

III. — LA CRYOEXTRACTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOBACILLAIRE

par

H. MIR CHAMSY. (*)

Dans deux notes précédentes (1, 2), nous avons démontré la possibilité d'extraire la toxine incluse dans les bacilles tétaniques par addition de pénicilline ou par une protéolyse ménagée avec la trypsine. en opérant dans le milieu de culture lui-même.

En appliquant les procédés dont nous avons décrit les détails, le titre flocculant augmente de 15 à 35 p. 100 et la toxicité, exprimée en nombre de doses létales par millilitre pour la souris blanche, double ou triple.

Nous avons cherché ensuite d'autres moyens pour obtenir ces résultats sans intervention de pénicilline ou de trypsine qui ont l'inconvénient d'augmenter par leur simple présence l'impureté des préparations; de plus, l'addition de trypsine exige l'emploi d'un inhibiteur de nature protéinique, ce qui augmente également la teneur en protéines non spécifiques.

Après diverses tentatives, nous nous sommes orienté vers l'emploi du froid qui est un agent idéal pour extraire la toxine endobacillaire sans modifier sa pureté.

Cet article est le résumé des expériences réalisées et des résultats déjà obtenus.

Matériel et technique. — Des cylindres de 10 l contenant 5 l de milieu Mueller (3) sontensemencés avec 10 ml d'une culture de 24 heures en milieu au thioglycollate Disco en utilisant la souche Harvard de *Pl. tetani*. après cinq jours d'incubation à 33° C, on vérifie d'abord la pureté bactériologique des cultures puis on mélange le contenu des cylindres pour les diviser en trois lots de 25 l. Le pre-

* « Annales de l'Institut Pasteur ». — Tome 94, pp. 402-403., 1958.

mier lot sert de témoin ; on le filtre comme d'habitude, d'abord sur papier filtre en présence d'hyfflosupercel, puis sur des plaques stérilisantes EK ; le deuxième lot est conservé quatre à six jours à + 4° C. puis on le filtre de la même façon ; enfin le troisième lot est congelé dans la chambre froide à - 16° C, puis décongelé à 37° C et filtré comme les lots précédents.

La DMM est déterminée sur des souris blanches de 16-18 g en diluant la toxine dans l'eau peptonée et en injectant 0,5 ml des dilutions sous la peau de la souris. La floculation s'effectue avec la méthode de G. Ramon (4) en utilisant de l'antitoxine purifiée ne possédant qu'une seule zone de floculation.

Certains résultats obtenus sont notés dans le tableau I.

On voit d'abord que la simple conservation des cultures quatre à six jours à + 4° C augmente le titre floculant de 21 à 66 p. 100. La toxicité est également augmentée trois à dix fois.

TABLEAU 1.

N° lot	Témoin				Culture restée 46 jours à + 4° C.				Culture congelée et décongelée			
	Lf/ ml	Kf Mn.	D.M.M. ml.	Lf/mg N. P.	Lf/ ml	Kf Mn.	D.M.M. ml.	Lf/mg N. P.	Lf/ ml	Kf Mn.	D.M.M. ml.	Lf/mg N. P.
42	42	9	3 × 10 ⁶	840	51	2	3 × 10 ⁷	895	50	4	3 × 10 ⁷	910
43	35	6	5 × 10 ⁶	738	50	3	5 × 10 ⁷	750	47	4	6 × 10 ⁷	790
44	32	9	1 × 10 ⁷	680	40	5	7 × 10 ⁷	720	45	3	8 × 10 ⁷	750
45	36	7	2 × 10 ⁷	760	60	3	6 × 10 ⁷	850	54	5	8 × 10 ⁷	860
46	35	11	1,8 × 10 ⁷	705	43	6	8 × 10 ⁷	720	45	6	8 × 10 ⁷	735

En ce qui concerne l'effet de la congélation suivie de décongélation, on gagne 28 à 50 p. 100 en Lf/ml et la toxicité augmente de quatre à douze fois.

Le point remarquable dans ces expériences est l'augmentation de la pureté des produits traités, ce qui peut être attribué, en plus de la libération de toxine, à l'insolubilisation de certaines protéines bactériennes par l'action du froid et surtout à la suite de congélation et de décongélation, comme nous l'avons démontré à propos des anatoxines tétaniques en collaboration avec J.-L. Delsal (5).

Résumé. — En conservant la culture finale de *Pl. tetani*,

souche Harvard, dans le milieu de Mueller, quatre à six jours à + 4° C, la toxine incluse dans les bacilles diffuse dans le milieu.

En appliquant ce procédé on gagne de 25 à 65 p. 100 en Lf/ml; la toxicité, comparée avec le témoin, augmente de trois à dix fois. Les mêmes résultats s'obtiennent si la culture est congelée et décongelée.

SUMMARY

III. — THE CRYOEXTRACTION OF ENDOBACILLARY TETANUS TOXIN.

By keeping a tetanus culture (Harvard strain) on Mueller's medium, at low temperature for 4-6 days the toxine of the bacterial cells is released. By applying this technique the Lf value increased about 25 to 65 p. 100 and the m. l. d. 3 to 10 times when compared with the controls.

The same result can be obtained by alternate freezing and thawing of the above mentioned culture.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mir Chamsy (H.) et Sadegh (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 396-399.
2. Mir Chamsy (H.) et Nazari (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 399-401.
3. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.), *J. Bact.*, 1954, 67, 271.
4. Ramon (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, 74, 661 et 711.
5. Delsal (J. L.) et Mir Chamsy (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, 239, 600.