

UNIVERSITE D'ALGER

I.N.E.S.S.M. D'ALGER - DEPARTEMENT DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PATHOGENIE DU  
CHOLERA :  
ETUDE COMPAREE DE LA PRODUCTION  
D'ENTEROTOXINE ET DE CERTAINES ENZYMES CHEZ  
VIBRIO CHOLERAEL TOR ET LES VIBRIONS  
NON AGGLUTINABLES



THESE

Pour le Doctorat en Sciences Médicales  
Présentée et Soutenue Publiquement

Le ..... 1985

Par

**Madame Zehor GUECHI née BOULMERKA**

Maître-Assistante en Microbiologie

Directeur de Thèse : Professeur F. BOULAHBAL

Thèse N°

32-610-

32-610-52-1

UNIVERSITE  
D'ALGER

I.N.E.S.S.M. D'ALGER  
DEPARTEMENT DE PHARMACIE

Th. 61-313

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PATHOGENIE DU CHOLERA :  
ETUDE COMPAREE DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE ET DE  
CERTAINES ENZYMES CHEZ VIBRIO CHOLERAEL TOR ET LES  
VIBRIONS NON AGGLUTINABLES

A mes enfants  
T H E S E

Pour le Doctorat en Sciences Médicales  
Présentée et soutenue publiquement  
Le ..... 1985



Par

Madame Zehor GUECHI née BOULMERKA  
Maître-Assistante en Microbiologie

Directeur de thèse : Professeur F. BOULAHBAL

Thèse N°

A mes parents,

A mon mari

*Ce travail a été financé par l'Institut Pasteur  
d'Algérie (Laboratoire Choléra-Recherche) ; Directeur Général ;*

*Monsieur le Professeur BENGHASSINE*

A mes enfants

A toute ma famille

*Ce travail a été entièrement financé par l'Institut Pasteur  
d'Algérie (Laboratoire Choléra-Recherche) : Directeur Général :*

*Monsieur le Professeur BENHASSINE*

INTRODUCTION

La pandémie annuelle de choléra, qui a débuté en 1951 et affecté l'Algérie en 1971 (94), a suscité un regain d'intérêt pour cette maladie pendant si ancienne.

En effet, de nombreux travaux de recherche ont été depuis entrepris, pour mieux connaître la pathologie, les agents responsables, et l'épithémiologie de cette affection. Le but de ces travaux était de mettre au point des moyens prophylactiques adaptés et, plus particulièrement, un vaccin efficace.

Ces travaux ont permis, certes, d'apporter des réponses à beaucoup de questions mais certains points restent à élucider :

1. - En ce qui concerne la période, on sait actuellement que le syndrome cholérique est dû à une toxine spécifique enterotoxigène de la bactérie *Vibrio cholerae*. Cette toxine, dont les propriétés sont à l'heure actuelle bien connues, résulte à elle seule toute la symptomatologie de choléra (9, 41, 49; 51; 142).

On sait, également, que lors de l'intoxication naturelle par les germes responsables de choléra, deux phénomènes successifs doivent intervenir pour qu'il y ait syndrome cholérique :

- l'absorption des bactéries, après la traversée de la barrière constituée par le mucus, sur cellules épithéliales intestinales,

- la fixation, indispensable, de la toxine cholérique par les gangues à des récepteurs spécifiques en surface de cellules épithéliales intestinales (2, 54; 67, 75, 103, 109, 121, 136).

La pandémie actuelle de choléra, qui a débuté en 1961 et atteint l'Algérie en 1971 (93), a suscité un regain d'intérêt pour cette maladie pourtant si ancienne.

En effet, de nombreux travaux de recherche ont été depuis entrepris, pour mieux connaître la pathologie, les agents responsables, et l'épidémiologie de cette affection. Le but de ces travaux était de mettre au point des moyens prophylactiques adéquats et plus particulièrement, un vaccin efficace.

Ces travaux ont permis, certes, d'apporter des réponses à beaucoup de questions mais certains points restent à éclaircir :

1. - En ce qui concerne la pathologie, on sait actuellement que le syndrome cholérique résulte de l'action d'une exotoxine appelée entérotoxine cholérique, élaborée par les germes responsables de la maladie. Cette toxine, dont les propriétés sont à l'heure actuelle bien connues, reproduit à elle seule toute la symptomatologie du choléra (9, 47, 48, 51, 142).

On sait, également, que lors de l'infection naturelle par les germes responsables du choléra, deux phénomènes successifs doivent intervenir pour qu'il y ait syndrome cholérique :

- l'adhésion des bactéries, après la traversée de la barrière constituée par le mucus, aux cellules épithéliales intestinales,

- la fixation, indispensable, de la toxine élaborée par les germes à des récepteurs spécifiques se trouvant au niveau de cellules épithéliales intestinales (6, 54, 67, 75, 103, 109, 127, 136).

Cependant, il semblerait que l'entérotoxine ne soit pas la seule substance, élaborée par les vibrions, qui ait un rôle dans la pathogénie du choléra. En effet, certains auteurs pensent que dans l'infection naturelle, d'autres substances peuvent intervenir soit lors de la première étape, à savoir l'adhésion des bactéries, soit lors de la seconde, c'est-à-dire la fixation de la toxine au niveau des récepteurs, favorisant ainsi l'action des germes. Mais ces substances ne sont pas bien définies à l'heure actuelle. Certaines enzymes ont été incriminées mais leur rôle reste controversé. Ce sont la neuraminidase, la mucinase et la lécithinase (69, 75, 83, 100, 101, 125, 137).

