

# ACTIVITE SUCCINODESHYDROGENASIQUE DE PASTEURELLA PESTIS, SOUCHE E.V.

## I. — ETUDE COLORIMETRIQUE

A. DODIN et E. R. BRYGOO

Divers auteurs, dont LARON, DUTCHER, KRETOVICIL, PORTER, CORRELL, testent l'aptitude germinative de certaines graines par la recherche de leur activité succinodéshydrogénasique au moyen des sels de tétrazolium.

Nous avons cherché s'il n'était pas possible d'utiliser une réaction semblable pour l'étude de la vitalité d'une culture bactérienne et plus particulièrement de la souche E.V. de *Pasteurella pestis*.

Différents auteurs (1) se sont intéressés récemment à l'activité enzymatique de *P. pestis* et ont, en particulier, signalé son action succinodéshydrogénasique.

### MATERIEL ET METHODE

Nous avons adapté la technique histochimique de FARBER et coll. (2) à l'étude d'une suspension microbienne.

Les germes : souche E.V. de *Pasteurella pestis*. La numération des germes est faite par néphélométrie à l'électrophotomètre de METNIER (cuve Djourbel, écran 43).

Le milieu d'incubation réparti en tube pyrex de 12 mm est composé de :

Eau distillée .....	0,5 ml
Tampon phosphate de K 0,1 M pH 7,4.....	1 ml
Ca Cl <sub>2</sub> 0,004 M.....	0,30 ml
CO <sub>2</sub> HNa 0,6 M.....	0,15 ml
Néotétrazolium (+) (1 mg ml).....	0,7 ml
Bleu de méthylène (1 mg ml).....	0,05 ml
Succinate de Na 0,5 M.....	0,3 ml

Le bain-témoin est identique mais le succinate y est remplacé par 0,3 ml d'eau distillée.

Les germes, lavés trois fois à l'eau distillée, sont introduits dans le tube réaction et dans le tube témoin au temps 0. Les tubes sont aussitôt placés à l'étuve à 37° sous atmosphère d'azote. Après une heure d'incubation, ils sont retirés de l'étuve et centrifugés pendant une minute.

(1) — Chlorure de 2,2'-(p-diphénylène)-bis-2-(3,5-diphényl)-Tétrazolium

Les germes ont réduit et fixé le néolétrazolium sous forme de formazan en des grains rouge pourpre observables à l'intérieur des corps microbiens. Ils se collectent au fond du tube. Le formazan est alors extrait par l'acétone et l'intensité de la coloration est évaluée à l'électrophotomètre MERNER (type Rufisque, écran 47).

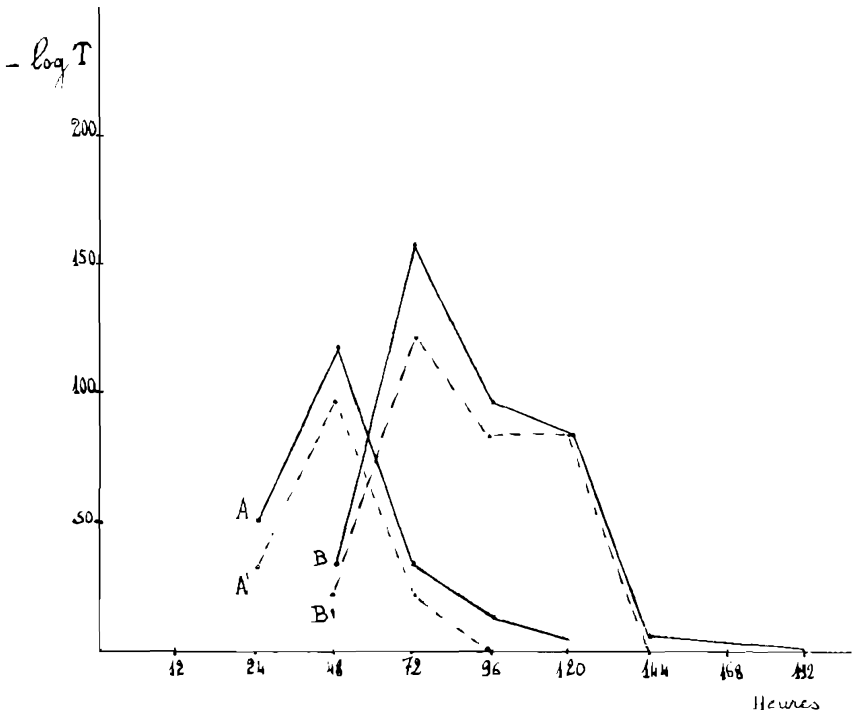
Le témoin doit demeurer incolore.

## RESULTATS

### 1° Sensibilité de la réaction

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de germes. La limite inférieure de la réaction est atteinte avec une concentration de germes de l'ordre de  $8 \cdot 10^6$  germes au ml d'une culture de *Pasteurella pestis*, souche E.V.

