

LA CRYO-DÉNATURATION SÉLECTIVE :
MÉTHODE DE PURIFICATION DES ANATOXINES TÉTANIQUES.

par

JEAN-LOUIS DELSAL et H. MIR CHAMSY *

Par congélation et décongélation des anatoxines tétaniques après précipitation par l'acide trichloracétique à pH 4,0, il est possible d'insolubiliser une grande partie des protéines non spécifiques et d'obtenir des anatoxines concentrées, hautement purifiées.

La toxine tétanique est préparée sur milieu de Mueller et Miller (1) avec la souche R (I. P. Paris); 5 jours à 35° (2). Après détoxification l'anatoxine a les caractéristiques suivantes: unités floculantes par ml ($Lf/ml=30$); temps de floculation (Kf) = 4 h 30; mg azote total/ml: 2,10; azote protéinique/ml: 32 μ g; Lf/mg azote protéinique: 9,35.

La précipitation de cette anatoxine par l'acide trichloracétique (3) à + 4° est maximum à pH 4,0. Le rendement est de l'ordre de 95-98 %. Après lavages du précipité par de l'eau physiologique à + 4°, celui-ci se dissout intégralement dans un tampon phosphaté sodique M/300 de pH 6,8. Le pigment colore la solution en noir. L'anatoxine obtenue a une pureté de l'ordre de 1700 Lf/mg azote protéinique.

Si, après avoir précipité l'anatoxine tétanique par l'acide trichloracétique à pH 4,0, on congèle la solution et le précipité à - 10°, - 15° pendant quelques heures et si on laisse décongeler la solution, le précipité recueilli par centrifugation ne se redissout plus complètement dans le tampon phosphaté de pH 6,8. Une grande partie du pigment noir et des protéines non spécifiques est insolubilisée. Après

* C. R. Ac. Sc. 239, 1954, 600-602

lavages de ce précipité par de l'eau physiologique, il est possible d'effectuer un ou deux lavages, à + 4°, avec une solution phosphatée sodique de pH 5,0 et de force ionique 0, 1, sans abaisser le rendement, tout en augmentant encore la pureté de l'anatoxine tétanique.

Avec l'anatoxine tétanique brute précédente on obtient ainsi une anatoxine purifiée (concentrée 4 fois) titrant Lf/ml : 114; Kf : 2 h; azote protéinique/ml : 41, 4 µg. Lf/ml azote protéinique 2750; rendement: 95 %. Le Kf pour cette anatoxine, titrée à 28,5 Lf/ml, est de 3 h; il est donc diminué par rapport au Kf de l'anatoxine brute. A cette température (— 10°) il n'y a pas de dénaturation de la protéine spécifique, mais insolubilisation, à pH 6, 8, des protéines non spécifiques et du pigment noir.

La pureté de l'anatoxine est supérieure à celle obtenue par précipitation par le sulfate d'ammonium (4). Elle est identique (2800 Lf/mg azote protéinique maximum) à celle obtenue par ultrafiltration sur papier Schleicher et Schuell n° 725, imprégné de parlodion acétique à 4 % (5).

Si au lieu du milieu de Mueller et Miller, on emploie le bouillon VF (6) et la souche R, la pureté initiale de l'anatoxine tétanique est plus faible, de l'ordre de 150-200 Lf/mg azote protéinique. L'anatoxine purifiée par cette méthode titre 1800-2000 Lf/mg azote protéinique; le rendement est de 75-85 %.

On peut appliquer cette méthode de purification en remplaçant l'acide trichloracétique par le mélange hexamétophosphate de sodium-acide sulfurique. Le rendement et la pureté sont identiques. Raynaud, Turpin et Nicol (7) dans leur application de la méthode de Jacobs (8) pour la purification des toxines et anatoxines empêchent la congélation à — 15° par addition de 250 grammes par litre de Na Cl. Pour la purification de l'anatoxine tétanique il est préférable de ne pas empêcher cette congélation; la pureté de l'anatoxine est ainsi considérablement augmentée et la dépigmentation très prononcée. Nous n'avons pas contrôlé si ces anatoxines, purifiées par cette méthode et très concentrées, présentaient une légère toxicité (9).

Cette méthode appliquée à l'anatoxine diphtérique ne nous a pas permis, jusqu'à maintenant, d'insolubiliser une partie des protéines non spécifiques. Le précipité, lavé à l'eau physiologique, se dissout complètement même dans un tampon de pH 6, 0. Faisons cependant remarquer que : si l'anatoxine diphtérique est précipitée à + 4° par l'acide trichloracétique à pH 4, 0 et si les lavages du précipité par l'eau physiologique, indispensables pour éliminer complètement les réactions locales du vaccin, sont faits à + 4°, le Kf de

l'anatoxine purifiée n'est nullement augmenté. Ceci, en contradiction avec Linggood (10), est valable si la toxine diphtérique a été préparée soit sur milieu de Mueller et Miller (11), soit sur milieu de Pope (12); modifié par Linggood et Fenton (13) I. F. Scheibel (14).

BIBLIOGRAPHIE

1. *Modifications dactylographiées*, 1951. Department of Health, Albany, U. S. A.
2. Mueller et Miller, *J. Bact.*, 55, 1948, p. 421.
3. Boivin et Izard. *C. R. Soc. Biol.*, 124, 1937, p. 25.
4. Levine et Stone, *J. Immunol.*, 67, 1951, p. 325.
5. *Annual Report of the Division of laboratories and research.*, Albany, 1952, p. 48.
6. Turpin, Raynaud et Rouyer, *Ann. Institut Pasteur*, 82, 1952, p. 299.
7. *Comptes rendus*, 236, 1953, p. 2122.
8. Jacobs et Jacobs-Gillis, *J. Amer. Pharm. Assoc. Scient.*, 40, 1951 p. 488.
9. Raynaud, Turpin et Lemétayer, *Ann. Institut Pasteur*, 85, 1953, p. 376.
10. Linggood, *Brit. J. Exp. Path.*, P. 1941, p. 255.
11. Mueller et Miller, *J. Immunol.*, 40, 1941, p. 21.
12. Pope et Smith, *J. Path. Bact.*, 35, 1932, p. 573; Pope et Linggood, *Brit. Exp. Path.*, 20, 1939, p. 297.
13. Linggood et Fenton, *Brit. J. Exp. Path.*, 28, 1947, p. 354.
14. W. H. O. *Technical Report*. n° 61, 1953, p. 57.