

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FACTEURS FAVORISANT LA PRODUCTION DE LA TOXINE TETANIQUE (*)

par

M. KAMALY, A. SADEGH et M. MAHINPOUR

Dans une note antérieure (1), nous avons décrit la technique de préparation à grande échelle d'une digestion enzymatique qui puisse avantageusement remplacer le produit commercial "N.Z. case" dans la production de la toxine tétanique. Le but essentiel de la présente note est d'abord d'étudier la possibilité de réduire le temps de la digestion enzymatique de la caséine de 5 jours à quelques heures, pour accélérer le travail et empêcher les contaminations fréquentes qui surviennent souvent au cours de la digestion en question. Un autre point aussi important qui sera envisagé dans ce rapport, est l'élimination des lipides de l'enzyme qui pourra à son tour favoriser la production de toxine.

MATERIEL ET METHODES.

a) Préparation de l'extrait pancréatique délipidé.

Le tissu pancréatique de bœuf bien dégraissé est homogénéisé dans un appareil du genre Waring Blender et est conservé à -20°C pendant une nuit. Le lendemain, on ajoute, à 200 grammes du produit décongelé, 400 millilitres d'eau distillée et 200 millilitres de chloroforme. Le mélange est vigoureusement agité à plusieurs reprises pendant 20 minutes, puis est transféré dans une mesure cylindrique de 1 litre pour être conservé une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$.

Le lendemain, on centrifuge le mélange 20 minutes à 2.000 t.p.m. On obtient ainsi trois couches bien distinctes:

1. Au fond du flacon il y a une couche jaune, transparente, qui contient une très grande partie des lipides et le chloroforme.

* Bull. Off. Int. Epiz., 1963, 59 (9-10), 1597-1603

2. Au milieu se trouve une couche qui se compose d'une substance mucoïde et qui contient les tissus fibreux et conjonctifs du pancréas.

3. Finalement, une couche surnageante, grise et trouble, qui contient presque la totalité de l'enzyme délipidé.

Etant donné qu'une faible concentration en lipide ne nuit pas à la sécrétion de toxine tétanique (2-6), nous n'avons pas poussé plus loin la délipidation de l'enzyme ainsi obtenu. Le liquide surnageant est donc utilisé dans ces expériences comme extrait pancréatique délipidé (E.P.D.).

Pour préparer un extrait pancréatique normal (E.P.N.), on ajoute à 200 grammes du tissu pancréatique homogénéisé 400 millilitres d'eau distillée. Le mélange est fortement agité, puis congelé à -20°C et conservé à l'état congelé jusqu'à l'utilisation.

b) *Digestion de la caséine.*

Caséine (B.D.H.)	300 g
Carbonate de soude anhydre	20 g
Eau distillée	3.000 ml
E.P.D ou E.P.N.	300 ml

Dans 2 flacons de 5 litres, on dissout séparément 20 grammes de carbonate de soude dans 1.500 millilitres d'eau distillée à 50°C . On ajoute ensuite dans chaque flacon 300 grammes de caséine afin de préparer une émulsion homogène de caséine.

On ajoute ensuite à chaque flacon 1.500 millilitres d'eau distillée à 50°C , puis on ajoute, au flacon I, 150 millilitres de l'extrait pancréatique normal et, au flacon II, 150 millilitres de l'extrait pancréatique délipidé. La température tombe ainsi à $46^{\circ}\text{-}47^{\circ}\text{C}$. On garde ces flacons dans un bain-marie de 48°C avec une agitation constante.

Après 2, 4 et 6 heures de digestion, on ajoute à chaque flacon 50 millilitres de l'extrait pancréatique correspondant. Le pH de départ se situant autour de 9,0 se stabilise après 2 heures de digestion à 7,4 et reste stationnaire. Après 7 heures de digestion, on arrête l'opération et on continue le reste des opérations tel que nous l'avons décrit ailleurs (1). Dans le cas de la digestion de 5 jours à 37°C , on suit la technique que nous avons développée dans le précédent travail.

c) *Préparation du milieu.*

La formule utilisée est celle de Mueller et Miller (1954) (7), dont la composition a été donnée précédemment. On utilise comme source d'azote:

a) L'hydrolysate préparé avec l'extrait pancréatique délipidé (durée de digestion : 7 heures à 48° C);

b) L'hydrolysate préparé avec l'extrait pancréatique normal (durée de digestion : 7 heures à 48° C);

c) N-Z case (Sheffield Farms Co Inc);

d) L'hydrolysate préparé avec l'extrait pancréatique normal (durée de digestion : 5 jours à 37° C).