2. - En ce qui concerne l'étiologie du choléra, deux germes de l'espèce *Vibrio cholerae* sont actuellement reconnus comme agents de cette maladie : *Vibrio cholerae* biotype *cholerae* et *Vibrio cholerae* biotype *eltor* (vibrions cholériques O1) (149). Un autre groupe de germes, faisant partie de la même espèce et communément dénommés *Vibrions non agglutinables* (NAG) appelés récemment vibrions non groupe O1 (149), posent un problème quant à leur rôle pathogène. Ces germes ont été souvent isolés des selles de malades présentant des syndrômes cholériformes dans de nombreux pays, y compris l'Algérie (2, 66, 92). Cependant, comme les vibrions N.A.G. n'ont jamais causé d'épidémies de choléra, ils ne sont pas considérés officiellement comme agents de cette maladie.

Mais, ne pourrions-nous, dans l'avenir observer avec ces germes le même phénomène déjà vu avec les *Vibrio cholerae* biotype *eltor* ? Ces *Vibrio cholerae* biotype *eltor* avant l'actuelle pandémie, étaient considérés comme non pathogènes ou du moins, non responsables du choléra, bien qu'ils aient été isolés de malades présentant des syndrômes cholériques (41).

Ceci pourrait survenir avec les vibrions N.A.G. d'autant plus que ces derniers semblent avoir le même mécanisme de pathogénicité que les agents du choléra puisqu'ils produisent la même entérotoxine (26, 64, 69, 132, 151). Un intérêt doit donc leur être porté au même titre que les *Vibrio cholerae biotype eltor*.

3. - L'actuelle pandémie de choléra est caractérisée par l'existence au cours des épidémies, de porteurs sains de *Vibrio cholerae*. Ces porteurs sains jouent certainement un rôle non négligeable dans la transmission de la maladie (3, 31, 39, 97). Cet état de "porteur" est-il lié à des caractères inhérents aux souches isolées chez les "porteurs", et particulièrement à la non production des substances incriminées dans la pathogénie du choléra ?

4. - Sur le plan technique, la production in vitro de l'entérotoxine cholérique pose certains problèmes : en fonction du milieu utilisé, il y a une variabilité d'une souche à une autre ; le milieu favorable à l'une peut être défavorable à l'autre (17, 19, 114). Le choix d'un milieu permettant une bonne production de l'entérotoxine par un maximum de souches reste donc à déterminer.

Les techniques de mise en évidence de l'entérotoxine cholérique font appel à différents tests in vivo sur différents animaux et à des test in vitro utilisant différentes techniques immunologiques (25, 68, 105, 117, 145). Mais ces techniques ne sont pas toutes facilement praticables. Chaque laboratoire utilise l'une ou l'autre selon ses possibilités.

C'est dans le but d'apporter notre contribution à la recherche d'une solution aux différents problèmes posés que nous avons entrepris ce travail dans lequel nous nous proposons :

1. - D'effectuer une étude comparative de certains milieux de culture et de certaines techniques utilisés pour la mise en évidence de la production de l'entérotoxine cholérique in vitro. Ceci nous permettra de déterminer le milieu et les techniques, qui tout en donnant de bons résultats sont facilement praticables dans nos laboratoires.
2. - D'effectuer une étude comparative de la production par les *Vibrio cholerae biotype eltor* et les vibrions dits non agglutinables, de l'entérotoxine et de 3 enzymes incriminées dans la pathogénicité des vibrions, à savoir : la mucinase, la lécithinase et la neuraminidase.
3. - D'effectuer une étude comparative de la production de ces substances par des souches de *Vibrio cholerae biotype eltor* et des vibrions non agglutinables isolées chez les sujets hospitalisés pour syndrome cholérique et par celles isolées chez des "porteurs sains" afin de déterminer le rôle de ces substances dans la pathogénie des vibrions.
4. - D'étudier l'influence de chacune des trois enzymes sur la réponse à l'administration de l'entérotoxine; par des test in vivo.

CHAPITRE I

Mais, avant d'exposer les résultats de notre étude, nous allons tout d'abord effectuer, dans une première partie, un rappel sur l'épidémiologie, la bactériologie et la pathogénie du choléra. Dans une deuxième partie, nous traiterons le matériel et les méthodes utilisés pour notre étude. Les résultats de notre travail seront exposés dans une troisième partie qui sera suivie de la discussion.

RAPPELS

SUR

LA BACTERIOLOGIE

L'EPIDEMIOLOGIE

ET LA PATHOGENIE

DU CHOLERA

CHAPITRE I

RAPPELS  
SUR  
LA BACTERIOLOGIE ,  
L'EPIDEMIOLOGIE  
ET LA PATHOGENIE  
DU CHOLERA

En effet, dans sa monographie sur le choléra, Pollitzer (112) fait état d'écrits très anciens relatant l'existence du choléra dans l'Inde antique. Cette maladie restait toutefois localisée dans cette région et aucun écrit n'a fait mention de son extension vers l'Ouest jusqu'en 1917, date à laquelle le choléra sortit de son foyer d'origine, le Delta du Gange, pour s'étendre vers l'Ouest, atteignant l'Europe en passant par l'Afrique. Ce fut la première pandémie. De 1817 à 1923, six pandémies survinrent qui causèrent des pertes humaines se comptant par millions (112).

A l'issue de la dernière pandémie, le choléra se retira dans son foyer d'origine où il resta confiné, à l'exception de quelques poussées épidémiques en Iran (en 1939), en Egypte et en Syrie (1947 - 1948). Partout ailleurs, le choléra avait disparu (78).

