

CHROM. 4019

## Influence de la température sur l'élution de l' $\alpha$ -toxine staphylococcique d'une colonne d'hydroxylapatite

En 1963, JACKSON<sup>1</sup> a montré que l' $\alpha$ -toxine adsorbée sur hydroxylapatite en tampon phosphate 0.03 M, pH 6.8 était éluée à 0.075 M, sans spécifier cependant la température à laquelle il travaillait. Pourtant, le facteur température à laquelle est effectuée la chromatographie joue un rôle décisif dans la molarité d'élution de cette substance. HJERTEN<sup>2</sup> avait déjà noté l'influence de la température sur l'augmentation d'adsorption des protéines du sérum humain normal avec l'abaissement de la température. Toutefois, ce facteur revêt ici une importance particulière.

Le présent travail montre en effet, que, pour purifier de manière optimale l' $\alpha$ -toxine sur hydroxylapatite, il est absolument nécessaire d'effectuer la chromatographie à température ambiante (+20°), car à +4°, une partie de l' $\alpha$ -hémolysine reste fortement adsorbée sur le phosphate de calcium et n'est éluée qu'avec un tampon phosphate 0.25 M, pH 6.8 en même temps que d'autres substances contaminantes.

### Matériel et méthodes

#### *Préparation de l' $\alpha$ -hémolysine (souche WOOD 46)*

La souche WOOD 46 cultivée à +37° dans un milieu à base de digestion papaïnique de viande de veau et d'hydrolysate de gélatine, produit des titres régulièrement élevés d' $\alpha$ -toxine (de l'ordre de 20 U.I./ml)<sup>3</sup> dans le milieu de culture. L' $\alpha$ -toxine ainsi préparée, débarrassée des corps microbiens, nous a été fournie sous forme liquide par le Docteur PILLET de l'Institut Pasteur de Garches. Après 4 dialyses successives de 12 h chacune, les deux premières en tampon phosphate de potassium 0.1 M, pH 6.8, les deux dernières en tampon phosphate de K<sup>+</sup> 0.005 M, pH 6.8, le dialysat est concentré par lyophilisation. Au moment de l'application sur la colonne, la poudre lyophilisée est redissoute dans une quantité appropriée d'eau distillée et dialysée 24 h contre un tampon phosphate de K<sup>+</sup> 0.05 M, pH 6.8.

#### *Titrages de l' $\alpha$ -toxine*

La toxine est diluée de 1/2 en 1/2 en solution saline à 8.5‰, sous un volume de 0.5 ml. Dans chaque tube, on ajoute 1/20 de ml d'une suspension de globules rouges de lapin. Les tubes sont mis au bain marie à +37° pendant 1 h, avec agitation toutes les 20 min, puis laissés au repos pendant encore 1 h sur la paillasse, afin de laisser sédimenter les hématies. Le dernier tube totalement hémolysé donne la Dose Minimale Hémolytique (DMHe), qui est chiffrée par l'inverse de la dilution.

Les globules rouges sont lavés trois fois en eau physiologique et 1 ml de culot d'hématies est ensuite remis en suspension dans 24 ml d'eau physiologique. Le culot de globules rouges est conservé à +4° en Alsever, tandis que la suspension de globules rouges au 1/25 était refaite chaque jour.

#### *Titrage de la $\delta$ -toxine*

Il est effectué de la même manière que pour l' $\alpha$ -toxine, avec la seule différence que les hématies utilisées sont d'origine humaine. L'unité de titrage est la Dose Minimale Hémolytique Delta, traduite par l'inverse de la dilution.

### Chromatographie

Deux sortes d'hydroxylapatite ont été utilisées à titre de comparaison : l'une a été préparée au laboratoire selon la technique de TISELIUS *et al.*<sup>4</sup>, l'autre était le produit commercial Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.).

Les colonnes étaient de 10 à 11 cm × 2 cm, équilibrées en tampon phosphate de K<sup>+</sup> 0.05 M, pH 6.8.

Deux stocks de tampon phosphate de K<sup>+</sup> à pH 6.8 ont été préparés : l'un à 0.1 M, l'autre à 0.5 M. Une dilution de moitié de ces deux tampons a donné les tampons 0.05 M et 0.25 M.

