

APPLICATION DE LA MÉTHODE
PAR DIFFUSION D'LOUDIN-OAKLEY
POUR LE DÉNOMBREMENT DES ANTIGÈNES TÉTANIQUES

par

A. RAFYL, H. MIR CHAMSY et J. L. DELSAL *

Avant les travaux récents d'Oudin (26-32) sur la diffusion de l'antigène dans un milieu gélifié renfermant l'immunsérum, l'immunochimiste ne possédait que des méthodes approximatives pour la détection du nombre des antigènes ou des anticorps présents dans un liquide; grâce aux recherches de cet auteur des méthodes précises furent mises au point pour le dénombrement des antigènes ou des anticorps,

Il est probable que Bechhold, 1905 (3), ait été le premier à démontrer la formation de précipité localisé quand un antigène diffuse dans un gel contenant l'anticorps correspondant.

Ascoli et Valenti, 1910 (2), par superposition de l'antigène et du sérum précipitant, obtiennent un bon résultat dans le diagnostic du charbon bactérien.

Nicolle et ses collaborateurs, 1920 (13), inspirés par les travaux d'Ascoli, appliquent sa technique, modifiée, pour le titrage des antigènes et des anticorps. On mélange un volume égal de sérum équin et de gélatine à l'eau physiologique; on répartit en tubes (2 ml par tube) et on fait prendre dans la glacière. On superpose aux culots solidifiés des quantités décroissantes de sérum de lapin anticheval et on obtient ainsi la formation de lignes caractéristiques à la limite de l'anticorps et de l'antigène-gélatine.

Dans une 2^e note (14) ces auteurs appliquent ce procédé au titrage des toxines et des antitoxines diphtériques et tétaniques. Le procédé consiste à déterminer la plus petite quantité de sérum qui,

* Revue d'Immunologie, 18, 1954, 391-398.

après 2 heures de contact à 40°C avec un gel de gélatine contenant 50 p. 100 de filtrat toxique, aboutit à l'apparition d'un disque visible; les résultats du titrage par ce procédé sont comparables à ceux du titrage *in vivo*.

Reiner et Kopp en 1927 (39) confirment les constatations de Bechhold.

D'après Oudin (1946) dans les systèmes précipitants simples, où un seul antigène réagit, il y a une seule zone et un seul maximum de densité de précipité (MDP), la distance du précipité à l'interface est proportionnelle à la racine carrée du temps; le MDP est proportionnel à la concentration initiale de l'anticorps mais indépendant de la concentration initiale de l'antigène; alors que les antigènes protéidiques donnent une zone de précipitation à frontière bien franche; certains haptènes glucidiques bactériens donnent une zone sans frontière nette.

Dans les systèmes précipitants complexes chaque antigène agit avec son anticorps d'une manière indépendante, sans influencer les uns sur les autres, l'image reste «semblable» à elle-même en s'allongeant au cours du temps et les MDP sont constants; le nombre des antigènes est égal à celui des frontières ou des MDP.

Le procédé d'Oudin a été appliqué par d'autres auteurs à divers systèmes antigène-anticorps.

Ouchterlony, 1948 (16-25), d'une part, et Eleck, 1948 (5-6) d'autre part, en appliquant ce procédé soit au moyen de cupules ménagées dans la gélose renfermant l'antigène ou l'anticorps, soit au moyen de bandes de papier filtre imprégnées par ces réactifs, ont montré l'identité de la toxine diphtérique quelle que soit la souche qui sécrète la toxine. Eleck et Levy, 1950 (7), étudient la toxinogénèse de différentes souches de staphylocoque et constatent qu'en employant des bandes de papier filtre imprégnées par les réactifs, on arrive à dénombrer les antigènes hémolytiques des souches toxigènes. Munoz et Becker, 1950 (12), comparent les résultats d'analyse immunochimique classique et la diffusion en gélose et confirment également la conclusion d'Oudin à propos du nombre des bandes de précipitation qui est équivalent au minimum de systèmes antigène-anticorps présents dans le liquide à analyser. Jensen et Francis, 1953 (8), ont appliqué la technique de diffusion soit dans des tubes, soit dans des boîtes de Pétri aux différentes souches de virus grippal; ils obtiennent des bandes de précipitation spécifique pour les immunosérums correspondants.