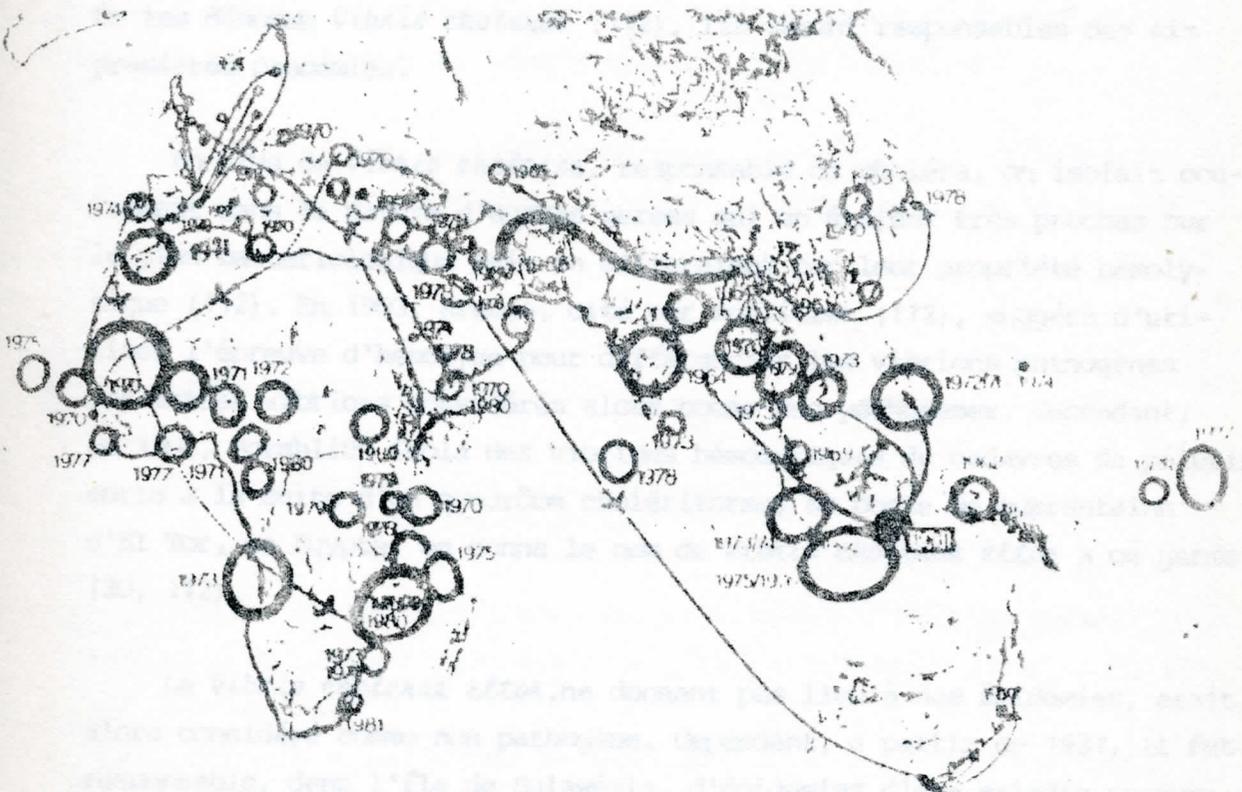
En 1960 apparut l'actuelle pandémie, la septième, dont le point de départ se situait, non pas aux Indes comme pour les précédentes, mais dans l'île de Sulawésie, dans l'Archipel des Célèbres. De là, elle se prorogea vers l'Ouest, atteignant les pays du Moyen Orient, l'Afrique, et quelques pays d'Europe. L'Algérie a été atteinte pour la première fois en 1971. Depuis, chaque année, des milliers de cas de choléra sont diagnostiqués dans le monde (38, 57, 78, 79, 93).

La figure 1 nous présente l'extension de l'actuelle pandémie du choléra dans le monde de 1961 à 1981 d'après Jusatz (131).

#### 1. 2. 2. - Les agents responsables du choléra

Dès le début de ces pandémies meurtrières, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris pour découvrir l'agent responsable du choléra.

Figure 1 : Choléra dans le monde de 1961 à 1981  
d'après Jusatz (131)



En 1845, Pancini affirmait avoir trouvé dans l'intestin de victimes de choléra un "microbe cholérigène". Ces particules retrouvées dans des déjections fraîchement émises étaient douées d'une grande mobilité. Mais ce n'est qu'en 1883, que Koch isola et cultiva des germes qu'il appela "Komma Bazili" (bacilles en virgule), à partir des lésions intestinales de morts de choléra, à Alexandrie. Il retrouva les mêmes germes dans les selles de malades atteints de choléra à Calcutta. Ces germes furent reconnus comme l'agent du choléra. On les dénomma *Vibrio cholerae* (112). Ils furent responsables des six premières pandémies.

En plus de *Vibrio cholerae*, responsable du choléra, on isolait couramment dans la nature d'autres germes qui en étaient très proches sur le plan bactériologique mais en différaient par leur propriété hémolytique (112). En 1903, Krauss, cité par Pollitzer (112), suggéra d'utiliser l'épreuve d'hémolyse pour différencier les vibrions pathogènes des autres vibrions considérés alors comme non pathogènes. Cependant, en 1906, Gotshlich isola des vibrions hémolytiques de cadavres de pèlerins morts à la suite d'un syndrome cholériforme, au poste de quarantaine d'El Tor, en Egypte, on donna le nom de *Vibrio cholerae eltor* à ce germe (30, 112).

Le *Vibrio cholerae eltor*, ne donnant pas lieu à des épidémies, était alors considéré comme non pathogène. Cependant, à partir de 1937, il fut responsable, dans l'île de Sulawésie, d'épidémies d'une maladie ressemblant au choléra. Cette maladie à laquelle on donna le nom de "paracholera" devenait endémique dans cette île (30, 41, 57).

En 1960, *Vibrio cholerae eltor* sortit de son foyer d'origine dans les îles Célèbes, pour causer des épidémies dans le centre de l'Asie entre 1961 et 1963.

Force était alors aux autorités sanitaires internationales de changer d'opinion vis-à-vis de ce *Vibrio cholerae eltor* et de le considérer comme germe pathogène, responsable d'une maladie indissociable du choléra classique dû aux vibrions isolés par Koch (30, 57).

