturation thermique étant faite cependant après dilution au 1/3. De plus le manque de sulfate d'ammonium pur nous a obligé à utiliser un sulfate d'ammonium technique (pureté 98%) dont les résultats ont été identiques à ceux obtenus avec du sulfate d'ammonium plus pur. Nous avons vérifié que les sérums obtenus n'étaient pas pyrogènes malgré l'emploi de ce sulfate d'ammonium impur.

Voici donc la technique que nous pratiquons actuellement : (sous réserve de modifications ultérieures apportées par les recherches en cours).

I - TECHNIQUE POUR LA PURIFICATION DES PLASMAS ANTIDIPHTÉRIQUES.

Le matériel dont nous disposons actuellement nous permet de faire des lots de 4x15 litres de plasma. La digestion et la dénaturation thermique sont faites dans 2 cuves, en acier inoxydable, de 50 litres à double parois perméant, par une circulation d'eau froide ou chaude, de maintenir la température au degré voulu. Comme nous faisons un lot le matin et un lot l'après-midi nous pouvons traiter 60 litres de plasma. La digestion et la dénaturation thermique sont cependant faites sur 15 litres de plasma.

Pour constituer nos lots, nous groupons les plasmas antidiphthériques en trois catégories :

- 300 à 500 unités/ml
- 500 à 800 unités/ml
- 800 à 1000 unités/ml et plus.

Pour les plasmas antitétaniques nous faisons deux catégories :

- 200 à 500 unités/ml
- 500 à 1000 unités/ml

— Un lot de 60 litres de plasma est ainsi constitué, il est filtré sur plusieurs épaisseurs de gaze ce qui permet de diviser les gros amas de fibrine et d'en éliminer une petite partie. Un échantillon est prélevé pour le titrage de l'activité et dosage d'azote (sur le sérum). Nous versons dans chaque cuve 15 litres de plasma et ajoutons 15 litres d'eau du robinet (eau de forage profond très pure apyrogène portée à une température suffisante pour que le mélange soit aux environs de 23°.

1°) Digestion peptique.

Aux 30 litres de ce mélange nous ajoutons 0,2% de NaCl soit 240g. Le pH est ensuite amené à 3,2 par addition lente d'acide chlorhydrique à 10%; il est mesuré avec une électrode de verre et une électrode au calomel (KCl saturé). Un agitateur électrique est fixé sur la cuve, il est mis en marche pendant toutes les opérations de digestion et de denaturation thermique. Nous ajoutons ensuite 100g de pepsine Difco (1/10.000). La digestion est poursuivie pendant 30 minutes en maintenant la température à 23°.

2°) Thermocoagulation sélective.

Nous amenons le pH à 4,2 par addition de soude N et ajoutons 15 litres d'eau du robinet chaude (50°) dans lesquels nous avons mis dissoudre du sulfate d'ammonium pour amener la concentration à 10%, soit (en tenant compte du volume d'HCl et de NaOH ajoutés) 4 Kgs. 700. Nous versons dans la cuve 0,2% de toluène soit 91 ml. La température est déjà à 32° environ; nous l'amenons à 55-56° en 10-15 minutes par une circulation d'eau chaude à 70° et maintenons la température 3 heures à 55°. Les deux lots de 15 litres de plasma sont conduits parallèlement. Les 90 litres de préparation sont mis à filtrer à chaud sur un filtre-pressé (11 toiles, surface filtrante 3,4 m²). Au début de l'après-midi la filtration est terminée. Deux autres lots de 15 litres de plasma sont préparés et sont mis à filtrer sur le même filtre-pressé. A la fin de l'après-midi le filtre-pressé est lavé avec 20 litres d'une solution de sulfate d'ammonium à 10%. Nous avons alors environ 190 litres de solution parfaitement limpide; la filtration se fait toujours très bien à condition de respecter scrupuleusement les conditions expérimentales indiquées.

3°) Précipitation de l'antitoxine.

Le liquide est amené à pH 6,8 par addition de soude N. Nous ajoutons alors, en agitant continuellement, 26% de sulfate d'ammonium, soit environ 59 Kgs. (nous tenons compte du volume de soude ajouté pour lequel nous calculons 36% de sulfate d'ammonium). L'antitoxine précipite; après une nuit de repos nous filtrons sur un deuxième filtre-pressé (2 toiles, surface filtrante: 0,6 m². Nous laissons bien égoutter toute la nuit pour recueillir le précipité plus facilement; le gâteau de protéines est mis à dialyser contre de l'eau courante dans des sacs de cellophane (diamètre 1⁷/₈, Visking cellulose sausage casings).