Ambrose et Easty, 1953 (1), par une technique interférométrique

prennent des photos très nettes des bandes de précipitation formées dans la gélose contenant l'immunsérum.

La modification prévue dès 1946 par Oudin, mais réalisée par Oakley en 1953 (15), facilite la détection de plusieurs systèmes antigène-anticorps. Oakley introduit une colonne de gélose ou de gélatine simple qui forme tampon entre la colonne d'immunsérum solidifié en bas du tube et l'antigène de la partie supérieure. Les 2 réactifs diffusent des 2 côtés dans la zone tampon où ils forment des zones de précipitation.

Grâce à cette technique, Pope et ses collaborateurs, 1951 (34), arrivent à démontrer la complexité de l'antigène diphtérique purifié par Pappenheimer (33) et supposé pur; ces auteurs montrent que dans la toxine diphtérique brute (souche P. W. 8) il y a au moins 24 antigènes ou haptènes précipitant avec leurs anticorps respectifs présents dans l'antitoxine commerciale. Dans la toxine purifiée de Pappenheimer, ils trouvent 14 antigènes, 7 majeurs et 7 mineurs selon l'intensité des couches formées; mais par de nouvelles méthodes de purification, ils obtiennent des toxines pures ayant seulement 5 lignes de précipitation. La plupart de ces antigènes sont des enzymes protéolytiques dont l'activité est neutralisée par les anticorps correspondants.

Nous avons appliqué cette technique pour détecter le nombre des antigènes présents dans les filtrats tétaniques et contrôler chaque étape de la purification des antigènes tétaniques.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous appliquons la technique d'Oakley dont voici les détails :

A une solution très claire de 2 p. 100 de gélose dans l'eau salée à 1 p. 100 et merthiolatée à 1 p. 10000 maintenue à 54° C., on ajoute un volume égal de l'antitoxine tétanique purifiée par digestion enzymatique, dénaturation thermique et précipitation au sulfate d'ammonium (4). Nous employons dans toutes ces expériences une antitoxine de 1000 U. A/ml. On distribue le mélange gélose-antitoxine à 54° C dans des tubes de 80 × 8 millimètres à raison de 0,4 ml, en prenant la précaution de ne pas toucher les parois du tube et en évitant la formation de bulles d'air.

Quand cette colonne est solidifiée on ajoute dans chaque tube 0,1 ml d'une solution de 1 p. 100 de gélose dans l'eau salée à 1 p. 100 et merthiolatée à 1 p. 10000. On remplit alors les tubes jusqu'à environ 1 centimètre de l'ouverture avec le filtrat tétanique à étudier,

également merthiolaté à 1 p. 10000, puis on ferme les tubes avec du plasticène. Les tubes sont conservés à 25° C. On note les résultats à partir du 2^e jour et jusqu'au 5^e ou 6^e jour.

La toxine tétanique est préparée, soit à partir du milieu de Prévot et Boorsma (35), dont une formule plus récente a été décrite par Turpin, Raynaud et Rouyer (40) soit dans le milieu de Mueller et Miller (9), préparé selon la formule de 1951 (10) (*).

Le milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 1 litre à raison de 850 millilitres ou dans de gros tubes à raison de 20 millilitres. Onensemence le milieu sorti de l'autoclave et refroidi à 35° C avec l'une des 9 souches toxigènes de *Pl. tetani* dont nous disposons.

Pour préparer l'antigène on filtre la culture d'abord sur papier filtre puis sur filtre Seitz (EK).

La purification se fait par une méthode mise au point à l'Institut Razi (non publiée).

La Lt est déterminée par la floculation de Ramon et l'extraction de l'endotoxine par la méthode de Raynaud (36-38).

Le milieu de culture nonensemencé est employé comme témoin; pour le milieu de Prévot et Boorsma on voit 2 lignes de précipitation dues à l'anticorps antibœuf présent dans l'antitoxine alors que pour le milieu de Mueller et Miller nous n'avons pas observé ces lignes de précipitation non spécifiques.

La lyse bactérienne est suivie et mesurée à l'aide du néphélomètre Coleman, modèle n° 7.

