

TOXICITÉ DE LA TOXINE GAMMA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POUR LA SOURIS

Françoise GUYONNET

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

RÉSUMÉ

La toxicité pour la souris de la toxine staphylococcique gamma a été étudiée pour les deux fractions γ I et γ II séparément et en mélange, pour plusieurs valeurs des rapports I/II. Les fractions ne sont pas toxiques séparément. En mélange, la toxicité est maximum pour un rapport 1/1 (DL₅₀, 48 heures : 7 100 unités, intervalle de confiance 95 p. 100, 4 200-8 800) et diminue non symétriquement, contrairement à l'activité hémolytique, pour des valeurs différentes. Les lésions observées sont celles de stase aiguë des capillaires, en particulier du rein. Ces deux faits suggèrent un mode d'action au moins partiellement différent entre l'activité toxique et hémolytique.

INTRODUCTION

Parmi les produits exocellulaires élaborés par le Staphylocoque, les hémolysines ont fait l'objet de nombreux travaux. L'isolement et la purification de ces substances ont permis d'acquérir certaines connaissances sur leur constitution, leurs propriétés, leur mode d'action, et leur rôle dans l'infection staphylococcique.

Si aucune hémolysine ne peut être considérée comme un facteur déterminant de la virulence du Staphylocoque, toutes y contribuent à différents stades de l'infection par leurs activités hémolytiques, cytotoxiques, nécrotiques ou pharmacodynamiques (GLADSTONE, 1966).

La toxine γ , que nous avons identifiée et partiellement purifiée, est formée de deux fractions γ I et γ II non hémolytiques séparément. L'activité hémolytique des mélanges de γ I et γ II varie en fonction du rapport des deux fractions. (GUYONNET, PLOMMET, 1970). Dans ce travail, nous avons étudié la toxicité de la toxine γ pour la souris et comparé celle-ci à son activité hémolytique.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1. Préparation de la toxine γ

La toxine γ est produite suivant la méthode de PLOMMET et BOUILLANNE (1966) à partir de la souche 5 R de SMITH (1962) en milieu CCY et les deux fractions I et II sont séparées et purifiées par chromatographie sur hydroxylapatite suivant une technique décrite précédemment (GUYONNET, PLOMMET, 1970).

Les fractions ainsi obtenues sont concentrées séparément de 20 à 30 fois par ultrafiltration sur membrane Diaflo PM 10 (Amicon Corporation) de façon à les obtenir sous des volumes égaux ; elles sont ensuite dialysées contre tampon phosphate de potassium 0,05 M à pH 7 pendant 8 heures et stérilisées par passage sur membrane Millipore 0,65 μ .

2. Titrage de la toxine

Deux techniques de titrage sont utilisées :

— les deux fractions mélangées dans différentes proportions sont titrées par l'activité hémolytique du mélange vis-à-vis d'une suspension de globules rouges humains étalonée (GUYONNET, PLOMMET, 1970). Le titre est alors exprimé en U/ml ;

— les deux fractions sont titrées séparément en présence de sérums homologues : chaque fraction est diluée de 1/2 en 1/2 en solution saline tamponnée sous le volume de 0,25 ml puis incubée pendant 15 minutes sur la paillasse en présence de 0,5 ml du sérum homologue dilué à 0,5 unité antitoxique par ml ; la neutralisation de l'hémolyse est révélée par addition de 0,25 ml de l'autre fraction, 0,05 ml d'une suspension de globules rouges au 1/20 et incubation de 30 minutes à 37°C. Le titre de chaque fraction est exprimé en DCH/ml (dose combinée hémolytique) par l'inverse de la dilution du dernier tube donnant une hémolyse supérieure ou égale à 50 p. 100. L'obtention et le titrage des sérums références a été décrit (GUYONNET, PLOMMET, 1970).

