

## **Technique sensible de détection dans l'eau de la toxine botulique C précipitée par le méthanol**

par L. PIGOURY, C. CHABASSOL et C. STELLMANN

---

La recherche d'une toxine botulique dans l'eau est généralement effectuée dans le cadre de la pathologie infectieuse ; elle peut également s'inscrire parmi les mesures de défense contre une agression biologique.

Seule, la méthode expérimentale, qui consiste à inoculer un échantillon d'eau suspecte à un animal de laboratoire, de préférence la souris, se montre spécifique et fidèle, mais elle est peu sensible. Sa sensibilité est limitée par le volume maximum d'eau que l'on peut injecter sans danger à la souris. Ce volume étant de 2 ml environ, la dose minimum de toxine qu'elle permet de déceler est seulement de 1/2 D M m souris par ml d'eau, soit 500 D M m par litre.

Dans une note précédente, nous avons montré qu'il était possible d'augmenter de 40 à 50 fois cette sensibilité en concentrant la toxine par lyophilisation de l'eau contaminée. On peut ainsi mettre en évidence jusqu'à 1,2/100, et même 1/100 D M m souris, par ml d'eau, soit 12 à 10 D M m souris par litre.

Poursuivant nos recherches en vue d'augmenter au maximum la sensibilité de la méthode expérimentale pour la détection d'une toxine botulique dans l'eau, nous avons mis au point une nouvelle technique notablement plus sensible que la précédente en expérimentant sur une toxine botulique C identique à celle de nos essais antérieurs, c'est-à-dire titrant  $10^{5.5}$  DL 50 souris par ml, et dont la DL 100 souris est de 0,5 ml d'une dilution à  $10^{-5}$ .

Cette technique est basée sur la propriété du méthanol de précipiter à basse température, et dans des conditions convenables de concentration et de pH, les protéines en solution, et notamment les toxines holoprotéiques, parmi lesquelles figure la toxine botulique. Le précipité est recueilli par centrifugation, mis en suspension dans une petite quantité d'eau distillée et inoculé à des souris suivant certaines modalités.

La sensibilité limite de la technique dont nous venons d'indiquer le principe dépend surtout du volume d'eau correspondant à la

quantité maximum de suspension qui peut être injectée sans danger à la souris. Après de nombreux essais sur des échantillons sans toxine d'eau des canalisations urbaines ou de rivière, nous avons établi que la souris tolère, par injection dans le péritoine, 2 ml de suspension représentant 1 litre d'eau. Toutefois, afin de disposer d'une marge suffisante de sécurité et de récolter aisément le précipité avec le matériel dont nous disposons, nous admettrons que cette quantité limite d'eau est pratiquement de 600 ml.

*Technique de détection de la toxine botulique C par précipitation méthanolique.*

Afin d'éviter tout risque d'altération de la toxine, les différentes opérations doivent être effectuées sans perte de temps, stérilement et à une température ne dépassant pas  $+4^{\circ}$ .

Le prélèvement d'eau doit être de 12 litres au moins, de façon à permettre à la fois la simple détection de la toxine, son titrage et la toxinotypie. L'eau est placée en flacons stériles qui sont expédiés en caisse isotherme contenant de la glace.

Dès l'arrivée au laboratoire, l'eau est filtrée sur papier Chardin, puis sur membrane Millipore type A A, de porosité  $0,8 \mu$  et de 47 mm de diamètre, afin d'éliminer le maximum de particules en suspension et de bactéries. S'il s'agit par exemple, d'eau de rivière, on peut ainsi filtrer les 12 litres du prélèvement en 3 heures 15 environ, en changeant la membrane lorsqu'elle se colmate. Le filtrat est ensuite porté à une température de  $+4^{\circ}$ .

La façon de procéder varie alors suivant l'objectif poursuivi :

a) Si l'on cherche seulement à déceler la présence de la toxine botulique, par exemple en cas de contrôle systématique de salubrité de l'eau, on opère sur  $0,6 \times 3 = 1,8$  litre d'eau, de façon à pouvoir inoculer 3 souris. On ajoute 0,25 p. 100, soit 4,5 ml, de sérum de cheval, et on ajuste à pH 6,2 par addition de solution normale d'acide acétique pur cristallisable.