On prépare 15 lots comparatifs de 50 litres de milieu à base de ces sources d'azote que l'on distribue et ensemece comme il a été déjà décrit.

Dans une autre série d'expériences, 4 lots de 50 litres de milieu préparé avec une digestion pancréatique de caséine (5 jours à 37° C) sont comparés avec 4 lots, de même volume, du milieu à base de l'hydrolysate avec pancréas délipidé (7 heures à 48° C).

La préparation ainsi que la purification des antitoxines ont déjà été décrites et ne seront pas envisagées dans cet exposé.

La diffusion dans la gélose se fait d'après la technique déjà classique d'Ouchterlony (8) en utilisant une antitoxine tétanique purifiée de l'Institut Razi (4.000 UA/ml. diluée au 1/10).

RESULTATS.

1° Effet de la délipidation de l'enzyme.

Si l'on compare les résultats chiffrés dans le Tableau I, on conclut aisément qu'il n'y a aucune différence appréciable entre le pouvoir antigène exprimé en Lf/ml et la toxicité pour la souris albinos des toxines préparées avec un extrait pancréatique délipidé et le produit commercial "N-Z case".

Les toxines préparées avec l'extrait normal de pancréas ont un titre et une toxicité inférieurs par rapport aux deux autres lots.

La Figure I, sur la diffusion en gélose, montre également qu'il n'apparaît pas de différence appréciable dans la composition des 3 antigènes télaniques déjà décrits. En effet, les lignes correspondantes aux antigènes purifiés ont les mêmes nombre et caractère.

2° Comparaison entre les digestions enzymatiques de 7 heures et de 5 jours.

Si l'on compare les résultats notés dans le Tableau II, on peut conclure que le titre en Lf/m ainsi que la toxicité des lots des toxines, préparées par digestion

TABLEAU I
Comparaison entre les toxines tétaniques à base de l'extrait pancréatique normal ou délipidé :

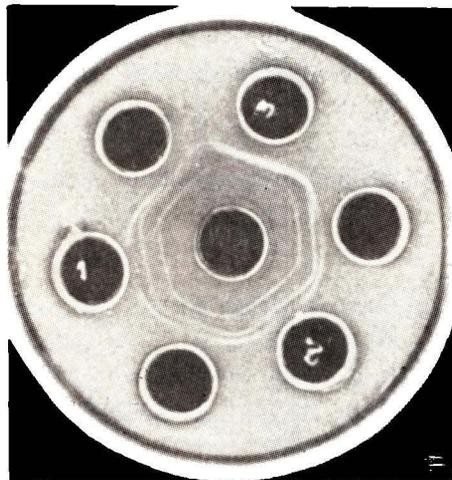
GENRE de l'enzyme	TOXINE				PURETÉ de l'antigène Lf/mg N.P.
	Lot No.	Lf/ml	Kf/min.	D.M.M./ml Souris albinos	
Enzyme délipidé	1	45	15'	5×10^6	909
	2	45	14'	$2,5 \times 10^6$	625
	3	55	11'	5×10^6	938
	4	45	9'	$2,5 \times 10^6$	866
	5	35	16'	$2,5 \times 10^6$	518
Enzyme normal	6	30	16'	$2,5 \times 10^6$	682
	7	35	20'	$2,5 \times 10^6$	544
	8	50	8'	5×10^6	870
	9	40	10'	$2,5 \times 10^6$	700
	10	40	15'	$2,5 \times 10^6$	922
N.Z. Caze	11	40	9'	5×10^6	682
	12	68	8'	5×10^6	883
	13	65	7'	10×10^6	782
	14	25	20'	1×10^6	577
	15	56	11'	$7,5 \times 10^6$	1191