*Vibrio cholerae eltor* est le germe responsable de l'actuelle pandémie de choléra qui a donc débuté en 1961 (79). Il a été retrouvé comme seul agent du choléra dans tous les pays atteints au cours de cette pandémie sauf dans les foyers d'origine des vibrions cholériques classiques (Bengladesh, Afganistan, Inde) où ces derniers continuent à être isolés parallèlement au *Vibrio cholerae eltor* (79, 120).

A l'heure actuelle, *Vibrio cholerae* isolé par Koch et *Vibrio cholerae eltor* sont reconnus comme agents d'une même maladie : le choléra.

## 2. - RAPPEL BACTERIOLOGIQUE

### 2. 1. - Définition et classification des germes responsables du choléra

D'après la 8ème édition du Bergey's Manual (129), les germes responsables du choléra font partie de l'espèce *Vibrio cholerae*, famille des *Vibrionaceae*.

Cette espèce est constituée de bacilles à Gram négatif, incurvés. Ils sont mobiles grâce à un seul flagelle polaire.

L'espèce *Vibrio cholerae* comprend 4 biotypes :

- 2 biotypes non pathogènes pour l'homme : les biotypes *proteus* et *albensis* ;

- 2 biotypes responsables du choléra :

. Le biotype cholerae, appelé également vibriion cholérique, classique ou asiatique. Il correspond au germe isolé par Koch.

. Le biotype eltor.

A ces 4 groupes reconnus officiellement comme faisant partie de l'espèce *Vibrio cholerae*, il faut ajouter celui des vibrions dits "non agglutinables". Ces germes dont il n'est pas fait mention de façon précise dans le Bergey's Manuel ont les mêmes principaux caractères biochimiques que les germes responsables du choléra. Ils n'en diffèrent que par leur structure antigénique (118). Le rôle pathogène de ces germes n'est également pas bien défini. Souvent isolés des eaux (40), ils ont été incriminés dans des cas de toxiinfections alimentaires et de diarrhées cholériformes dans différents pays dont l'Algérie (2, 66, 92).

## 2. 2. - Principaux caractères biochimiques des germes responsables du choléra

Les germes responsables du choléra sont des germes aéro-anaérobie facultatifs. Ils dégradent le glucose par voie fermentative sans production de gaz. Ils possèdent une cytochrome oxydase et une nitrate reductase qui réduit les nitrates au stade de nitrites.

Ils possèdent une lysine et une ornithine décarboxylases mais pas d'arginine déshydrogénase.

Les caractères qui permettent de différencier les biotypes eltor et cholerae sont : la fermentation du glucose par voie de l'acetyl methyl carbinol (réaction de VP) (57) le pouvoir hémagglutinant (HA) et hémolytique (HYSE) vis-à-vis des globules rouges de moutons (49, 57),

la résistance à la polymixine B et au cholérage IV de Mukerjee (59, 99), ces 2 derniers caractères étant les plus constants (58) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractères différentiels de *Vibrio cholerae* biotypes *Cholerae* et *elton*

| Biotype  | V P   | H A   | H Y S E | Résistance polymixine B | Résistance au phage IV |
|----------|-------|-------|---------|-------------------------|------------------------|
| Cholerae | -     | -     | -       | sensible                | sensible               |
| Elton    | + (-) | + (-) | + (-)   | résistant               | résistant              |

### 2. 3. - Structure antigénique

Les vibrions cholériques possèdent deux types d'antigènes constitutifs : l'antigène flagellaire ou antigène H et l'antigène somatique ou antigène O.

- L'antigène H est de nature protéique, thermolabile. Cet antigène H, commun à toute l'espèce *Vibrio cholerae* ne présente pas d'intérêt pratique pour le diagnostic (119).

- L'antigène O de nature glucido-lipidoprotéique est localisé au niveau de la paroi des bactéries. Il correspond à l'endotoxine des vibrions. Il est thermostable, et donne lieu à la formation d'anticorps agglutinants (119).

Une première étude de la structure antigénique O de l'espèce *Vibrio cholerae* a été faite pour la première fois par Gardner en 1935. Elle a permis de déterminer 6 groupes (61). Des études plus récentes, faites par Sakazaki en 1970 (119) et Smith en 1975 (133), ont permis de déterminer respectivement 39 et 75 groupes O.

Dans toutes ces études, le groupe O1 correspond aux biotypes eltor et cholerae qui ont donc la même structure antigénique O1. Les autres groupes correspondent aux vibrions dit "non agglutinants" (ainsi dénommés parcequ'ils n'agglutinent pas avec le sérum du groupe O1).

Le groupe O1 se subdivise en 3 sérotypes : Ogawa, Inaba et Hikojima.

Actuellement, une nouvelle dénomination est adoptée pour les vibrions cholériques en fonction de leur structure antigénique O, c'est ainsi que *Vibrio cholerae eltor* et *cholerae* sont dénommés *Vibrio cholerae* O groupe 1 ou *Vibrio cholerae* O1 ; les vibrions autrefois appelés "non agglutinables" sont appelés *Vibrio cholerae* "non O groupe 1" ou *Vibrio cholerae non O1* (149).

Dans la suite de notre travail, nous continuerons, par commodité, à désigner les vibrions non O groupe 1 par leur ancienne dénomination à savoir *Vibrions cholériques non agglutinables* (vibrions N.A.G.).

#### 2. 4. - Substances élaborées par les vibrions

Les vibrions cholériques élaborent un certain nombre de substances (16, 102, 130) parmi lesquelles, celles qui ont ou qui pourraient avoir un rôle dans la pathogénie du choléra sont : l'entérotoxine, la mucinase, la neuraminidase et la lécithinase.

## 2. 4. 1. - L'entérotoxine cholérique

### 2. 4. 1. 1. - Découverte de l'entérotoxine

C'est Koch qui, dès 1884, a émis l'hypothèse que le choléra serait dû à l'élaboration par les vibrions cholérique "d'un poison spécifique" qui serait une exotoxine (112). Mais tous les travaux entrepris alors aboutirent à la conclusion que le seul produit élaboré par les vibrions et auquel les auteurs attribuaient un rôle dans la pathogénie du choléra était l'endotoxine.