3. Injections aux souris

Les toxines sont injectées à des souris (C. D. 1 Charles Rivers) réparties en groupes équilibrés en fonction de leur poids, par voie intrapéritonéale, sous des volumes allant de 0,25 ml à 0,8 ml. On note le nombre de souris mortes dans les 48 heures suivant l'injection et, dans certains cas, on suit l'évolution du poids des souris durant cette même période.

4. Examens histologiques

Les organes, foie, reins, rate, de certaines souris mortes sont prélevés et fixés dans la solution de Bouin.

Les examens histologiques de ces organes ont été effectués par le professeur C. LABIE.

RÉSULTATS

1. Activité létale des différentes fractions de toxine γ pour la souris

Des lots de 3 souris (âgées de 30 j, 21 \pm 1 g) reçoivent respectivement 0,25 ml de fraction γ I, 0,25 ml de fraction γ II, et 0,25 ml de fraction γ I mélangée à 0,25 ml de fraction γ II ; un lot témoin de 3 souris reçoit 0,25 ml de solution saline tamponnée.

L'activité hémolytique du mélange γ I + γ II est égale à 20 000 U/ml. Toutes les souris ayant reçu les fractions γ I et γ II séparées ainsi que les souris du lot témoin survivent. Les trois souris ayant reçu γ I + γ II meurent en moins de 26 h.

Pour vérifier si la toxicité n'est pas due à l'effet additif d'un facteur contenu

à la fois dans γ I et γ II, deux lots de 3 souris reçoivent respectivement 0,5 ml de γ I et 0,5 ml de γ II : les souris survivent.

On peut donc conclure, au moins à la concentration utilisée, que les toxines γ I et γ II ne sont pas létales pour la souris séparément mais qu'elles le sont en synergie.

2. Détermination de la DL_{50} de la toxine γ pour la souris

Les fractions γ I et γ II étant mélangées volume à volume, 4 lots de 6 souris reçoivent des doses décroissantes de toxine sous le volume de 0,5 ml. Le groupe témoin comprend 3 souris ayant reçu 0,5 ml de solution physiologique tamponnée.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 1 et la dose létale 50 est calculée par la méthode des logits, après contrôle de la validité de la réplication et de la linéarité de la réponse (TOOTILL, ROBINSON, ADAMS, 1967).

La dose létale 50 ainsi obtenue est égale à 7 100 U avec comme limites de l'intervalle de confiance 95 p. 100, 4 200 et 8 800.

TABLEAU I

Toxicité de la toxine γ pour la souris en fonction de l'activité hémolytique.

Dans cette expérience I/II = 1, la DL_{50} est égale à 7 100 unités

Doses en unités	Nombre d'animaux		Total		Mortalité
	vivants	morts	des vivants	des morts	
1 250	6	0	18	0	0
2 500	6	0	12	0	0
5 000	5	1	6	1	0,143
10 000	1	5	1	6	0,857

3. Relation entre activité hémolytique en fonction du rapport I/II et toxicité de la toxine γ

Les résultats ci-dessus sont obtenus pour un mélange des deux fractions volume à volume, ce rapport correspondant aux proportions dans lesquelles elles sont produites par la souche 5 R. Les fractions titrent chacune 800 DCH/ml.

Pour vérifier si la toxicité de la toxine γ est parallèle à son activité hémolytique, une courbe d'hémolyse en fonction de différents rapports de deux fractions à de nouveau été établie sur papier semi-logarithmique (fig. 1) et des lots de 9 souris ont reçu parallèlement 0,8 ml d'un mélange dans différentes proportions de fractions γ I et γ II.

Les résultats d'une expérience, parmi d'autres, portant sur des lots de 9 souris (4 de 60 jours, pesant 32 ± 2 g, 5 de 30 jours pesant 22 ± 2 g) sont reportés sur la figure 1 et l'on peut constater que l'activité toxique et l'activité hémolytique sont maximales pour un même rapport de fractions I et II, rapport qui est ici, étant donné les conditions de l'expérience, égal à 1, et qu'elles diminuent vers les valeurs extrêmes de ce rapport.