L'échantillon d'eau ainsi préparé est réparti en 3 lots de 600 ml que l'on traite successivement par le méthanol. A chacun d'eux, on ajoute 25 p. 100 de méthanol à  $+4^{\circ}$ , soit 150 ml, en agitant légèrement. Nous avons vérifié que cette proportion de méthanol est la quantité optimum permettant de précipiter la fraction toxique de la toxine. Il se produit un précipité qui est recueilli après 1/2 heure de contact par centrifugation à  $+4^{\circ}$ , pendant 20 minutes à 8.500 tours minute, dans un centrifugeur réfrigéré.

En raison de la capacité du centrifugeur dont nous disposons, qui est un appareil JOUAN, type C 53, à 4 pots de 100 ml, chaque échantillon de 600 ml d'eau + 150 ml de méthanol, soit au total

750 ml environ, est centrifugé en 2 fois, dans les 4 mêmes pots, le liquide surnageant étant rejeté après chaque centrifugation.

On laisse ensuite évaporer pendant 1 heure à +4° le reliquat de liquide, et notamment l'alcool méthylique, resté en contact avec les 4 culots. Ceux-ci sont enfin collectés dans 2 ml d'eau distillée stérile additionnés de 1.000 U de pénicilline et 5 mg de streptomycine.

Après avoir ainsi procédé avec les 3 lots de 600 ml, on dispose de 3 suspensions de 2 ml de toxine concentrée, prêtes à être injectées, et correspondant chacune à 600 ml du prélèvement initial d'eau. La durée totale de préparation du précipité et des suspensions demande 5 heures environ, dans nos conditions de travail.

A noter que des centrifugeurs de plus grande capacité, par exemple de 0,8 à 5 litres, comme il en existe dans le commerce, permettraient d'effectuer la centrifugation en un temps notablement plus réduit.

Au cours de ces manipulations, la perte de toxine est peu importante. Etant donné qu'elle constitue un facteur de sensibilité de la technique, nous l'avons évaluée expérimentalement par de nombreux essais portant sur des échantillons de 600 ml d'eau contenant de 1 à 100 D M m souris. Vérification faite par inoculation à la souris, la proportion de toxine restant réellement dans la suspension finale correspond à 1 D M m souris pour 1,2 D M m présente initialement dans le prélèvement. Le résultat est identique, aussi bien lorsque les 600 ml d'eau contiennent 100 D M m souris que 1,2 D M m seulement. Avec un inoculum correspondant à 1 D M m souris dans le prélèvement, la mortalité est de 40 à 50 p. 100. La perte de toxine au cours des diverses opérations est donc de l'ordre de 16 p. 100 environ.

Chacune des 3 suspensions de 2 ml de toxine, préparées comme nous l'avons indiqué, est inoculée, par voie péritonéale, à une souris de 30 g environ. Les souris sont mises en observation pendant 4 jours.

Si aucune ne succombe, l'eau contient moins de 1,2 et même 1 D M m souris, pour 600 ml, c'est-à-dire moins de 1/500 à 1/600 D M m souris par ml, soit respectivement 2 à 1,6 D M m souris par litre. Si toutes les souris inoculées succombent, la mortalité apparaissant la plupart du temps en 24 à 48 heures, l'eau contient au moins 1/500 D M m souris par ml, ou 2 D M m par litre.

Afin que la technique que nous venons de décrire puisse entrer dans la pratique courante et permette de procéder à la toxino-typie, il est indispensable qu'elle soit applicable à tous les types de toxines botuliques. Nous avons vérifié que les résultats sont

tout à fait comparables avec des toxines A, B et D (1). Il est à présumer qu'il en est de même pour la toxine E.