Les chromatographies étaient effectuées en paliers avec des vitesses d'élution de 18 ml/h. Un collecteur de fractions nous permettait de recueillir des fractions de 5 ml.

### Méthodes analytiques

*Adsorption ultra-violette.* Les lectures de densités optiques étaient faites à 280 m $\mu$ , avec un spectrophotomètre Beckman DB.

*Analyses immuno-électrophorétiques (A.I.E.).* Les analyses ont été réalisées suivant la technique de GRABAR<sup>5</sup>, sur des plaques de 10 × 4 cm en tampon véronal-véronal sodé 0.05 M, pH 8.2. La tension appliquée aux plaques était de 6 V/cm pendant 90 min. L'immun-sérum était du sérum de cheval anti-alpha de l'Institut Pasteur.

### Résultats

*Chromatographie de l' $\alpha$ -hémolysine.* L'étude comparative des deux chromatographies (Fig. 1 et 2) réalisées, l'une à +4°, l'autre à +20°, montre nettement la différence du mode d'élution de l' $\alpha$ -toxine en fonction de la température. A +20°, la majeure partie de l' $\alpha$ -hémolysine est éluee avec le tampon phosphate 0.1 M,

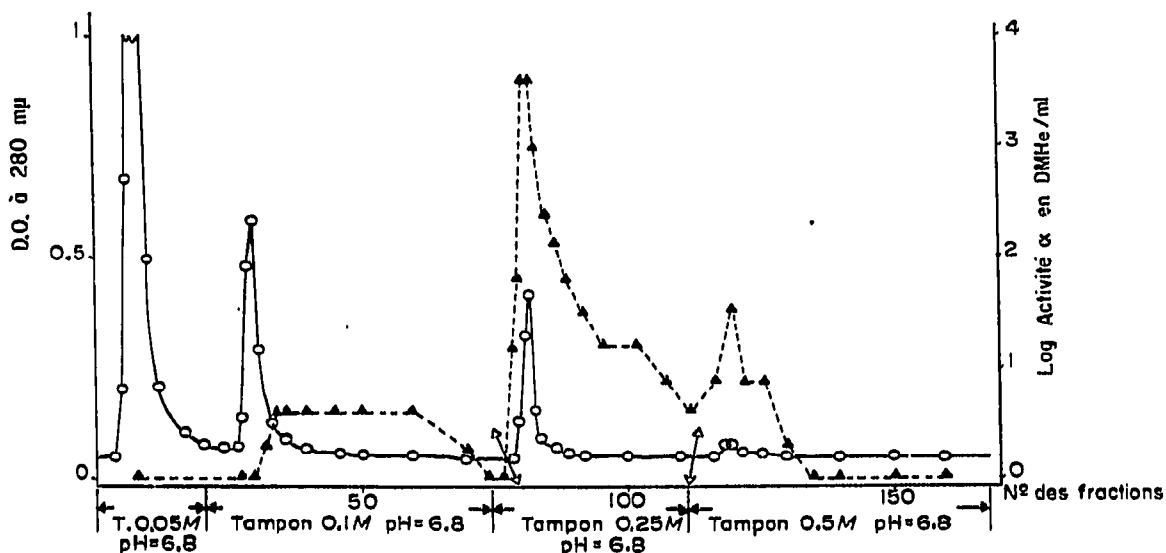


Fig. 1. Chromatographie d' $\alpha$ -toxine sur hydroxylapatite à +4°. Colonne de 10 × 2 cm. Vitesse d'élution, 18 ml/h; volume des fractions, 5 ml; volume mis en chromatographie, 3.5 ml, avec un titre total de 18 000 DMHe (soit environ 250 U.I.). (O—O) D.O. à 280 m $\mu$ ; (▲—▲) titre  $\alpha$ -toxine en DMHe/ml; ( $\downarrow$   $\uparrow$ ) fraction prise pour l'A.I.E. (voir Fig. 3b).