4°) Dépigmentation.

Après 48 heures de dialyse nous déterminons l'extrait sec de la solution et diluons jusqu'à un extrait sec de 30%. Le titrage du sérum antitoxique à ce stade nous permet de connaître le rendement des opérations précédentes. Nous ajoutons alors lentement 100 ml par litre d'une solution d'alun à 2% et ajustons le pH à 6,8 par addition lente de soude N en agitant continuellement. La variation du pH étant à la fin brutale il y a lieu d'ajouter encore plus lentement la soude pour bien ajuster le pH à 6,8 (mesure électrométrique). Nous laissons déposer une nuit et décantons très facilement la solution le matin. Nous centrifugeons le fond de la cuve et éliminons le précipité.

5°) Deuxième précipitation de l'antitoxine.

La concentration de la solution est amenée à 37% en sulfate d'ammonium par l'addition d'un volume $V/1,7$ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (V étant le volume de la solution). Nous laissons précipiter une nuit, siphonnons la solution, centrifugeons le fond de la cuve, éliminons le précipité et notons le nouveau volume V' . La concentration en sulfate d'ammonium est alors amenée à 50% par addition de $0,26 V'$ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le nouveau volume est alors V'' . Après 30 minutes d'agitation nous amenons la concentration à 55% par l'addition de $V''/9$ d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Nous laissons une nuit au repos, décantons la plus grande partie du liquide et filtrons le reste sur toiles. Le précipité est mis à égoutter et à dessécher pendant deux jours à 37°. Le gâteau protéinique est ensuite pressé entre les toiles à 1.000 Kgs/cm² environ de pression. La dialyse de ce précipité est effectuée, comme la première fois, dans des sacs en cellophane et contre de l'eau courante. Au bout de 48 heures la dialyse est terminée (test au Nessler négatif) et le sérum ainsi purifié est prêt pour le contrôle.

II - TECHNIQUE POUR LA PURIFICATION DES PLASMAS ANTITÉTANQUES.

La technique employée pour les plasmas antitétaniques diffère en deux points de celle des plasmas antidiphthériques.

1. Avant la digestion le plasma est dilué au 1/2 et nous ajoutons le NaCl. Nous amenons le pH à 4,2 par addition d'une solution d'HCl à 10% et nous laissons une nuit à 37°. Le lendemain la digestion, la thermocoagulation sélective et la précipitation de l'antitoxine est conduite comme pour les plasmas antidiphthériques.

2. Pour la dépigmentation nous versons 100 ml par litre d'une solution d'alun à 4% (au tiers de 2% pour le plasma antidiphthérique) et le reste de la technique est sans changement.

..

CONTROLES ET NORMES DES SÉRUMS ANTITOXIQUES PURIFIÉS.

Lorsque la deuxième dialyse des sérums purifiés est terminée, c'est-à-dire lorsque la recherche du sulfate d'ammonium est négative, on ajoute du phénol en quantité suffisante pour porter la concentration à 0,5%. Un dosage de phénol est effectué sur le sérum sortant de la dialyse par la méthode colorimétrique à la p-nitroaniline de THEIS & BENEDICT (94). Il est en effet indispensable que la teneur en phénol ne dépasse pas 0,5%.

Le sérum est ensuite isotonisé par addition de 40 ml par litre d'une solution stérile de chlorure de sodium à 20% contenant 0,1% de bicarbonate de sodium.

Le pH du sérum est ensuite ajusté à 6,5; un extrait sec est ensuite déterminé sur 1 ml de sérum par dessiccation dans le vide poussé jusqu'à poids constant. L'extrait sec ne doit pas dépasser 20%; s'il en était ainsi on diluerait le sérum, pour le ramener à un extrait sec d'environ 18%, avec une solution de NaCl à 0,5% contenant 0,5% de phénol.

Le sérum d'abord clarifié sur Seitz K et stérilisé sur Seitz MK est soumis ensuite à divers contrôles :

1°) *Titrage.* (62)

Le sérum antidiphthérique est titré par la méthode de flocculation de RAMON et par intradermoréaction chez le cobaye (Lr/100): Le

sérum antitétanique également par floculation et par la méthode d'HERBLICH.

2°) *Concentration minimum permise.*

Les pharmacopées divergent sur ce point et le tableau II résumera les divers normes minima adoptées.

