

571
134

ETUDE SUR LA DIGESTION PANCREATIQUE DE LA CASEINE POUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE TETANIQUE (1)

par M. AGHDACHI, A. SADEGH et H. MIRCHAMSY.

La préparation de la toxine tétanique pour la vaccination de l'homme se fait, dans la plupart des laboratoires du monde, au moyen du milieu décrit par Mueller et Miller [5 à 8]. La substance de base pour la fabrication de ce milieu est un hydrolysate enzymatique de caséine, que l'on trouve dans le commerce sous le nom de N.Z. case (Sheffield Farms Co. Inc). Nous avons cherché à remplacer ce produit par son équivalent préparé d'une manière simple.

Nous allons décrire la technique de la production du milieu et les résultats obtenus. L'étude des variations apportées à la formule originale de Mueller et le rôle des inhibiteurs dans ce milieu feront l'objet d'une autre note.

Matériel et méthodes. — *Extrait pancréatique.* — A 1 000 g de tissu pancréatique de bœuf bien dégraissé et haché on ajoute 3 litres d'eau distillée et 750 ml d'alcool éthylique à 96°. Le mélange est fortement agité et conservé à + 4° C jusqu'à l'utilisation. On peut conserver ce mélange plusieurs mois à basse température.

Digestion de la caséine. — On applique en principe la technique de Gladstone et Fildes [1]. Les irrégularités du résultat, les contaminations successives et d'autres difficultés nous ont incités à adopter la formule suivante:

Caséine (B.D.H.)	1000 g
Carbonate de soude anhydre	60 g
Extrait pancréatique	500 ml
Eau distillée	10 l

1— Ann. Inst. Past. 1960, 98, 316-320

On dissout le carbonate dans 5 litres d'eau distillée que l'on chauffe à 60° C. La caséine est lentement ajoutée à l'eau carbonatée chaude, afin de former une émulsion homogène. On y ajoute ensuite 5 litres d'eau distillée et l'extrait pancréatique. La température tombe ainsi à 30-40° C. Le mélange est distribué dans des flacons de 5 litres, à raison de 4 litres par flacon. On ajoute finalement 100 ml de chloroforme à chaque flacon. Le pH de départ étant 9,0 tombe après quelques heures de digestion à 7,4 et reste stationnaire. Les polypeptides et les acides aminés sont graduellement libérés dans le mélange pour arriver, vers le sixième jour, à un taux maximum qui ne varie que peu dans les jours suivants. Ces variations sont groupées dans le tableau I.

Tableau I. — Variations du PH, N total et aminé, au cours de la digestion pancréatique de la caséine.

Temps	p H	N. aminé	N T
0 Heure	9,4		
2 "	8,5		
12 "	7,45		
1 jour	7,45	3,8	11,7
2 "	7,4	4,25	12,3
3 "	7,4	4,7	12,4
4 "	7,4	4,9	12,7
5 "	7,4	5,09	12,75
6 "	7,4	5,18	12,6
7 "	7,4	5,15	12,65
8 "	7,4	5,2	12,7
9 "	7,4	5,2	12,6
10 "	7,4	5,25	12,6

A ce stade on sépare le liquide clair par siphonnage du précipité et du chloroforme renfermant les lipides, nuisibles à la toxogénèse. Ce liquide sera porté à 90° C, puis refroidi à 30° C; on ajuste le pH à 6,0 avec HCl concentré. On ajoute ensuite 20 g par litre de charbon animal (Darco 60). On agite le mélange qui reste ensuite trente minutes au repos. On le filtre d'abord sur des filtres Büchner, puis sur des plaques stérilisantes de Seitz. Cette digestion est prête à l'emploi.

Titration de l'azote total non protéique. — A 5 ml de l'hydrolysate on ajoute 5 ml d'une solution à 20 p. 100 d'acide trichloracétique. On centrifuge. On prélève 0,5 ml du liquide surnageant pour le titrage de l'azote par la méthode du micro-Kjeldahl.

Titration d'azote aminé. — L'azote titrable par le formol est mesuré par la méthode de Sørensen.

Préparation du milieu. — La formule utilisée est celle de Mueller et Miller (1954) de composition suivante :

Hydrolysate pancréatique de caséine	225	ml
Macération de cœur de bœuf	50	ml
Glucose	11	g
NaCl	2,5	g
Na ₂ HPO ₄ , 7 H ₂ O	1,5	g
KH ₂ PO ₄	0,15	g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,15	g
L-cystine	0,15	g
L-tyrosine	0,5	g
Pantothénate de Ca	0,001	g
Uracile	0,0025	g
Chlorhydrate de thiamine	0,00025	g
Riboflavine	0,00025	g
Pyridoxine	0,00025	g
Biotine	0,0000025	g
Fer réduit	0,15	g
Eau distillée jusqu'à	11	

On prépare des lots de 100 litres que l'on répartit dans des cylindres en pyrex de 22 × 45 cm (9 litres par cylindre) ou 22 × 25 cm (4 litres par cylindre). On stérilise les cylindres contenant le milieu et couverts par des couches de gaze et de coton à 115° C pendant soixante minutes.