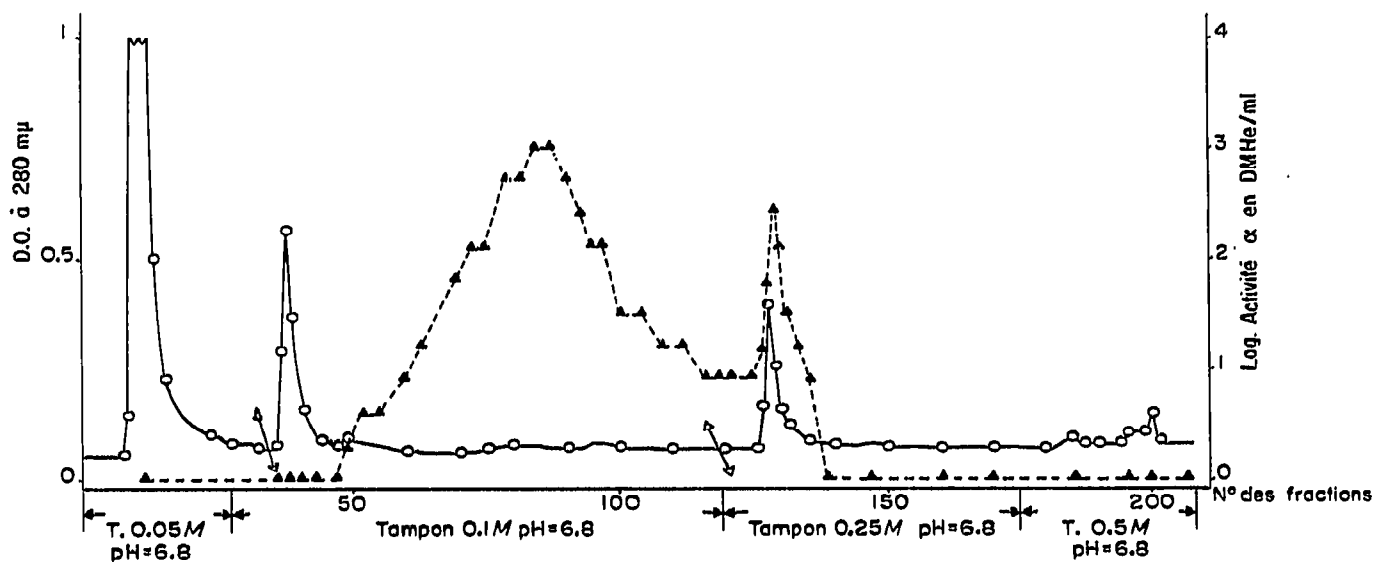


Fig. 2. Chromatographie d' $\alpha$ -toxine sur hydroxylapatite à  $+20^\circ$ . Colonne de  $11 \times 2$  cm. Autres caractéristiques et volume mis en chromatographie identiques à la Fig. 1. ( $\downarrow$   $\downarrow$ ) Fraction prise pour l'A.I.E. (voir Fig. 3c).

pH 6.8; tandis qu'à  $+4^\circ$ , une très faible partie seulement de la toxine est éluée à la même molarité. Le pic majeur d'activité hémolytique se trouve au palier 0.25 M.

On notera cependant, que quelle que soit la température, un peu d' $\alpha$ -hémolysine est éluée à chaque molarité, et ceci particulièrement à  $+4^\circ$ . Des titrages pour la mise en évidence de la  $\delta$ -toxine ont été réalisés à plusieurs reprises sur chaque pic d'activité, mais ils sont toujours restés négatifs. D'autre part, une hémolyse due à la  $\gamma$ -toxine est exclue puisque GUYONNET *et al.*<sup>6</sup> ont montré que cette toxine est éluée à  $+20^\circ$  en deux pics à 0.25 M et 0.45 M, non hémolytiques séparément. Il semble donc bien que l'activité hémolytique enregistrée soit due uniquement à l' $\alpha$ -hémolysine.

Des A.I.E. réalisées avec les différentes fractions (Fig. 3a, b et c) montrent que l' $\alpha$ -hémolysine éluée à  $+20^\circ$  présente un degré de purification bien supérieur à celui obtenu par chromatographie de la même toxine à  $+4^\circ$ .