Cette endotoxine de nature glucido-lipido-protéique, thermostable a les propriétés générales des endotoxines des germes à Gram négatif (15, 16, 17).

Donc jusqu'en 1950, l'hypothèse de Koch quant à l'élaboration d'une exotoxine par les vibrions a été écartée.

En fait, tous les travaux entrepris pour comprendre la pathogénie du choléra se heurtaient à la difficulté de trouver des animaux d'expérience capables de reproduire uniformément la principale manifestation du choléra à savoir la diarrhée.

Tous les auteurs s'accordent à dire que ce sont les travaux de De et Dutta dans les années 1953-1960 qui, en réintroduisant des techniques et des animaux d'expérience déjà utilisés, ont permis des progrès dans l'étude du mécanisme de pathogénicité des vibrions (43). Ces techniques sont : l'injection directe, à l'intérieur de segments ligaturés d'intestin de lapin, et l'administration par voie orale à de jeunes lapereaux, soit de germes vivants soit de filtrat de culture (27, 28, 29, 35, 148).

La manifestation du syndrome cholérique va se traduire par : une accumulation de liquide à l'intérieur du segment, qui se distend, dans la technique d'intestin ligaturé de lapin, et un syndrome diarrhéique chez les lapereaux.

Ces travaux confirmés par d'autres auteurs (50, 108) ont, de plus, permis de démontrer que le produit contenu dans le filtrat de culture était une toxine différente de l'endotoxine, thermolabile, et n'agissait qu'au niveau de l'intestin grêle.

Cette toxine, appelée tout d'abord procholérage A (44, 50), fut purifiée en 1969 par Finkelstein et Lospalluto et dénommée cholérage puis entérotoxine (47, 51). Simultanément, ces auteurs purifièrent aussi une autre substance, semblable antigéniquement à la toxine mais non toxique qui fut appelée cholérageoïd (47, 73).

En 1965, Craig trouva dans le filtrat de culture de vibrions cholériques et dans les selles de malades atteints de choléra, un produit thermolabile qui, injecté par voie intradermique à des lapins ou à des cobayes provoquait une lésion indurée et érythémateuse au point d'inoculation, due à une augmentation de la perméabilité capillaire. Ce produit fut appelé facteur de perméabilité ou "*permeability factor*" (PF) ou "*skin toxin*" (25). Lorsque la toxine fut hautement purifiée, il s'avéra que ce phénomène était lié directement à l'activité de la toxine injectée par voie intradermique (48, 51, 98).

La première preuve que la toxine contenue dans le filtrat de culture de vibrions cholériques est capable de reproduire la symptomatologie du choléra chez l'homme, en l'absence de tout germe vivant, a été apportée par Benyajati en 1966 (9).

La partie B n'est donc qu'un agrégat de ces sous-unités. Le nombre de ces sous-unités varie de 5 à 8, selon les auteurs (45, 72, 140).

La toxine et le choléragénoid sont antigéniques (72). Les anticorps formés après immunisation par la toxine entière réagissent aussi bien avec l'une qu'avec l'autre (72).

Les fractions A et B prises séparément ne sont pas toxiques, mais associées, elles reproduisent la symptomatologie du choléra. Le même résultat est d'ailleurs obtenu lorsqu'on associe la fraction A au choléragénoid (45).

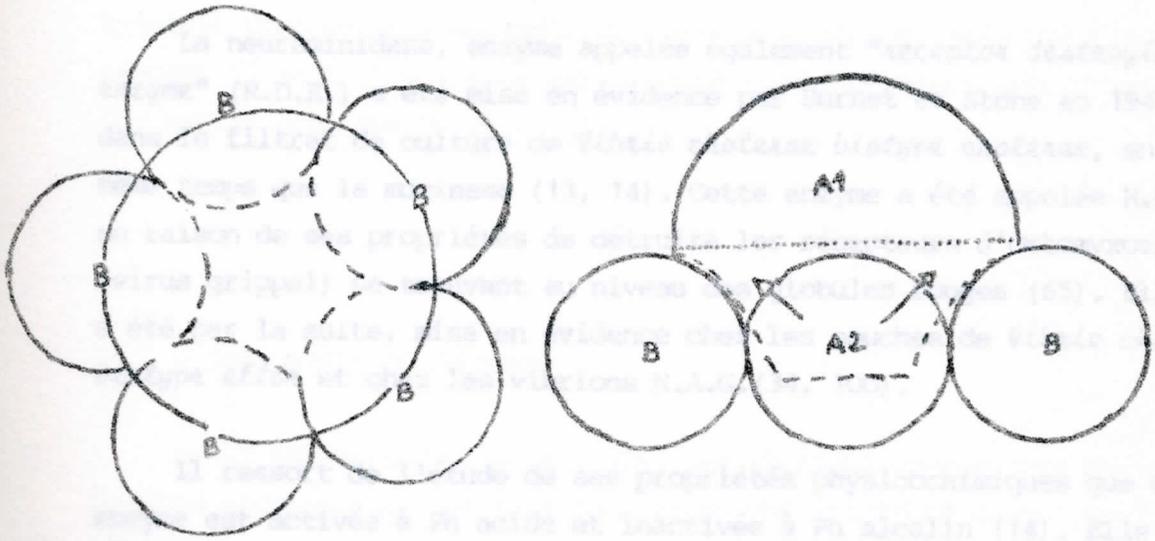
Prises séparément, aussi bien la fraction A que la fraction B de la toxine sont antigéniques (141). Cependant, les anticorps formés après immunisation par la molécule entière, réagissent très bien avec la fraction B mais très peu avec la fraction A (140, 141). Le fait que la fraction A ne soit pas immunogène dans la molécule entière s'expliquerait par la disposition spatiale des fractions A et B : la molécule entière de toxine cholérique se présenterait sous forme d'anneau formé de sous unités B entourant la fraction A (142) (cf. figure 2).