On refroidit les cylindres et on ensemence avec une culture de vingtquatre heures en milieu au thioglycolate, de *Pl. tetani* souche Harvard. On retire les cultures incubées cinq jours à 33° C pour contrôler la stérilité, la toxicité sur souris, le pouvoir flocculant et finalement la pureté, exprimée en nombres de Lf par mg d'azote protéinique.

Les résultats sont exposés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Comparaison entre les toxines tétaniques à base de digestion pancréatique préparée au Laboratoire (D.P.) et N.Z. case peptone (N.Z).

L o t	Lf / ml	Kf / min	D.M.M. / ml	Lf / mg. N . P
			souris blanche	
D. P. 1	43,5	5	30×10^6	860
D. P. 8	62,5	4	15×10^6	700
D. P. 9	50	5	5×10^6	450
D. P. 10	53	5	90×10^6	550
D. P. 11	47,5	4	5×10^6	540
N. Z. 52	50	5	30×10^6	750
N. Z. 53	32,5	8	25×10^6	850
N. Z. 54	37,5	7	10×10^6	350

Préparation de l'anatoxine. — Afin d'extraire la toxine endocellulaire, les cultures sorties de l'étuve sont soumises à la congélation-décongélation [4].

On y ajoute enfin 0,4 p. 100 de formol à 40 p. 100 et l'on conserve trois semaines à 37° C. On éprouve ensuite l'innocuité des préparations sur souris (0,5 ml par voie sous-cutané) et sur cobayes (2 ml par voie intramusculaire). On emploie pour chaque lot 6 cobayes et 12 souris. Quand les résultats sont satisfaisants, on siphonne le surnageant; les corps bactériens désintégrés étant précipités au fond des flacons, on les élimine par filtration sur papier filtre.

Purification de l'anatoxine. — La purification de l'anatoxine par fractionnement au sulfate d'ammonium ainsi que son adsorption sur phosphate d'alumine naissant se font selon la formule de INH Boston (2,3).

Antigénicité de l'anatoxine adsorbée. — On inocule 10 cobayes de 350 g avec 1 ml de produit contenant 5 Lf de l'antigène et 3 mg du phosphate d'alumine.

Après quatorze jours on éprouve ces cobayes avec 20 D. M. M. de toxine tétanique desséchée et remise en solution.

Les injections sont faites voie sous-cutanée. Pour chaque lot on inocule deux cobayes avec 1 D. M. M. de la même toxine. Ces témoins doivent mourir dans un délai de cinq jours.

Le test est satisfaisant si 50 p. 100 au moins des cobayes résistent à l'épreuve sans montrer aucune réaction. Le tableau III illustre l'antigénicité d'un certain nombre de lots préparés avec notre digestion pancréatique et la peptone N. Z. case (tableau III).

Tableau III — Pouvoir antigénique des diverses anatoxines tétaniques préparées sur milieu Mueller-Miller.

Antigène N°	Lf/Mg N.p	Epreuve Après 2 Semaines Avec 20 D.M.M.T.T.				
		Nombre de cobayes	Sans réaction après 4 semaines	Paralytie Locale	Mort de tetanos	Survie après 4 semaines
D.P. ¹	147c	10	10	0	0	100 %
D.P. ²	106c	10	10	0	0	100 %
D.P. ³	1150	10	10	0	0	100 %
D.P. ⁴	120c	10	10	0	0	100 %
D.P. ⁷	1100	10	10	0	0	100 %
D.P. ¹⁰	1000	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ²²	890	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ²⁴	1135	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ³⁴	690	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ³⁵	750	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ³⁷	1240	10	10	0	0	100 %
N.Z.case ⁵²	1000	10	10	0	0	100 %

Résumé. — Pour la préparation de la digestion pancréatique de caséine une formule simple est décrite. Cette digestion peut remplacer les produits commerciaux semblables dans la fabrication à large échelle de la toxine tétanique.

SUMMARY

Studies on the pancreatic digestion of casein,
with a view to tetanus toxin production.

A simple formula for pancreatic digestion of casein is described. The

product obtained can be used as the nitrogenous source in large scale production of tetanus toxin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GLADSTONE (G. P.) et FILDES (P.) *Birt J. exp. Path.*, 1940, 21, 161.
- [2] LEVINE (L.) et STONE (L. J.). *J. Immunol.*, 1951, 67, 235.
- [3] LEVINE (L.), STONE (L. J.) et WYMAN (L. J.). *J. Immunol.*, 1955, 75, 301.
- [4] MIRCHAMSY (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 402
- [5] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1943, 47, 15.
- [6] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1945, 50, 377.
- [7] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1947, 56, 143.
- [8] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, 67, 271.