

MISE EN APPLICATION DES THÉORIES
SUR L'EXTRACTION
DE LA TOXINE TÉTANIQUE ENDOCELLULAIRE

II. — ACTION DE LA TRYPSINE

par

H. MIR CHAMSY et F. NAZARI. (*)

Dans une note antérieure (1), nous avons exposé nos recherches sur l'extraction de la toxine tétanique incluse dans les bacilles au cours et à la fin de la culture par action de la pénicilline. Dans le but d'intensifier et de régulariser la libération de cette toxine, nous avons cherché à remplacer la pénicilline par une protéase, la trypsine.

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

Matériel et Technique. — Nos recherches ont porté sur une partie des lots de fabrication de toxine. Des cylindres de 10 l contenant 5 l de milieu Mueller (2),ensemencés avec 10 ml de culture de 24 heures de la souche Harvard et cultivés cinq jours à 32° C, sont soumis à l'action de la trypsine. On emploie la trypsine Difco à 1/250. On ajoute 1 mg de trypsine par millilitre de milieu. Le pH final de la culture de 5 jours étant 7,2-7,4, on ne le modifie pas. La digestion se fait dans un bain-marie à 37° C. Sur un cylindre contenant 5 l de culture soumis à l'action de la trypsine, on enlève au cours de la digestion des échantillons de 200 ml pour les titrages. L'échantillon est filtré sur papier filtre en présence d'hyflosupercel.

Le tableau 1 donne les résultats de cette expérience.

On voit d'abord qu'après une à deux heures de digestion le pouvoir antigène, exprimé en Lf/ml, passe de 20 à 32, soit une aug-

* « Annales de l'Institut Pasteur ». — Tome 94, pp. 399-401, 1958.

mentation de 60 p. 100, le Kf est nettement diminué et la toxicité est doublée. Si on continue la digestion, le titre en Lf baisse et le Kf augmente régulièrement de sorte qu'après trente-six à quarante-huit heures de digestion il sera difficile d'identifier l'antigénicité du filtrat qui a perdu sa spécification. Un point important est l'évolution de la pureté de la toxine au cours de la digestion; en effet, dans la première heure il semble qu'il y ait seulement libération de la toxine sans que la structure bactérienne soit touchée sous l'action de l'enzyme; on voit donc une augmentation de la pureté de la toxine obtenue. Si on continue la digestion, l'enzyme agit à la fois sur le microbe et sa toxine; ainsi le titre et la pureté diminuent considérablement et, en même temps, le Kf s'allonge.

TABLEAU 1.

Action de la trypsine sur la culture tétanique.

Heures de digestion	Lf ml	Kf/mn	Lf/mg. N.P.	D.M.M./ml. souris
0	20	23	400	$1,5 \times 10^6$
1/2 h.	25	13	426	
1 h.	32	11	450	2×10^6
1 h. 30	32	10	405	3×10^6
2 h.	31	10	392	
3 h.	30	13	385	
4 h.	28	15	360	2×10^6
5 h.	26	18	357	
6 h.	20	25	312	
7 h.	18	30	278	
8 h.	15	40	214	

Détermination de la teneur optimum en trypsine. — De ce qui précède on peut conclure que le maximum de toxine s'obtient entre soixante et quatre-vingt-dix minutes pour une quantité fixe de trypsine. Dans d'autres séries d'expériences on a cherché la quantité optimum de trypsine pour une durée constante de soixante-quinze minutes, Dans 15 erlenmeyers de 1.000 ml on met 500 ml de culture de 5 jours; on ajoute des quantités croissantes de trypsine Disco et on laisse digérer soixante-quinze minutes à 37° C. On filtre ensuite le contenu de tous les erlenmeyers puis on les filtre immédiatement-

Le tableau II est le schéma d'une de ces expériences.

TABLEAU 2

U. Trypsine /ml	1,25	1,00	0,75	0,62	0,50	0,37	0,25	0,18	0,12	0,06	0,025	0,0125	0,0050	0,0025	0
Lf/ml	23	25	25	25	30	31	31	35	40	40	33	31	30	30	30
Kf·mn	11	8	8	8	7	6	6	5	5	5	7	7	8	8	11

A partir d'une culture à 30 Lf/ml on obtient, après soixante-quinze minutes de digestion en présence de 0,06 U de trypsine par millilitre, une toxine à 40 Lf/ml, soit une augmentation de 33 p. 100. Dans de nombreux essais, nous avons constaté que l'optimum de trypsine est de 0,06 à 0,12 U de trypsine Difco pour soixante-quinze minutes de contact.

La libération de toxine semble être liée à la protéolyse ménagée des bacilles sous l'action de la trypsine. Nous pensons que la trypsine pure est moins active que l'enzyme moins purifié; en effet, nous avons observé que pour obtenir le maximum de toxine dans des conditions rigoureusement identiques, il fallait employer dix fois plus de trypsine hautement purifiée que de trypsine ordinaire du commerce (1). Nous avons de même observé que la lipase pancréatique est incapable de libérer le toxine tétanique de corps bacillaires à pH 7,2-7,4.

Inhibition de la trypsine. — Pour arrêter l'action de la trypsine à la fin de la digestion, nous avons essayé plusieurs moyens. Les méthodes classiques telles que le chauffage ou les variations de pH dénaturent la toxine.

L'addition de formol et l'incubation de la toxine trypsinée à l'étuve détruisent également le pouvoir antigène.

L'addition de l'inhibiteur de Soja à raison de 0,04 mg/ml inhibe définitivement la trypsine sans toucher à l'antigène. Ce produit étant difficile à obtenir, nous l'avons remplacé par la protéine inhibitrice de la trypsine, isolée de blanc d'œuf suivant la technique de Balls et Swenson (3) (2).

Cette protéine, additionnée à raison de 0,4 mg/ml de culture, inhibe également l'action de la trypsine sans nuire à l'antigène.

Résumé. — En employant le milieu de Mueller et la souche

Harvard, il est possible d'extraire la toxine tétanique incluse dans les bacilles à la fin de la culture pour augmenter considérablement la toxicité et l'antigénicité du produit final.

Cette libération de toxine se fait dans la culture même, sous l'action d'un enzyme protéolytique comme la trypsine.

SUMMARY

APPLICATION OF THEORIES ON THE EXTRACTION OF ENDOCELLULAR TETANUS TOXIN. II. — ACTION OF TRYPSIN.

The tetanus toxin contained in the bacterial cells of a Harvard strain culture in Mueller's medium can be extracted in order to increase the toxicity and the antigenicity of the final product. The release of toxin is realized in the culture by the action of trypsin.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mir Chamsy (H.) et Sadegh (A.). *Ann Inst. Pasteur.* 1958, 94, 396-399.
2. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.). *J. Bact.*, 1954, 67, 271.
3. Balls (A. K.) et Swenson (T. L.). *J. biol. Chem.*, 1934, 106, 409.

(1) Nous remercions M. le professeur A. de Barbierie, Directeur Scientifique de l'Institut Sérothérapique de Milan, qui nous a envoyé un échantillon de trypsine très pure Z. A. à 58 U. N./mg.

(2) Nous remercions notre collègue le Dr J.-L. Delsal, Chef du Service de Biochimie de l'Institut Razi, qui a bien voulu nous préparer la protéine inhibitrice de trypsine à partir du blanc d'œuf.