TABLEAU II

	Pharmacopées :			
	Américaine 1950	Anglaise 1948	Française 1949	Internationale 1951
Sérum antidiphtérique purifié	500 u/ml	500 u/ml	300 u/ml	3.000 u/ml
Sérum antitétanique purifié	400 u/ml		300 u/ml	
a) usage prophylactique		1.000 u/ml		3.000 u/ml
b) usage thérapeutique		5.000 u/ml		6.000 u/ml

La pharmacopée internationale nous paraissant beaucoup plus adaptée aux résultats obtenus par purification enzymatique et thermocoagulation nous avons adopté ces normes pour l'Institut Razi. Il est bien entendu que ces normes s'entendent pour un sérum ayant un extrait sec de 18%.

3°) *Dosage de l'azote total.*

Il est pratique sur 1 ml de sérum dilué au 1/10 avec de l'eau physiologique préparée avec de l'eau distillée privée d'ammoniaque et avec du chlorure de sodium pur. Après destruction sulfurique, la distillation est faite dans l'appareil de PARNAS & WAGNER et le titrage avec une solution d'acide sulfurique N/70.

Le dosage d'azote est effectué sur le sérum brut et purifié. On peut ainsi calculer le nombre d'unités par mg. d'azote du sérum brut et purifié et ainsi connaître les coefficients de purification et de concentration du sérum purifié.

$$\text{Coefficient de purification} = \frac{\text{unités / mg N sérum purifié}}{\text{unités / mg N sérum brut}}$$

$$\text{Coefficient de concentration} = \frac{\text{unités / ml sérum purifié}}{\text{unités / ml sérum brut}}$$

4°) Contrôle d'innocuité. (62)

On injecte sous la peau de deux souris blanches et de deux cobayes 0,5 ml et 5 ml du sérum à tester. Ces animaux restent 5 jours sous contrôle et ne doivent présenter aucun signe.

5°) Contrôle de stérilité. (62)

Avant la mise en ampoules ainsi qu'après la répartition on ensemente le sérum dans les milieux usuels en aéro-anaérobiose. Les cultures conservées 10 jours à 37° doivent rester absolument stériles.

6°) Contrôle de non pyrogénicité. (65)

De toutes les pharmacopées consultées (62 à 65) seule la pharmacopée américaine indique ce test (p. 741) pour les sérums. Nous résumons les précautions à prendre et le mode opératoire à suivre pour obtenir une bonne vérification de la non pyrogénicité des sérums purifiés.

Employer des lapins en bonne santé pesant 1500 g. au moins (*) qui ont été maintenus au minimum une semaine dans des conditions normales sans perte de poids. Utiliser un thermomètre clinique rectal précis et déterminer le temps nécessaire pour qu'il atteigne son maximum. Ne pas employer de lapins qui ont été déjà utilisés pour des précédents tests pyrogéniques à moins d'un repos de 48 heures. Les animaux sont placés dans des cages individuelles, au calme et dans une pièce à température constante pendant au moins 48 heures avant le test. Les températures sont prises la veille du test et on utilise seulement les animaux qui ont une température comprise entre 39,0° et 39,8°. Le sérum antitoxique est chauffé à 37° et une injection intraveineuse de 3 ml par kg. de lapin (53) est faite dans la veine de l'oreille. Prendre la température 1 heure après l'injection et toutes les heures jusqu'à 3 heures après l'injection. Les seringues et les aiguilles utilisées doivent être rendues apyrogènes par chauffage au four à 250° pendant 30 minutes. Trois lapins sont utilisés pour chaque test et celui-ci est considéré comme positif si 2 ou 3 animaux montrent une élévation de température de 1,1° au dessus de la température normale établie pour chaque animal (53).

Si le test est positif on peut laisser vieillir le sérum puis le filtrer sur amiante ou le traiter au décalso (20) suivi d'une filtration sur filtre Seitz Republic S-6 pour le rendre apyrogène.

(*) La race des lapins en Iran étant plus petite, nous avons abaissé cette limite à 1200 g.

Bien que ce test ne soit pas imposé par la pharmacopée internationale, nous vérifions à l'Institut Razi la non pyrogénicité de nos sérums antitoxiques.

A titre d'exemple nous donnons le schéma d'une expérience pour l'antitoxine tétanique n° 31-5; ce sérum est apyrogène (tableau III).

