

PRODUCTION DE LA LEUCOCIDINE DE *STAPHYLOCOCCUS PYOGENES*

G. VIDAL

*Station de Pathologie de la Reproduction,
Centre de Recherches vétérinaires et zootechniques, 37 - Nouzilly
Institut national de la Recherche agronomique*

Les auteurs qui ont travaillé ces dernières années sur la Leucocidine de PANTON et VALENTINE (P. V. Leucocidine), l'ont produite, soit par des cultures en tubes en T pour les cultures en petite quantité (GLADSTONE et VAN HEYNINGEN, 1957 ; WOODIN, 1959 ; WOODIN, 1961), soit en fermenteur (WOODIN, 1959 ; WOODIN, 1960 ; GLADSTONE, 1965 ; DERBYSHIRE et HELLIWELL, 1962) ou dans des appareils de culture en semi-continu (GLADSTONE et VAN HEYNINGEN, 1957) pour les productions à plus grande échelle.

La technique en tubes en T a toujours fourni de bons titres de toxine, mais dès que les auteurs ont voulu produire de la P. V. Leucocidine en plus grande quantité, ils se sont heurtés à des irrégularités de production d'une fabrication à l'autre, (WOODIN, 1959) ou bien ils obtenaient des titres peu élevés qu'ils compensaient par la quantité de milieu de cultureensemencé : GLADSTONE (1965) a travaillé sur 2 000 litres de bouillon, par quantité de 150 litres. Pour étudier cette toxine, il fallait trouver une technique qui permette, sous des volumes adéquats, d'obtenir régulièrement des titres élevés, analogues à ceux produits en tubes en T. L'aération dans les tubes en T animés d'un mouvement longitudinal est considérable ; il semblait donc qu'en réalisant une aération artificielle comparable, telle que celle décrite par PLOMMET et BOUILLANNE (1966), on puisse parvenir à ce résultat. La présente note décrit une technique qui, à partir de 1 500 ml de milieu de culture, permet d'atteindre ce but.

La souche V₈ de *Staphylococcus pyogenes*, utilisée par WOODIN (1959) et par GLADSTONE et VAN HEYNINGEN (1957), est cultivée dans le milieu CCY de GLADSTONE et FILDÉS modifié par WOODIN (1961). Les cultures sont réalisées dans les tubes en T décrits par VAN HEYNINGEN et GLADSTONE (1953) avec 10 ml de milieu par tube et dans des ballons de 6 litres à fond plat, contenant 1 500 ml de milieu de culture, auquel on ajoute, avant stérilisation, 0,1 ml d'antimousse Rhodorsil 426 (Rhône-Poulenc-Paris). Le tube en T a une branche horizontale de 2,2 cm de dia-

mètre extérieur sur 16 cm de long, arrondie aux deux extrémités ; la branche verticale mesure 10 cm de long et 1,8 cm de diamètre extérieur.

La technique de production est la suivante : la souche lyophilisée est ensemencée dans un tube de milieu CCY et incubée pendant 4 heures à l'étuve à 37°C. A partir de cette culture, on ensemence des tubes inclinés de Bacto Heart Infusion Agar (Difco), qui sont incubés à 37°C durant la nuit. Puis on récolte à l'anse les colonies des pentes pour ensemencer des tubes en T, à raison d'une pente par tube. Ceux-ci sont incubés au bain-marie à 37°C avec une agitation longitudinale alternative de 12 cm et 120 mouvements par minute, pendant 4 à 5 heures. On transfère 150 ml de ces cultures dans un ballon. L'agitation (600 t/min. environ) et l'aération sont réalisées par la technique de PLOMMET et BOUILLANNE (1966), en injectant de l'oxygène seul avec un débit de 6 litres/heure. L'incubation est faite au bain-marie durant 14 à 16 heures. Par comparaison, des cultures dans des tubes en T, ensemencés comme le ballon (1 ml pour 10 ml de milieu) à partir de sub-cultures de 4 à 5 heures sont incubés au bain-marie avec agitation pendant 16 heures.

Les mesures de croissance bactérienne, sont faites par opacimétrie, avec l'échelle de Brown (Burroughs Wellcome and Co. London) après dilution au 1/10 des cultures.

Le titrage de la P. V. Leucocidine est fait par la méthode de WOODIN (1959), mais on utilise une suspension de polynucléaires de lapin au lieu de macrophages. Ces leucocytes sont obtenus par injection intra-péritonéale d'une solution à 0,1 p. 100 (p/v) de glycogène, selon la technique de COHN et MORSE (1959) et, après une nouvelle injection de 100 ml de tampon gélatine-phosphate à pH = 7,2 (WOODIN, 1959),