b) En vue de préparer la toxinotypie, on peut procéder à un titrage approximatif de la toxine contenue dans l'eau, à partir d'un échantillon de 1,2 litre. On opère comme précédemment, et l'on obtient au total 4 ml de suspension concentrée de toxine que l'on réunit en un seul tube. Cette suspension est diluée, par exemple de 1/2 à 1/1.000, suivant la technique classique employée en sérologie. On dispose ainsi d'une série de dilutions sous un volume de 4 ml qui permet d'inoculer 2 souris par dilution. La dernière dilution provoquant une intoxication mortelle des 2 souris contient au moins 2 D M m souris ; on peut donc évaluer en D M m souris la quantité de toxine présente dans l'eau examinée.

c) Si les premières inoculations sont positives, on procède ensuite à la toxinotypie par la méthode habituelle. On précipite, d'après les résultats du titrage, la quantité d'eau nécessaire pour inoculer 5 lots de 3 souris, chaque lot correspondant à l'un des 5 types connus de toxines botuliques.

Il y a parfois intérêt à pratiquer d'emblée la toxinotypie, par exemple en cas de présomption clinique de botulisme, de façon à instituer sans retard une prophylaxie et une thérapeutique spécifiques. On opère alors sur un prélèvement de 9 litres d'eau, quantité nécessaire à la toxinotypie si l'eau contient la quantité minimum de toxine décelable par la présente technique. Ce prélèvement est réparti en 5 échantillons de 1,8 litre correspondant aux 5 types connus de toxines botuliques et permettant d'inoculer 3 souris par type de toxine.

A mentionner, à titre de variante, la possibilité d'utiliser un centrifugeur ordinaire en refroidissant le précipité à  $-10^{\circ}$  avant la centrifugation. Toutefois, la perte totale de toxine atteint près de 60 p. 100, c'est-à-dire que la quantité minimum décelable est de 2,4 D M m souris pour 600 ml d'eau, ou 4 D M m par litre, soit 2 fois plus qu'en centrifugeant à  $+4^{\circ}$ .

### *Conclusions.*

La technique de détection de la toxine botulique C dans l'eau par précipitation méthanolique, offre l'avantage considérable d'être au moins 250 fois plus sensible que la méthode experimen-

---

(1) Ces toxines ont été aimablement mises à notre disposition par le Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris, que nous remercions bien vivement.

tale directe et 6 fois plus que la technique de concentration par lyophilisation. Elle permet, en effet, de mettre en évidence 1/500 D M m souris par ml d'eau, soit 2 D M m souris par litre, contre 1,2/100 D M m souris par ml, ou 12 D M m par litre, par lyophilisation, et seulement 1/2 D M m souris par ml, ou 500 D M m par litre, par la méthode directe.

Cette sensibilité pourrait encore être accrue jusqu'à déceler 1/800 D M m souris par ml d'eau en injectant à la souris la quantité maximum de précipité tolérée; l'interprétation des résultats risquerait cependant d'être plus délicate et, en fait, la sensibilité de 1/500 D M m par ml d'eau est suffisante pour l'hygiéniste. Elle garantit, en effet, la détection dans l'eau de doses de toxine botulique de 300 à 600 fois inférieures aux doses minima nécessaires pour provoquer chez l'homme et les animaux une intoxication d'origine hydrique par voie digestive.

L'utilisation d'un centrifugeur non réfrigéré est possible, mais la technique devient deux fois moins sensible.

La précipitation de la toxine botulique C par le méthanol peut être associée aux méthodes sérologiques, dont elle accroît la sensibilité dans la même mesure que pour la méthode expérimentale.

La technique que nous venons d'exposer est également applicable aux toxines A, B et D, et vraisemblablement à la toxine E.

*Laboratoire de Recherches du Service Biologique  
et Vétérinaire des Armées, Alfort.*

#### BIBLIOGRAPHIE

- DUBERT (J.-M.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1953, **84**, 370.  
LAMANNA (C.) et GLASSMAN (N.-N.). — *J. of Bacteriology*, 1947, **54**, 575.  
PIGOURY (L.) et CHABASSOL (C.). — *Bull. Acad. Vétérinaire*, 1965, **38**, 251.  
PILLEMER (L.). — *J. of Immunology*, 1946, **53**, 237.  
PILLEMER (L.) et HUTCHINSON (M.-C.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 299.