### 2° La succinodéshydrogénase au cours de la croissance d'une culture de *P. pestis* souche E.V. à 37° et à 26°



GRAPHIQUE 1

Activité succinodéshydrogénasique rapportée à  $10^7$  germes par ml :

- A E.V. culture à 37°;
- A' germes lysés;
- B 26°;
- B' germes lysés

## Graphique n° 1, courbe A et B.

À 37°, durant les douze premières heures, la réduction du sel de tétrazolium est aussi intense chez le témoin que dans le tube réaction avec succinate. Il faut vraisemblablement y voir l'intervention de systèmes enzymatiques non spécifiques. Au cours de l'important travail de synthèse des bactéries en phase de croissance, apparaissent de très nombreux groupements sulfhydriles qui peuvent réduire le réactif d'une manière non spécifique. La spécificité de la réaction n'apparaît qu'à la vingt-quatrième heure. L'activité succinodéshydrogénasique observable par cette méthode passe par un sommet vers la quarante-huitième heure pour s'annuler après cent vingt heures de culture.

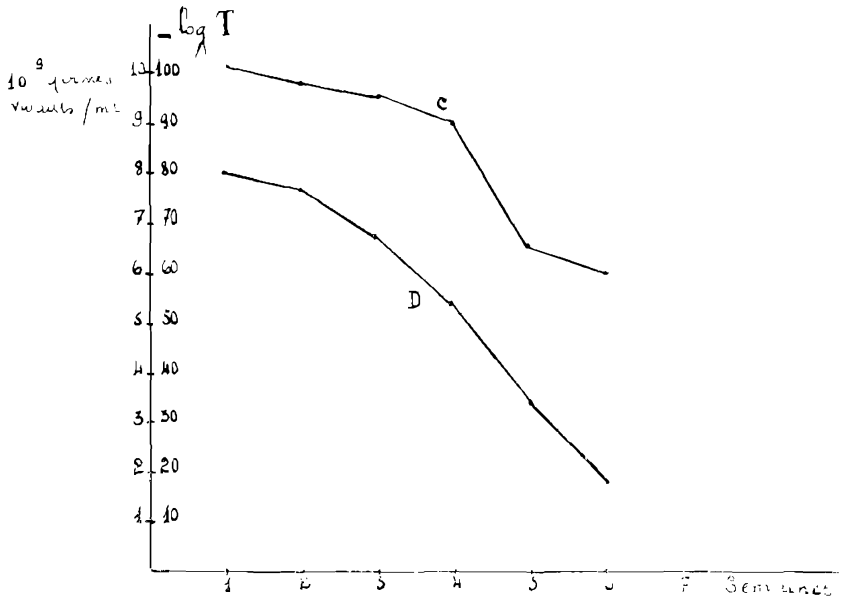
À 26°, les enzymes non spécifiques restent présents jusqu'à la vingt-quatrième heure. L'intensité maximum de la réaction succinodéshydrogénasique observable n'apparaît qu'après soixante-douze heures pour tendre vers 0 après cent quatre-vingt-douze heures de culture.

Nous avons lysé les germes par une triple congélation-décongélation brutale. L'activité succinodéshydrogénasique fut nettement réduite par rapport à l'activité témoin. Graphique n° 1, courbe A' et B'.

### *3. Variation de l'activité succinodéshydrogénasique d'une suspension concentrée de vaccin E.A. conservée à 4°*

Les bacilles récoltés après soixante-douze heures de culture à 26° sont conservés à 4° sous forme d'une suspension concentrée renfermant 80, 10 germes au ml.

Le nombre des germes vivants est mesuré par culture en dilutions sériées chaque semaine durant six semaines. Parallèlement, nous avons cherché les variations de l'activité succinodéshydrogénasique au fur et à mesure du vieillissement de la suspension. Un parallélisme assez étroit semble exister entre le nombre de germes vivants de la suspension et son activité succinodéshydrogénasique au même degré de vieillissement. Graphique n° 2, courbe C et D.



GRAPHIQUE 2

Activité en fonction du vieillissement :

C activité enzymatique;

D nombre de germes vivants.

## CONCLUSIONS

Nous avons recherché par une méthode colorimétrique les variations de l'activité succinodéshydrogénasique de la souche E.V. de *Pasteurella pestis* au cours de la croissance de la culture bactérienne et au cours de son vieillissement pendant six semaines.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Les références concernant l'activité succinodéshydrogénasique de *P. pestis* seront données avec une note ultérieure.
- (2) FARBER E., STERNBERG W. H. et DUNLAP C. E. - Histochemical localisation of specific Enzymes. IV. Soluble oxydation-reduction dyes as aids in the histochemical localisation of oxydation enzymes with Tetrazolium salts. J. Histochem. Cytochem. U.S.A. 1956, 4, 347-56.