TABLEAU III

Lapins n°	Poids en g.	ml injectés	Température en degrés centigrades					
			Avant injec- tion	1 h. après	2 h. après	3 h. après	Eléva- tion	Baisse
44 bis	1200	3,6	39,5	39,1	39,00	39,2	-	0,5
34 bis	1360	4,0	38,7	40,0	39,5	39,6	0,3	-
39 bis	1400	4,2	39,5	40,2	39,5	39,4	0,7	-

7°) Conservation des sérums :

Le nombre d'unités internationales mises dans chaque ampoule est majoré de 20 % pour une validité de deux ans. Les sérums sont conservés le plus possible à basse température; mais en attendant les chambres froides à + 4° nécessaires pour le stockage rationnel des sérums et en tenant compte que la température, en été, peut atteindre 20° dans les sous-sols où sont entreposés les sérums, nous avons majoré de 20 % le titre indiqué sur les ampoules pour être certain qu'à la fin de la période d'utilisation le nombre d'unités indiqué sur l'étiquette soit encore exact.

8°) Résultats obtenus :

Le tableau IV suivant résume les résultats que nous obtenons par cette méthode de purification.

Nous faisons remarquer que nos sérums sont de titre élevé. Ce résultat est obtenu parce que le gâteau de protéines est débarrassé par pression du maximum de sulfate d'ammonium, avant la deuxième dialyse. La perte en unités antitoxiques due à cette pression est minime et le gros avantage est d'obtenir des sérums très concentrés sans avoir besoin de faire une ultrafiltration.

Au point de vue purification cette méthode donne d'excellents résultats, puisque le nombre d'unités par mg. d'azote varie de 150 à 350.

La coloration du sérum purifié est très faible, ceci est dû à

la méthode de dépigmentation à l'alun qui est excellente.

Les résultats du tableau IV vérifient que les sérums de titre élevé permettent d'obtenir une purification plus élevée.

TABLEAU IV

	Sérums antidiphthériques				Sérums antitétaniques	
	A	B	C	D	A	B
<i>Sérum brut</i>						
unités / ml	375	490	700	885	585	400
mg. N / ml	12,80	12,40	12,32	11,35	12,84	12,8
unités / mg. N	30	35	57	"	45,5	55,3
<i>Sérum purifié</i>						
unités / ml	3.200	2.200	4.900	4.500	3.200	4.600
mg. N / ml	20,76	12,70	18,94	13,24	11,30	22,6
unités / mg. N	154	173	253	340	283	200
Extrait sec %	15	11,7	14	10	10	15
coefficient de purification	5	4,9	4,5	4,35	6,2	5,2
coefficient de concentration	8,5	5	7	5	5,5	9,3

Le rendement varie selon les sérums, en général il oscille entre 50 et 60 %.

Le coefficient de purification et le rendement sont fonction de la méthode employée pour l'immunisation des chevaux.

RÉSUMÉ

Nous avons décrit les diverses étapes de la purification des plasmas antitoxiques. Parmi les techniques qu'il nous est possible d'appliquer en Iran, nous avons choisi, avec peu de modification, la méthode américaine de Michigan.