Par contre, si l'activité hémolytique donne une courbe symétrique par rapport à ce point, l'activité létale n'est pas liée à l'activité hémolytique. Par exemple, les rapports de I/II égaux à 0,5 et 2 donnent un titre de 7 800 U/ml ou 6 240 U par souris mais tuent respectivement 0 souris sur 9 et 6 souris sur 9.

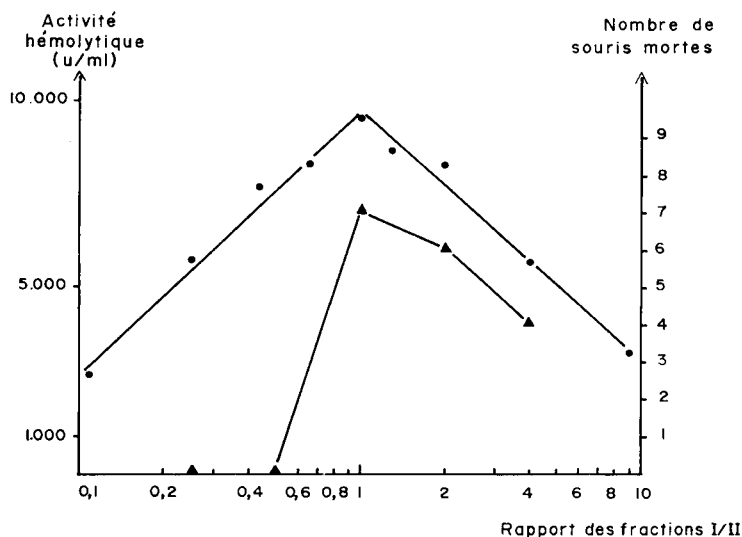


FIG. 1. — *Activité de la toxine γ en fonction des rapports des deux fractions I et II*

- activité hémolytique,
- ▲ toxicité pour la souris après injection de 0,8 ml de toxine par voie intrapéritonéale.

Les doses où la fraction I est dominante sont plus toxiques que celles où la fraction II est dominante.

Ce résultat est confirmé par les variations de poids des souris survivantes (tabl. 2) qui continuent à maigrir au bout de 48 h après injection de toxine pour les rapports I/II supérieurs à 1, alors qu'elles reprennent du poids entre 24 et 48 h pour les rapports I/II inférieurs à 1. La fraction I semble donc jouer un rôle prépondérant dans la toxicité de la toxine γ .

TABLÉAU 2

Influence du rapport I/II des deux fractions sur la toxicité de la toxine γ : nombre de morts et variation du poids des souris survivantes

Rapport I/II	Titre hémolytique de la toxine injectée (unités)	Nombre de morts sur 9	Variation de poids après 24 h (g)	Variation de poids entre 24 et 48 h (g)
0,25	4 480	0	- 3,2	+ 1,1
0,5	6 240	0	- 3,6	+ 0,9
1	8 000	7	- 4	+ 0,5
2	6 240	6	- 2,5	- 1,2
4	4 480	4	- 2,3	- 1

4. Examens histologiques

On retrouve chez tous les animaux observés les mêmes lésions à des degrés divers.

Foie : essentiellement, phénomènes de stase aiguë dans les capillaires radiés et des phénomènes moins nets de souffrance cellulaire avec densification de la chromatine, images de margination et rares figures de début de caryorrhixis dans les hépatocytes.

Rate : engouement massif de la pulpe rouge et nécrobiose diffuse des éléments libres et des éléments fixes de la pulpe blanche.