#### 2. 4. 2. - La mucinase

La production de la mucinase par les vibrions cholériques a été mise en évidence pour la première fois par Burnet en 1947 dans le filtrat de culture (13). Les premiers travaux ont été effectués à l'aide de *Vibrio cholerae* biotype *cholerae*. Par la suite, cette enzyme a été retrouvée chez les vibrions dits "non agglutinables" et les vibrions cholériques biotype *eltor* (131).

La neuraminidase agit sur différentes enzymes dont les neurones du cortex intestinal (13) et l'émulsine. Cette dernière est utilisée comme substrat pour la mise en évidence de cette enzyme in vitro (12).

Figure 2 : Diagramme montrant un arrangement possible des sous-unités dans la molécule de toxine cholérique d'après S. Van Heymingen (142)



Plan

Elevation

La neuraminidase, qui est une acylneuraminyl hydrolase (EC 3.2.1.16) (123) agit sur les glycoprotéines et les glycolipides en libérant de l'acide acétylneuraminique (121, 124).

La mucinase agit sur différentes mucines dont les mucines du mucus intestinal (13) et l'ovomucine. Cette dernière est utilisée comme substrat pour la mise en évidence de cette enzyme in vitro (12).

L'étude des propriétés de cette enzyme a montré qu'elle est active à Ph alcalin, et inactivée à Ph acide (13). Elle est antigénique et donne lieu à la formation d'anticorps neutralisant son activité in vitro (12, 13).

#### 2. 4. 3. - La neuraminidase

La neuraminidase, enzyme appelée également "*receptor destroying enzyme*" (R.D.E.) a été mise en évidence par Burnet et Stone en 1947 dans le filtrat de culture de *Vibrio cholerae biotype cholerae*, en même temps que la mucinase (13, 14). Cette enzyme a été appelée R.D.E. en raison de ses propriétés de détruire les récepteurs d'Ortomyxovirus (virus grippal) se trouvant au niveau des globules rouges (65). Elle a été par la suite, mise en évidence chez les souches de *Vibrio cholerae biotype eltor* et chez les vibrions N.A.G. (34, 100).

Il ressort de l'étude de ses propriétés physicochimiques que cette enzyme est activée à Ph acide et inactivée à Ph alcalin (14). Elle est thermolabile (détruite par chauffage pendant 30 mn à 56°C) (14). Elle est antigénique et donne lieu à la formation d'anticorps neutralisant son activité in vitro (60, 128).

La neuraminidase, qui est une acylneuraminyl hydrolase (EC 3.2.1.18) (121) agit sur les glycoprotéines et les glycolipides en libérant de l'acide N acétyl neuraminique (121, 124).

### 3. 1. - Adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale

L'adhésion aux villosités intestinales est une étape indispensable pour l'expression de la pathogénicité des germes (54, 103, 127) ; ceux qui n'adhèrent pas, bien qu'ils se multiplient et excrètent une toxine dans la lumière intestinale, ne sont pas pathogènes (6, 67, 136). On pense que l'adhésion permet aux germes d'une part de ne pas être éliminés d'autre part de produire la toxine près des sites récepteurs (109). Cette adhésion n'a lieu qu'après que les bactéries aient traversé la couche de mucus qui enrobe la muqueuse intestinale (127).

Jusqu'à présent, deux facteurs ont été incriminés comme pouvant faciliter la pénétration des bactéries dans le gel du mucus : la mobilité du germe et le chimiotactisme (6, 55, 56, 67, 127).

Les facteurs d'adhésion n'ont pas été identifiés. Certains auteurs ont attribué ce rôle au flagelle (67).

### 3. 2. - Action de l'entérotoxine cholérique

Une fois fixées, les bactéries vont produire l'entérotoxine cholérique qui, en fait, est responsable de toute la symptomatologie du choléra. Les deux fractions A et B de l'entérotoxine sont indispensables à son activité (45).

Par sa fraction B, la toxine va se fixer à des récepteurs spécifiques se trouvant au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales intestinales. Ces sites récepteurs ont été identifiés comme étant des mono-sialosyl-gangliosides, appelés GM<sub>1</sub> (72, 81, 140, 143).

La fixation constitue la première étape de l'activité de la toxine (75, 109). Elle est irréversible (138, 144). Cette fixation aux récepteurs se fait molécule à molécule (74).

Après fixation, la toxine va exercer son activité biologique par l'intermédiaire de sa fraction A (72, 142). Le polypeptide  $A_1$  se détache de la molécule et pénètre dans le cytoplasme de la cellule épithéliale intestinale. Il active alors l'adényl cyclase qui va provoquer une augmentation de l'AMP cyclique. L'augmentation de l'AMP cyclique aura pour conséquence, une augmentation de la sécrétion d'électrolytes et une fuite d'eau vers la lumière intestinale, d'où syndrome cholérique (42, 142).

Le polypeptide  $A_2$  semble servir de lien entre la fraction A et la fraction B dans la molécule entière (42, 142).

A l'heure actuelle donc les questions qui restent posées concernant la pathogénie du choléra sont : quels sont les facteurs qui facilitent aux germes le passage de la barrière constituée par le mucus ? Quels sont les facteurs d'adhésion ? Existe-t-il des substances qui favorisent la fixation et (ou) l'activité de la toxine ?

Pour répondre à ces questions, des travaux sont actuellement entrepris pour déterminer le rôle de certaines substances excrétées par les vibrions cholériques. Parmi celles-ci figurent la mucinase, la neuraminidase et la lécithinase.