*Institut d'Etat des Sérums et Vaccins,
Institut Bach, Jassarik, Iran*

BIBLIOGRAPHIE

1. G. Amoureux & F. Yeu — *Ann. Inst. Pasteur.* 1951, *80*, 165-174.
2. Aronson — *Berl. Klin. Wschr.* 1893, *30*, 625.
3. Berg & Kelsner — *J. Agric. Res.* 1918, *13*, 471-495.
4. Berg — *J. A. M. A.* 1921, *76*, 1820.
5. Bridgman — *J. Am. Chem. Soc.* 1946, *68*, 857-861.
6. Coghill & Creighton — *J. Immunol.* 1938, *35*, 477-485.
7. Coghill, Fell, Creighton & Brown — *J. Immunol.* 1940, *39*, 207-222.
8. E. J. Cohn & all. — *J. Am. Chem. Soc.* 1946, *68*, 459.
9. Melvin Cohn & A. M. Pappenheimer — *J. Immunol.* 1949, *63*, 291-312.
10. Deutsch, Petermann & Williams — *J. Biol. Chem.* 1946, *164*, 95-107.
11. Deutsch, Gortling, Alberty & Williams — *J. Biol. Chem.* 1946, *164*, 109-111.
12. Deutsch & Nichol — *J. Biol. Chem.* 1948, *176*, 797-812.
13. Eisler & Spiegel-Adolf — *Biochem. Z.* 1929, *204*, 28
14. Fell, Stern & Coghill — *J. Immunol.* 1940, *39*, 223-246.
15. Foder, Bernfeld & Schonfeld — *Koll. Zschr.* 1925, *37*, 32 & 159.
16. Fowell & Johnson — *J. Amer. Pharm. Ass.* 1948, *37*, 65.
17. Frankel — *Proc. Roy. Soc. Série B.* 1932, *111*, 165.
18. T. D. Gerlough — *U. S. Patent n° 2.368.464 (1945).*
19. Gjessing, Ludewig & Chenuin — *J. Biol. Chem.* 1947, *170*, 551-569.
20. A. Glaubiger — *J. Lab. Clin. Med.* 1948, *33*, 757-767.
21. Glenny & Llewellyn-Jones — *J. Path. & Bact.* 1938, *47*, 405.
22. A. Hansen — *C. R. Soc. Biol.* 1931, *108*, 570-572.
23. A. Hansen — *C. R. Soc. Biol.* 1938, *129*, 213-215.
24. A. Hansen — *Biochem. Z.* 1938, *299*, 363.
25. A. Hansen — Thèse Copenhague 1941.
26. A. Hansen — *Acta Path. Microb. Scand.* 1948, *25*, 460-484.
27. A. J. Harms — *Biochem. J.* 1948, *42*, 390-397.
28. Hartley — *Proc. Roy. Soc. Série B.* 1951, *138*, 499-513.
29. Hess & Deutsch — *J. Am. Chem. Soc.* 1948, *70*, 84.
30. Horsfall & Goodner — *J. Exp. Med.* 1935, *62*, 485.
31. O. Imray — 1903. British Patent n° 18.340.
32. Kabat — *J. Immunol.* 1943, *47*, 513-587.
33. Kass, Scherago & Weaver — *J. Immunol.* 1942, *45*, 87-103.
34. Kekwick & Record — *Brit. J. Exp. Path.* 1941, *22*, 29-44.
35. Kleczkowski — *Brit. J. Exp. Path.* 1941, *22*, 188-192.
36. Kleczkowski — *Biochem. J.* 1943, *37*, 36.
37. Kligler & Olitzki — *Brit. J. Exp. Path.* 1931, *12*, 172.
38. D. Von. Klobusitzky — *J. Immunol.* 1938, *35*, 329-334.
39. L. E. Krejci, L. D. Smith & Dietz — *J. Franklin Inst.* 1941, *231*, 396-405
40. Krejci, Gennings & Smith — *J. Immunol.* 1942, *45*, 105-122.

- 40^{bis}. Krueger & Heidelberger — J. Exp. Med. 1950, *92*, 383-391.
41. Laboratoires Lederle — J. A. M. A. 1935, *105*, 883 & 1606.
42. L. Levine — Brit. J. Exp. Path. 1952, *33*, 190-195.
43. Marschall & Welker — J. Am. Chem. Soc. 1913, *35*, 825.
44. J. Mellanby — Proc. Roy. Soc. Série B. 1908, *80*, 399-413.
45. F. Modern & G. Ruff — C. R. Soc. Biol. 1938, *129*, 851-854.
46. F. Modern & G. Ruff — Biochem. Z. 1938, *299*, 377.
47. F. Modern & G. Ruff — C. R. Soc. Biol. 1940, *133*, 158 & 159-160.
48. F. Modern & G. Ruff — C. R. Soc. Biol. 1940, *134*, 290-292 & 485-486.
49. F. Modern & G. Ruff — Biochem. Z. 1940, *305*, 405-417.
50. F. Modern & G. Ruff — Biochem. Z. 1942, *311*, 188.
51. J. R. Moersch — C. R. Soc. Biol. 1931, *108*, 549-552.
52. P. P. Mordick — J. Immunol. 1929, *17*, 269-272.
53. National Institute of Health Bethesda (U. S. A.) 1946. Minimum requirement for diphtheria and tetanus antitoxins.
54. I. H. Northrop — J. Gen. Physiol. 1942, *25*, 465.
55. Northrop, Kunitz & Herriott — Crystalline Enzymes—2ème édition, 1948, p. 286.
56. Pappenheimer & Robinson — J. Immunol. 1937, *32*, 291-300.
57. A. M. Pappenheimer, Lundgren & Williams — J. Exp. Med. 1940, *71*, 247-262.
58. I. A. Parfentjev — U. S. Patent n° 2.065.196 (22 décembre 1936) dans Chem. Abst. 20 février 1937. U. S. Patent n° 2.123.198 (1938) & n° 2.175.090 (1939).
59. Petermann & Pappenheimer — J. Phys. Chem. 1941, *45*, 1-9.
60. Petermann — J. Biol. Chem. 1942, *144*, 607-616.
61. Petermann — J. Phys. Chem. 1942, *46*, 183.
62. Pharmacopœa Internationalis — 1951, *1*, 203-209-210-323-333-355-356.
63. Pharmacopœe Anglaise — 1948, 69-72-829-832.
64. Pharmacopœe Française — VIIème édition, 1949, 737-743.
65. Pharmacopœia U. S. A. (U. S. P. XIV) 199-610-744-758.
66. E. P. Pick — Beitr. Z. Chem. Physiol. u. Path. 1902, *1*, 351-362.
67. C. G. Pope — Brit. J. Exp. Path. 1938, *19*, 245-251.
68. C. G. Pope — Brit. J. Exp. Path. 1939, *20*, 132-149.
69. C. G. Pope — Brit. J. Exp. Path. 1939, *20*, 201-212.
70. C. G. Pope & M. Healey — Brit. J. Exp. Path. 1939, *20*, 213-216.
71. C. G. Pope, M. F. Stevens, E. A. Caspary & E. L. Fenton — Brit. J. Exp. Path. 1951, *32*, 246-258.
72. C. G. Pope & M. F. Stevens — Brit. J. Exp. Path. 1951, *32*, 304-324.
73. G. Ramon — C. R. Soc. Biol. 1922, *86*, 661-711-813 & Ann. Inst. Pasteur 1923, *37*, 1001.
74. Rosenheim — Biochem. J. 1937, *31*, 54-71.
75. Rothen — J. Gen. Physiol. 1942, *25*, 487.
76. G. Sandor — C. R. Soc. Biol. 1939, *130*, 840-843.