FORMATION DES ANTIGÈNES OU HAPTÈNES AU COURS DE LA CULTURE

RAPPORT ENTRE LA LYSE BACTÉRIENNE ET LE NOMBRE DES ANTIGÈNES LIBÉRÉS

Deux souches de *Pl. tetani* R (I. P. Paris) et Welcome 509 (I. N. H. Utrecht) sont ensemencées sur le milieu de Prévot et Boorsma; on suit la croissance bactérienne et l'on constate qu'après la

(*) Le travail ayant été effectué avant la modification de la formule apportée par Mueller et Miller (11).

phase maximum stationnaire, où la multiplication bactérienne s'est arrêtée, l'autolyse est mesurable. Dix-huit jours après le début de la culture, une lyse de 25 à 50 p. 100, selon la souche et le milieu employés s'est produite.

Des tubes de cultures filtrées les 4^e, 7^e, 11^e et 18^e jours montrent que le nombre d'antigènes (haptènes) augmente avec l'âge de la culture. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

Age des cultures . .	4 Jours		7 Jours		11 Jours		18 Jours	
Souche	R	W	R	W	R	W	R	W
Nombre d'Antigènes (Haptènes) . . .	7	8	13	8	13	10	15	14
Lyse bactérienne %					18	23	34	24

Cette expérience, répétée avec 7 autres souches de *Pl. tetani* toxigènes, aboutit toujours au même résultat; autolyse plus ou moins marquée observée au cours du vieillissement de la culture et augmentation progressive du nombre d'antigènes (20 détectés au maximum dans le milieu de Prévot et Boorsma).

Cette autolyse est fonction de la souche employée. Certaines souches, par exemple W, sont plus rapidement autolytiques que d'autres.

Ces expériences nous permettent de conclure, comme Oakley (1953), que les nouveaux antigènes sont probablement formés à la suite de l'autolyse bactérienne et de la dégradation des grosses molécules en nouveaux éléments susceptibles de précipiter avec leurs anticorps correspondants. Ces antigènes ou haptènes proviennent, soit des corps bactériens, soit de la toxine elle-même; d'où la complexité de la toxine tétanique brute.

On peut diviser ces antigènes en 2 groupes majeurs et mineurs selon l'intensité des lignes de précipitation.

Le tableau II montre que presque 50 p. 100 de ces antigènes sont majeurs.

TABLEAU II

Culture de 4 jours sur milieu de Prévot et Boorsma

Souche	R	W	Tulloch type I	S. A.	Alger
Antigènes totaux . .	15	18	10	12	8
Antigènes majeurs . .	5	8	5	5	4

Souche	Mérieux	Stockholm	I. P.	Harvard
Antigènes totaux . . .	10	9	10	10
Antigènes majeurs . . .	5	5	5	5

On doit se rappeler que ces chiffres sont minima car il est toujours possible qu'à la suite de la superposition des lignes formées dans la zone tampon centrale du tube on ne compte pas toutes les lignes.

CONTROLE DE LA PURETÉ DES ANTIGÈNES TÉTANIQUES PAR LA MÉTHODE DE DIFFUSION DANS LE GEL

La technique de diffusion joue un rôle remarquable dans le contrôle de la pureté des antigènes tétaniques; en effet on exprime d'habitude la pureté par le nombre d'unités flocculantes existant dans un milligramme d'azote protéinique et le coefficient de purification est :

$$\frac{\text{Unités mg. N. P. produit purifié}}{\text{unités mg. N. P. produit brut}}$$

Or, quand il s'agit de produits qui flocculent très lentement ou lorsqu'on ne possède que très peu d'antigène, comme dans le cas de la toxine extraite des corps bactériens, on peut vérifier et comparer la pureté par cette technique de diffusion.

Comparaison d'un antigène tétanique brut et purifié. — L'anatoxine tétanique n° 91 produite sur le milieu de Prévot et Boorsma (souche R) a les caractéristiques suivantes :

D. M. M./cobaye de la toxine : 1×10^{-5} .

Titres : 18, 69 et 276 Lf/ml (on adopte le titre le plus bas, 18 Lf/ml, comme vrai titre selon Van Ramshorst et Rijks 1954 (41).