Enfin, nous devons signaler que nous n'avons décelé aucune différence de comportement de l' $\alpha$ -toxine, en fonction du support utilisé: hydroxylapatite fabriquée au laboratoire, ou commerciale Bio-Rad Laboratories.

### Discussion

COULTER<sup>7</sup> a montré que l' $\alpha$ -toxine de *Staphylococcus aureus* était constituée, entre autres, d'un nombre relativement élevé de résidus aminés de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. En cela, notre expérience peut venir confirmer les résultats obtenus par BERNARDI ET KAWASAKI<sup>8</sup>, qui ont montré que seules les substances contenant des groupes carboxyliques pouvaient être adsorbées sur hydroxylapatite.

Le rang d'éluion étendu de l' $\alpha$ -toxine semble montrer l'hétérogénéité de cette toxine, ainsi que l'a déjà signalé COULTER<sup>7</sup>. Cependant, à ce stade de purification, nous n'avons pas cherché à localiser la fraction 12 S inactive de l' $\alpha$ -toxine, naturellement présente dans les milieux de culture de la souche WOOD 46 (Bibl. 9). Il est

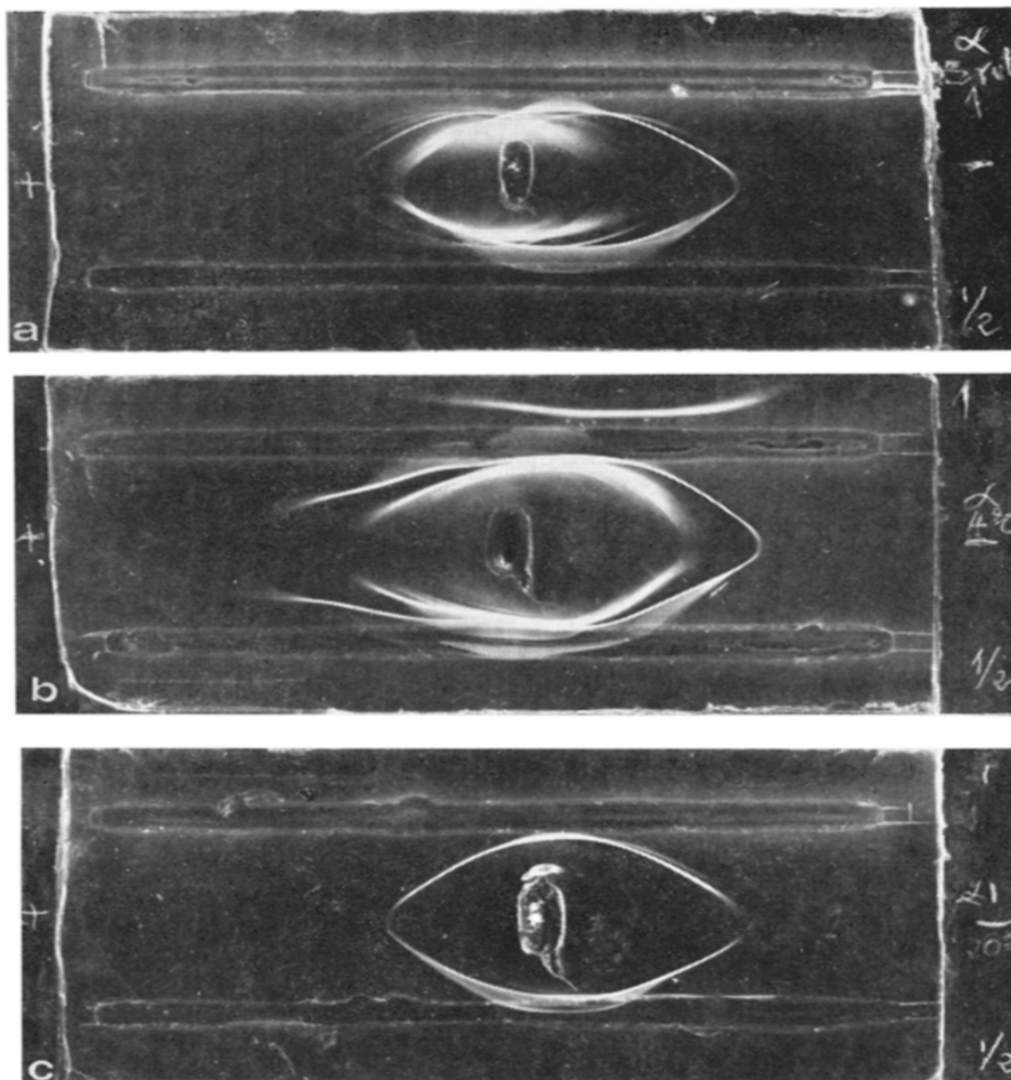


Fig. 3. Immuno-électrophorèses d' $\alpha$ -toxine avant et après chromatographie aux différentes températures. A.I.E. sur plaques de  $10 \times 4$  cm, gélose en tampon Véronal  $0.05 M$ , pH 8.2, avec tension de  $6 V/cm$  pendant 90 min. Immun-sérum de cheval de l'Institut Pasteur. (a) =  $\alpha$ -toxine brute avant chromatographie. Dans les gouttières: sérum pur en haut, sérum dilué au  $1/2$  en bas; (b) =  $\alpha$ -toxine après chromatographie à  $+4^\circ$ ; totalité du palier  $0.25 M$ ; (c) =  $\alpha$ -toxine après chromatographie à  $+20^\circ$ ; totalité du palier  $0.1 M$ .

possible que cette fraction 12 S soit représentée par le pic d'adsorption protéique  $0.1 M$  élué juste avant le pic d'activité alpha, ou encore que cette fraction 12 S ne soit pas retenue sur hydroxylapatite et soit donc éluée dans le palier de lavage à  $0.05 M$ . Dans un cas comme dans l'autre, cela signifierait que la polymérisation de l' $\alpha$ -toxine entraînerait une