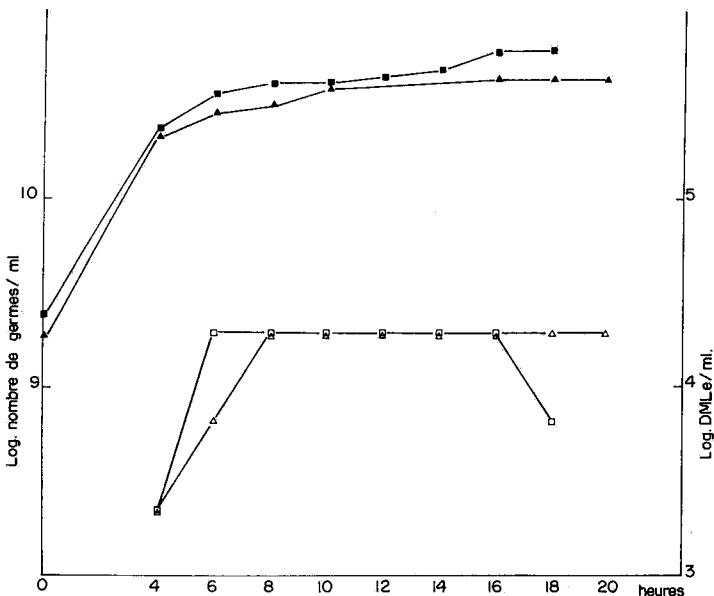


FIG. 1. — Comparaison de la croissance et de la production de Leucocidine en ballon avec O₂ et en tubes en T

- — ■ Croissance bactérienne en tubes en T
- ▲ — ▲ Croissance bactérienne en ballon avec O₂
- — □ Titre de P. V. Leucocidine dans les tubes en T.
- △ — △ Titre de P. V. Leucocidine dans le ballon avec O₂

ils sont recueillis dans un flacon à plasma contenant 20 ml d'une solution saline d'EDTA disodique à 0,6 p. 100. Après trois lavages, les globules blancs sont ramenés à la concentration de 4×10^7 /ml. L'unité de titrage est la Dose Minimale Leucotoxique (DML_e) définie par WOODIN (1959) ; c'est la plus petite quantité de leucocidine dans 1 ml capable de tuer les leucocytes dans les conditions du titrage.

Une expérience comparative de la croissance du germe et de la production de P. V. Leucocidine entre tubes en T et ballon avec oxygène, en fonction du temps est donnée par la figure 1. On peut voir que la croissance est sensiblement équivalente en ballon et en tubes en T. La production de toxine elle aussi est comparable, avec toutefois un léger retard dans la culture en ballon. Cinq productions en ballon avec oxygène ont régulièrement donné un titre de 60 000 DML_e/ml, égal à celui fourni par les cultures en tubes en T, avec un nombre de germes de 4×10^{10} /ml environ. Les proportions relatives des fractions F et S (WOODIN, 1959) mesurées en titre et en poids de protéines restent comparables à celles obtenues avec les tubes en T. Des essais de culture sans aération, ou bien avec aération par simple agitation à l'aide d'un barreau magnétique, ont donné des croissances bactériennes et des titres de P. V. Leucocidine médiocres : pour les cultures sans agitation un maximum de 4×10^9 germes/ml au bout de 12 jours de culture, avec un titre de 30 DML_e/ml ; pour les cultures avec agitation par barreau aimanté, $2,4 \times 10^{10}$ germes/ml et un titre de 700 DML_e/ml après 16 heures d'incubation. Dans cette dernière technique, au-delà de 18 heures de culture, le titre de toxine tombe brutalement.

Ceci démontre que l'oxygène favorise la production de Leucocidine dans des cultures dont la croissance microbienne diffère peu de celles de cultures témoins, réalisées en l'absence d'oxygène. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une technique comparable, simple et peu coûteuse du point de vue matériel, a déjà permis la production de deux autres toxines staphylococciques : les δ et γ -Hémolysines (PLOMMET et BOUILLANNE, 1966). Ceci doit permettre aux laboratoires s'intéressant à ces problèmes une simplification technique et une normalisation du matériel, en vue de la production des différentes toxines de staphylocoque.

Reçu pour publication en février 1967.

SUMMARY

PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCAL P. V. LEUCOCIDIN

A technique for the production of staphylococcal P. V. Leucocidin using ordinary laboratory glassware and bubbling with O₂, was described. This technique yielded regularly as good titres as the VAN HEYNINGEN and GLADSTONE'S T tube technique (fig. 1), but was carried out volumes one hundred times more important.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COHN Z. A., MORSE S. I., 1959. Interactions between rabbit polymorphonuclear leucocytes and staphylococci. *J. exper. Med.*, **110**, 419-443.
- DERBYSHIRE J. B., HELLIWELL B. I., 1962. Immunity to experimental staphylococcal mastitis in goats produced by Alpha lysin, Coagulase and Leucocidin. *Res. Vet. Sci.*, **3**, 56-62.

- GLADSTONE G. P., VAN HEYNINGEN W. E., 1957. Staphylococcal Leucocidins. *Brit. J. exp. Path.*, **38**, 123-137.
- GLADSTONE G. P., 1965. Staphylococcal Leucocidin toxoid. *Brit. J. exp. Path.*, **46**, 292-307.
- PLOMMET M. G., BOUILLANNE C., 1966. Production des hémolysines staphylococciques Delta et Gamma. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **6**, 529-532.
- VAN HEYNINGEN W. E., GLADSTONE G. P., 1953. The neurotoxin of *Shigella shigae*. *Brit. J. exp. Path.*, **34**, 221-229.
- WOODIN A. M., 1959. Fractionation of a Leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.*, **73**, 225-237.
- WOODIN A. M., 1960. Purification of the two components of Leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **75**, 158-165.
- WOODIN A. M., 1961. Assay of the two components of staphylococcal Leucocidin and their antibodies. *J. Path. Bact.* **81**, 63-68.
-