N. P./ml. : Omg. 135; 133 Lf/mg N. P.

Après purification :

Titre : 39 Lf/ml; N. P./ml. : Omg. 040; 580 Lf/mg N. P.,
coefficient de purification : 4,3.

Antigénicité. — Une demi dose humaine de cette anatoxine adsorbée sur phosphate d'alumine et injectée aux cobayes protège 100 p. 100 des animaux vaccinés après épreuve avec 20 D. M. M. d'une toxine tétanique stabilisée.

Dans le produit brut, il y a 12 antigènes ou haptènes dont 5 sont majeurs; dans le produit purifié il ne reste que 3 antigènes, les autres antigènes ou haptènes étant éliminés au cours de la purification.

Influence de l'âge de la culture. — On étudie le nombre d'antigènes présents dans une culture du même lot après 4 jours, 9 jours et 18 jours.

La culture est faite sur milieu de Prévot et Boorsma avec la souche Harvard à 35° C. Les prélèvements sont filtrés sur bougie L3, puis soumis à des essais de diffusion; les mêmes produits après purification sont de nouveau contrôlés par diffusion.

Le tableau III indique les résultats obtenus et montre la constance du nombre des lignes de précipitation après purification quel que soit l'âge de la culture. Dans le produit brut au contraire le nombre des lignes de précipitation augmente avec l'âge.

TABLEAU III

Culture de 4 jours		Culture de 9 jours		Culture de 18 jours	
Brut	Purifié	Brut	Purifié	Brut	Purifié
9 (4)	5 (1)	10 (5)	5 (1)	15 (7)	5 (1)

(Les chiffres entre parenthèses indiquent les lignes majeures.)

Influence de la souche. — Deux toxines tétaniques préparées sur milieu de Prévot et Boorsma avec les 2 souches R et Welcome ont les particularités suivantes :

	Titres Lf/ml	D. M. M. /cobaye	mg N. P. /ml	Lf/mg N. P.
Souche R...	42, 91 et 260	2×10^{-5}	0,165	250
Souche W...	27, 126 et 290	$1,5 \times 10^{-5}$	0,119	225

Après détoxication et purification on a :

	Titre Lf/ml	mg N. P. /ml	Lf/ N. P.
Souche R . . .	42	0,065	646
Souche W . . .	38	0,058	655

La méthode de diffusion pratiquée avec ces anatoxines nous donne les résultats suivant :

	Anatoxine brute	Anatoxine purifiée
Souche R . . .	13 (5)	4 (2)
Souche W . . .	8 (3)	4 (2)

Comparaison entre la toxine diffusée dans le milieu et la toxine extraite des corps microbiens. — La toxine a été préparée sur milieu de Prévot et Boorsma avec la souche R pendant 4 jours à 33° C.

Les germes sont recueillis par centrifugation à + 4° C. Le culot de centrifugation est lavé 3 fois à + 4° C. avec de l'eau distillée. Les corps microbiens sont mis en suspension dans un volume de solution saline hypertonique ($\text{NaCl} \frac{M}{1}$ et citrate de sodium $\frac{M}{10}$) égal 1/10 du volume du bouillon initial et laissés 24 heures à 0° C. Après ce délai la suspension est centrifugée (3 000 t. p. m., 30 mn); puis le liquide surnageant filtré à travers une bougie L3.

On constate par diffusion qu'il y a 15 antigènes ou haptènes dans la toxine diffusée dans le milieu de culture avec 6 antigènes majeurs; alors que dans la toxine extraite des corps microbiens, il n'y a plus que 5 antigènes dont 2 sont majeurs.

Dans un autre essai réalisé avec la souche Harvard et sur milieu de Mueller et Miller (culture de 6 jours à 35° C) on observe 7 antigènes dont 3 majeurs dans la toxine diffusée dans le milieu de culture, et 4 antigènes dont 2 majeurs dans la toxine extraite des corps bactériens.

La méthode par diffusion nous montre que la toxine extraite des corps bactériens contient beaucoup moins d'antigène, ou haptènes, que celle qui a diffusé dans le milieu de culture.

CONCLUSION

La toxine tétanique, quelle que soit la souche toxigène, est un ensemble complexe d'antigènes ou haptènes libérés dans le milieu de culture.

L'autolyse bactérienne et la dégradation des grosses molécules en petits fragments au cours du vieillissement de la culture augmentent le nombre des antigènes.