### 3. 3. - Rôles éventuels de ces enzymes

#### 3. 3. 1. - Rôle éventuel de la mucinase

Dès sa découverte, la mucinase a été incriminée dans la pathologie du choléra. On avait alors pensé que cette enzyme était un facteur toxique excrété par les vibriens, responsable de la desquamation de la muqueuse intestinale du cobaye, *in vitro* (13, 89). En effet, avant les travaux de Gangarosa en 1960, démontrant qu'il n'y avait pas d'altération de la muqueuse intestinale des malades de choléra (60), on pensait que le syndrome cholérique était dû à la perte de liquide survenant comme une sorte d'exsudat après la desquamation de la muqueuse intestinale (105).

A l'heure actuelle, une autre hypothèse a été émise quant au rôle de la mucinase dans la pathogénie du choléra : elle agirait en détruisant la barrière constituée par le mucus. Elle faciliterait ainsi la pénétration des germes dans le gel de mucus et par la suite, l'adhésion des vibriens à la muqueuse intestinale (19, 75).

#### 3. 3. 2. - Rôle éventuel de la neuraminidase

La neuraminidase s'est également vue attribuer un rôle dans la pathogénie du choléra. En effet, après l'identification des récepteurs spécifiques de l'entérotoxine cholérique, certains auteurs, en raison de l'action connue de la neuraminidase sur les trisialosyl gangliosides et disialosyl gangliosides, pensent que cette enzyme peut avoir un rôle au niveau de la fixation de la toxine : elle augmenterait les sites récepteurs en scindant les tri et disialosyl gangliosides qui se trouvent au niveau de

La membrane cytoplasmique des cellules épithéliales intestinales, en monosialosyl gangliosides (70, 101, 137) ce qui augmenterait le nombre de molécules de toxine fixées. Mais ces travaux restent controversés (75).

### 3. 3. 3. - Rôle éventuel de la lécithinase

En ce qui concerne cette enzyme, aucune hypothèse n'a été émise qui pourrait expliquer son intervention dans la pathogénie de la maladie. Guhathakurta et Coll. ont observé simplement une corrélation entre l'augmentation de la production de l'entérotoxine et celle de la lécithinase par les vibrions cholériques après passage des germes sur animal (69).

La figure 3 résume sous forme de schéma le mécanisme pathogénique éventuel du choléra, d'après Holmgren (75).

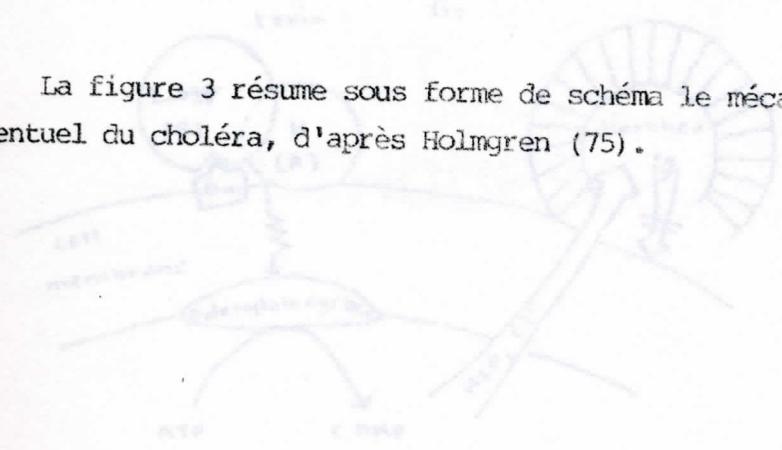


Figure 3 - Schéma du mécanisme pathogénique éventuel du choléra d'après J. Holmgren (75)

1. - SITES CHUNIS

Après étude à l'échelle de 1:50 000 des cartes géologiques de l'Algérie, nous avons choisi six sites pour effectuer des sondages et des analyses géologiques, géochimiques et géophysiques. Ces sites sont situés dans les régions de l'Algérie, de la Tunisie et de la Libye.

## CHAPITRE II

Les travaux ont été effectués au cours des années 1960-1961, 1961-1962, 1962-1963, 1963-1964, 1964-1965, 1965-1966, 1966-1967, 1967-1968, 1968-1969, 1969-1970, 1970-1971, 1971-1972, 1972-1973, 1973-1974, 1974-1975, 1975-1976, 1976-1977, 1977-1978, 1978-1979, 1979-1980, 1980-1981, 1981-1982, 1982-1983, 1983-1984, 1984-1985, 1985-1986, 1986-1987, 1987-1988, 1988-1989, 1989-1990, 1990-1991, 1991-1992, 1992-1993, 1993-1994, 1994-1995, 1995-1996, 1996-1997, 1997-1998, 1998-1999, 1999-2000, 2000-2001, 2001-2002, 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009, 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016, 2016-2017, 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020, 2020-2021, 2021-2022, 2022-2023, 2023-2024, 2024-2025.

## MATERIEL

## ET

## METHODES

## 1. - SOUCHES ETUDIÉES

Notre étude a porté sur 94 souches de *Vibrio cholerae* biotype *eltor* sérotypes Ogawa ou Inaba (dont 49 ont été isolées chez des sujets hospitalisés pour syndrome cholérique et 45 chez des sujets contacts, porteurs sains), et 92 souches de vibrions "non agglutinables" (N.A.G.) (dont 51 ont été isolées chez des sujets hospitalisés pour syndrome cholérique et 41 chez des sujets contacts (porteurs sains)).

Ces souches ont été isolées au cours des épidémies de choléra qui ont eu lieu en Algérie, dans différentes régions du pays. Les souches de *Vibrio cholerae* biotype *eltor* proviennent des épidémies de 1978 à 1982 ; celles des vibrions N.A.G. ont été collectées entre 1971 et 1982.

Toutes ces souches nous ont été adressées pour confirmation du diagnostic. Après étude de leurs caractères biochimiques et antigéniques elles sont gardées dans un milieu de conservation composé d'extrait de viande, de protéose peptone, de bacto agar, de chlorure de sodium et de phosphate dissodique. Ce milieu est réparti à raison de 3 ml par tube de 9/97 mm.