configuration stérique telle que les groupes carboxyliques seraient masqués par le repliement de la chaîne protéique. Un fait est certain cependant, c'est que la toxine 12 S ne sort pas en même temps que le pic d'activité alpha à  $0.1 M$ , car le passage de cette fraction active en urée  $8 M$  n'entraîne aucune augmentation de l'activité hémolytique<sup>10</sup>.

Donc, le passage de l' $\alpha$ -toxine staphylococcique sur hydroxylapatite, dans les conditions de température que nous avons déterminé, permet d'obtenir dès les

premiers stades de purification la fraction active de cette hémolysine caractérisée comme étant 3S par divers auteurs<sup>7,9,11</sup> débarassée de nombreuses substances contaminantes et en particulier de la fraction polymérisée naturelle 12 S.

Nous remercions Monsieur le Docteur PILLET de l'Institut Pasteur de Garches, qui nous a fourni les lots d' $\alpha$ -toxine utilisés dans ce travail.

Centre de Recherches Vétérinaires et Zootechniques,  
Station de Pathologie de la Reproduction,  
37-Nouzilly (France)

G. VIDAL

- 1 A. W. JACKSON, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 219.
- 2 S. HJERTEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 216.
- 3 J. PILLET, P. MERCIER ET B. ORTA, *Ann. Inst. Pasteur*, 81 (1951) 224.
- 4 A. TISELIUS, S. HJERTEN ET O. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 132.
- 5 P. GRABAR, in P. GRABAR ET P. BURTIN, *Analyse immuno-électrophorétique*, Masson, Paris, 1960, p. 5-31.
- 6 F. GUYONNET, M. PLOMMET ET G. BOUILLANNE, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 267 (1968) 1180.
- 7 J. R. COULTER, *J. Bacteriol.*, 92 (1966) 1655.
- 8 G. BERNARDI ET T. KAWASAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 160 (1968) 301.
- 9 A. W. BERNHEIMER ET L. L. SCHWARTZ, *J. Gen. Microbiol.*, 30 (1963) 455.
- 10 J. P. ARBUTHNOTT, J. H. FREER ET A. W. BERNHEIMER, *J. Bacteriol.*, 94 (1967) 1170.
- 11 I. LOMINSKI, J. P. ARBUTHNOTT ET J. B. SPENCE, *J. Pathol. Bacteriol.*, 86 (1963) 258.

Reçu le 17 février 1969

*J. Chromatog.*, 41 (1969) 279-283