Rein : ici encore stase aiguë, surtout importante dans la zone cortico-médullaire et dans les flocules glomérulaires. De nombreux néphrocytes présentent un aspect granuleux et quelques noyaux un début de pycnose.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La toxine γ exerce sur la souris, en injection intrapéritonéale, une toxicité aiguë : les souris meurent souvent en quelques heures, toujours en moins de 36 h et les souris survivantes au-delà de cette période ne présentent aucun trouble apparent.

Les deux fractions γ I et γ II ne sont pas toxiques séparément mais agissent en synergie, phénomène qui caractérise également l'hémolyse due à la toxine γ . Cette observation suggère que les mêmes substances entrent en jeu dans les deux processus et que l'hémolyse *in vivo* est responsable au moins en partie de la toxicité de la toxine γ . Cependant les courbes d'hémolyse et de toxicité en fonction de différents rapports des deux fractions ne sont pas parallèles et l'hémolyse ne peut être tenue pour le seul phénomène intervenant dans la toxicité. Il est probable que la fraction I exerce *in vivo* une ou plusieurs autres activités toxiques. Nous savons déjà que la fraction I seule est leucotoxique sur polynucléaires humains et macrophages de lapin ; il n'est pas exclu qu'elle ait d'autres propriétés cytotoxiques, ou une activité pharmacodynamique sur certains tissus. L'examen histologique montre que la toxine γ (fractions I et II) provoque dans tous les organes observés un phénomène de stase aiguë notamment dans les capillaires du parenchyme rénal et suggère qu'elle agirait électivement au niveau de l'appareil circulatoire, les lésions cellulaires n'étant que secondaires.

Enfin la toxine γ n'est active sur la souris qu'à doses très importantes puisque la DL_{50} pour la souris (7 100 unités) correspond à la quantité de toxine récupérée dans environ 30 ml de surnageant d'une culture contenant 10^{10} germes par ml. Il est possible cependant que la toxine γ soit produite en plus grande quantité *in vivo* par de nombreuses souches et, s'il est à peu près certain qu'elle n'est pas un facteur déterminant de la virulence de ces souches, il n'est pas possible actuellement d'évaluer son importance relative parmi les autres facteurs exocellulaires élaborés par le Staphylocoque.

Reçu pour publication en juillet 1970.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le professeur Charles LABIE de l'École nationale vétérinaire de Toulouse pour les examens histologiques et les interprétations qu'il nous en a données.

SUMMARY

TOXICITY OF THE GAMMA TOXIN OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN MICE

The toxicity of staphylococcal gamma toxin for mice has been studied, using the two fractions γ I and γ II separately or together. The fractions were not toxic when tested singly. Mixed together, their toxicity was greatest in a ratio of 1 : 1 (LD₅₀, 48 hours : 7 100 units, 95 p. 100, confidence limits, 4 200-8 800) and it fell asymmetrically, unlike their hæmolytic activity, when other ratios were used. The lesion observed was acute capillary stasis, especially in the kidney. These two facts suggest that the toxic effect is at least not wholly due to the hæmolytic activity.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GLADSTONE G. P., 1966. Staphylococcal Toxins. Symposium on Staphylococci and Staphylococcal infections. Warsaw, *Postępy microbiologii*, **5**, 145-161.
- GUYONNET F., PLOMMET M., 1970. Hémolysine gamma de *Staphylococcus aureus*. Purification et propriétés. *Ann. Inst. Pasteur*, **118**, 19-33.
- PLOMMET M., BOUILLANNE C., 1966. Production des hémolysines staphylococciques delta et gamma. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **65**, 529-532.
- SMITH D. D., 1962. Experimental infection in mice. *J. Path. Bact.*, **84**, 359-365.
- TOOTILL J. P. R., ROBINSON W-D., ADAMS A. G., 1967. Precalculated ED₅₀, PD 50 and DL 50, statistics. *International Symposium on Biological Assay Methods of vaccines and sera*, London, 1967 ; *Symp. series immunobiol. standard*, vol. 10, p. 183-220 (S. Karger, Basel New York, 1969).
-