77. G. Sandor — C. R. Soc. Biol. 1939, *130*, 1187-1189.
78. G. Sandor — C. R. Soc. Biol. 1939, *131*, 49-51.
79. G. Sandor & R. Richou — C. R. Soc. Biol. 1939, *131*, 461-464.
80. G. Sandor — C. R. Soc. Biol. 1939, *131*, 1224-1227.
81. G. Sandor — Bull. Soc. Chim. Biol. 1940, *22*, 129-148.
82. G. Sandor — Bull. Soc. Chim. Biol. 1942, *24*, 1174-1178.
83. G. Sandor — Rev. Immunol. 1946, *10*, 148-157.
84. G. Sandor, E. Lemetayer & Nicol — Bull. Acad. Méd. 1949, *133*, 175-176.
85. A. A. Schmidt & W. Tuljshinskaya — Z. f. immunitätsf. u. Exp. Ther. 1931, *32*, *73*, 312.
86. E. L. Smith, Greene & Bariner — J. Biol. Chem. 1946, *164*, 359.
87. E. L. Smith & Coy — J. Biol. Chem. 1946, *164*, 367.
88. E. L. Smith & Gerlough — J. Biol. Chem. 1947, *167*, 679-687.
89. E. L. Smith & Greene — J. Biol. Chem. 1947, *171*, 355-362.
90. W. E. Smith & R. B. Pennell — J. Bact. 1947, *54*, 715-718.
91. Sternberger & Pressman — J. Immunol. 1950, *35*, 65-73.
92. Sternberger & Petermann — J. Immunol. 1951, *67*, 207-212.
93. Tashman & Pondman — Z. f. immunitätsf. 1931, *77*, 255.
94. Theis & Benedict — J. Biol. Chem. 1924, *61*, 67.
95. Tyler & Swingle — J. Immunol. 1945, *51*, 339-347.
96. Van Der Scheer & Wyckoff — Science. 1940, *91*, 485.
97. Van Der Scheer & Wyckoff — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 1940, *43*, 427-428.
98. Van Der Scheer, Wyckoff & Clarke — J. Immunol. 1940, *39*, 65-71.
99. Van Der Scheer & Wyckoff — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 1940, *45*, 634-636.
100. Van Der Scheer, Wyckoff & Clarke — J. Immunol. 1941, *40*, 39-45.
101. Van Der Scheer, Wyckoff & Clarke — J. Immunol. 1941, *40*, 173-177.
104. Van Der Scheer, Wyckoff & Clarke — J. Immunol. 1941, *41*, 349-360.
103. Wadsworth — Standard Methods of the New York State Department of Health, 3ème édition, 1947, p. 725.
104. Wittler & Pillemer — J. Immunol. 1949, *62*, 463-476.
105. A. J. Weil, I. A. Parfentjev & K. L. Bowman — J. Immunol. 1938, *35*, 399-411.