La technique de diffusion sur le gel d'Oudin, modifiée par Oakley, nous permet de dénombrer ces antigènes. Elle permet également de suivre la purification des antigènes tétaniques ayant diffusé dans le milieu de culture ou extraits des corps bactériens.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ambrose (E. J.) et Easty (G. C.). — *Nature*, 1953, 172, 811.
2. Ascoli (A.) et Valenti (E.). — *Zeitsch. für Infektionskr.*, 1910, 7, 5.
3. Bechhold (H.). — *Zeitschr. phys. chimie*, 1905, 52, 185.
4. Delsal (J. L.) et Mir Chamsy (H.). — *Rev. d'Immun.*, 1953, 17, 110.
5. Éleck (S. D.). — *Brit. Med. J.*, 1948, 1, 493.
6. Éleck (S. D.). — *J. Clin. Path.*, 1949, 2, 250.
7. Éleck (S. D.) et Levy (E.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1950, 31, 358.
8. Jensen (K. E.) et Francis (T.) Jr. — *J. Immun.*, 1953, 70, 321.
9. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.) — *J. Immun.*, 1945, 50, 377.
10. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.). — Modifications dactylographiées, 1951, *Department of health*, Albany (U. S. A.).
11. Mueller (J. H.) et Miller (P. A.). — *J. Bact.*, 1954, 67, 271.
12. Munoz (J.) et Becker (E. L.). — *J. Immun.*, 1950, 65, 47.
13. Nicolle (M.) Césari (E.) et Debain (E.) — *Ann. I. P.*, 1920, 34, 149.
14. Nicolle (M.), Césari (E.) et Debain (E.). *Ann. I. P.*, 1920, 34, 596.
15. Oakley (C. L.) et Fulthorpe (A. J.) — *J. Path. Bact.*, 1953, 65, 49.
16. Ouchterlony (O.). — *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 1948, 25, 186.
17. Ouchterlony (O.). — *Ark Kemi Min. Geol.*, 1948, 26, 1.
18. Ouchterlony (O.). — *Arkiv. Kemi, Min. Geol.*, 1949, Bd26 B-N9, 14-1-9.
19. Ouchterlony (O.). — *Arkiv for Kemi*, 1949, BdI, 7.
20. Ouchterlony (O.). — *Arkiv for Kemi*, 1949, BdI-9, 55.
21. Ouchterlony (O.). — *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 1949, 26, 507.
22. Ouchterlony (O.). — *Lancet*, 1949, 1, 346.
23. Ouchterlony (O.). — *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 1949, 26, 516.
24. Ouchterlony (O.). — *Acta Medica Scandinav.*, 1950, 138, 76.
25. Ouchterlony (O.). — *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 1953, 32, 231.

26. Oudin (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1946, 222, 115.
 27. Oudin (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, 29, 140.
 28. Oudin (J.). — *Ann. I. P.*, 1948, 75, 30.
 29. Oudin (J.). — *Ann. I. P.*, 1948, 75, 109.
 30. Oudin (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1949, 228, 1890.
 31. Oudin (J.). — *Thèse de doctorat ès Science*, Paris, 1949.
 32. Oudin (J.). — *Methods in Medical Research*, 1952, 5, 335.
 33. Pappenheimer (A. M.) Jr. — *J. Biol. Chem.*, 1937, 120, 543.
 34. Pope (C. G.), Stevens, Muriel (F.), Caspary (E. A.) et Fenton (E. L.).
— *Brit. J. Exp. Path.*, 1951, 32, 246.
 35. Prévot (A. R.) et Boorsma (H. G.). — *Ann. I. P.*, 1939, 63, 600.
 36. Raynaud (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1947, 225, 543.
 37. Raynaud (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 98.
 38. Raynaud (M.). — *Ann. I. P.*, 1951, 80, 536.
 39. Reiner (L.) et Kopp (H.). — *Koll. Z.*, 1927, 42, 335.
 40. Turpin (A.) Raynaud (M.) et Rouyer (M.). — *Ann. I. P.*, 1952, 82, 299.
 41. Van Ramshorst (J. D.) et Rijks (H.). *Antonie Van Leeuwenhoek* 1954,
20, 17.
-