TABLEAU II
Comparaison entre les digestions de caséine faites avec l'enzyme normal dans des conditions différentes :

DIGESTION 5 jours à 37° C				DIGESTION 7 heures à 48° C			
Lot N°	Lf/ ml	Kf/ min.	D.M.M./ml Souris albinos	Lot N°	Lf/ ml	Kf/ min	D.M.M./ml souris albinos
16	29,5	5'	$2,5 \times 10^6$	20	30	16'	$2,5 \times 10^6$
17	42	12'	1×10^7	21	12,5	14'	$2,5 \times 10^6$
18	21,5	15'	$2,5 \times 10^6$	22	35	12'	$2,5 \times 10^6$
19	29,5	12'	$2,5 \times 10^6$	23	47,5	12'	$2,5 \times 10^6$

pancréatique delipidée de 7 heures à 48° C. sont supérieurs à ceux des lots des toxines obtenues en utilisant la digestion pancréatique normale de 5 jours à 37° C.

Fig. I.



1. Antigène tétanique purifié à base d'enzyme délipide (digestion : 7 heures à 48° C).

2. Le même antigène préparé avec l'enzyme normal, même durée de digestion.

3. Antigène purifié à base de "N-Z case".

- - Les trois trous non numérotés contiennent trois antigènes tétaniques purifiés de routine à base de "N-Z case".

— Trou central : Sérum antitétanique purifié et dilué.

DISCUSSION.

Le but principal de ces études est de fournir une source d'azote très riche en peptides et facile à se procurer pour une fabrication à l'échelle industrielle de la toxine tétanique, sans avoir recours aux produits commerciaux dont l'obtention n'est pas toujours facile.

Nos expériences, qui nous ont permis de fournir des milliers de litres d'anatoxine tétanique à base d'hydrolysate enzymatique de caséine préparé au laboratoire, nous permettent de conclure qu'une digestion enzymatique de la caséine de 7 heures, réalisé avec l'extrait pancréatique bovin délipidé, peut être avantageusement utilisée comme source d'azote dans la préparation de la toxine tétanique.

* * *

RESUME

Une technique très simple est donnée pour la préparation de l'hydrolysate enzymatique de caséine destiné à la production de la toxine tétanique. Cette technique consiste à digérer la caséine par l'extrait pancréatique bovin délipidé pendant 7 heures à 48° C au pH de 7,4.

Le pouvoir antigène ainsi que la toxicité d'une telle toxine sont comparables à ceux des toxines tétaniques préparées selon la formule de Müller et Miller.

* * *

SUMMARY

A description is given of a very simple technique for the preparation of the enzymatic hydrolysate of casein for use in the production of tetanus toxin. It consists in digesting the casein at 48° C for 7 hours at pH 7.4 by a defatted extract of bovine pancreas.

Both the antigenic value and the toxicity of toxin prepared by this technique are comparable with those of tetanus toxin produced by the method of Müller and Miller.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

1. AGHDACHI (M.), SADEGH (A.) et MIRCHAMSY (H.) — *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 316.
2. NIEMAN (C.) — *Bact. Rev.*, 1954, **18**, 147.
3. NORTH (E. A.) et HAZEL (M. D.) — *Nature*, **182**, 1374.
4. ROBERT (E.) et coll. — *J. Bact.*, 1943, **46**, 559.
5. ROBERT (E.) et coll. — *J. Bact.*, 1943, **46**, 563.
6. KODICEK (E.) et WORDE (A. N.) — *Biochem. J.*, 1945, **39**, 78.
7. MULLER (J.H.) et MILLER (P. A.) — *J. Bact.*, 1954, **67**, 271.
8. OUCHTERLONY (O.) — *Acta path, microbiol Scand.*, 1948, **25**, 186.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. le Docteur H. Mirchamsy, Sous-Directeur de l'Institut Razi, pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée au cours de ce travail.