## 2. - TECHNIQUES

### 2. 1. - Techniques de mise en évidence de la toxine

Pour la mise en évidence de la toxine, 3 techniques ont été utilisées :

- la technique "monoganglioside Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay" (GM-1 ELISA)
- la technique sur intestin ligaturé de lapin
- la technique sur intestin ligaturé de souris.

Le choix de ces trois techniques repose sur le fait que ce sont celles qui sont le plus souvent utilisées par les autres auteurs mais aussi parcequ'elles nous ont paru les plus facilement praticables dans nos laboratoires.

#### 2. 1. 1. - Technique GM-1 ELISA

La technique utilisée est en fait la technique ELISA telle qu'elle a été modifiée par Svennerholm et Coll. (139) et à laquelle ils ont donné le nom de *Monoganglioside Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay* (GM-1 ELISA).

Cette technique repose sur le même principe que la technique de Engwall et Perlman (36), la seule modification apportée étant la suivante : les microplaques, au lieu d'être directement recouvertes d'antigène. (constitué par la toxine cholérique, dans ce cas), sont recouvertes de monoganglioside (GM-1) qui est le récepteur spécifique de la toxine, dans le but de rendre la technique plus sensible (139).

La toxine cholérique, contenue dans le surnageant de culture des vibrions, se fixe au GM-1. On fait agir un immunserum de lapin antitoxine cholérique. Le complexe antigène anticorps formé est révélé par la fixation d'anti-immunoglobulines de lapins couplées à la phosphatase alcaline. Après lavage, la fixation de cette anti-immunoglobuline est mise en évidence par la dégradation du substrat de la phosphatase alcaline.

#### 2. 1. 1. 1. - Matériel

- Milieux de culture : 3 milieux de culture parmi ceux souvent utilisés par les auteurs ont été testés :

. milieu syncase, contenant des casaminoacides et des sels minéraux (44),

. milieu à l'extrait de levures et aux casaminoacides (MY) (4),

. milieu trypticase soy broth additionné de 1 % d'extraits de levures (TSB + 1 % EL) (117).

- Surnageants de cultures : les souches sont cultivées sur gélose nutritive en tubes et incubées une nuit à 37°C. Elles serviront à ensemer des tubes de bouillon nutritif qui sont incubés 5 à 6 heures à 37°C. Le volume d'une demi-pipette Pasteur de ce bouillon est ensuite mis dans 50 ml de chacun des 3 milieux cités ci-dessus, contenus dans des erlen-mayers de 250 ml. L'incubation est réalisée à 37°C pendant une nuit sous agitation à raison de 150 agitations par minute. Chaque milieu est alors centrifugé durant 30 mn à +4°C, à 18000 tours/mn dans une centrifugeuse type MSE High Speed 18.

Les surnageants sont recueillis stérilement et, éventuellement, conservés au maximum 4 jours à +4°C.

Les résultats des tests de stérilité ont montré que cette centrifugation à grande vitesse donne des surnageants stériles.

- Sérum antitoxine cholérique : le sérum antitoxine cholérique utilisé est préparé dans notre laboratoire par immunisation de lapins adultes à l'aide d'entérotoxine cholérique purifiée (SCHWARZ/MANN). Le protocole utilisé est le suivant : avant l'immunisation, dans le but d'éviter ultérieurement de fausses réactions positives, nous vérifions l'absence, dans le sérum des animaux, d'anticorps anti-antigènes cholériques (O et H) par agglutination sur lame à l'aide de souches de vibrions cholériques de sérotype Ogawa et Inaba. L'immunisation des lapins à sérologie négative est alors effectuée de la manière suivante : 3 injections par voie intramusculaire, de 1 ml de toxine (à la concentration de 30 ug par ml) additionné d'un égal volume d'adjuvant de Freund complet, sont effectuées à 14 jours d'intervalle chacune. Dix jours après la troisième injection, une quatrième injection est effectuée selon le même protocole ; dix jours après cette dernière, les animaux sont saignés à blanc et le sérum recueilli.

Le sérum est ensuite titré par la méthode GM-1 ELISA dans laquelle l'antigène est constitué par la toxine purifiée, à la concentration de 1 ug/ml. Le titre est donné par la plus grande dilution de sérum qui donne une densité optique supérieure de 0,4 à celle du témoin négatif dans lequel l'antigène est remplacé par de l'albumine bovine sérique (BSA) à la concentration de 1 % dans du tampon phosphate, Ph 7,2.

Le sérum est utilisé à une concentration 2 fois supérieure à son titre réel.

- Le monoganglioside (GM-1) : provient de Suppelco Belfonte, Pennsylvanie (USA).

- Le Conjugat : constitué par des immunoglobulines de mouton anti-immunoglobulines de lapins (fragment Fab), couplées à la phosphatase alcaline ; il nous est fourni par l'Institut Pasteur Production (France).

- Le substrat de la phosphatase alcaline utilisé est le para-nitro-phényl phosphate (Boehring).

- Les microplaques en U sont des microplaques en polystyrène (Cooke microtiter).

#### 2. 1. 1. 2. - Méthode

La méthode utilisée est celle utilisée au laboratoire de l'Institut de Microbiologie Médicale de Goteborg (Suède) (Pr Holmgren : communication personnelle) que nous avons légèrement modifiée : le contact entre le GM-1 et la toxine cholérique contenue dans le surnageant de culture a lieu pendant une nuit (117) au lieu de 2 H. Après addition du sérum antitoxine, les plaques sont laissées 4 H à 37°C au lieu de 2 à 4 H à la température ambiante.

Après addition du substrat, la lecture des densités optiques est effectuée après incubation des microplaques 1 H à 37°C au lieu de 100 mn à la température ambiante.

La technique adoptée est donc la suivante : les microplaques sont recouvertes d'une solution de GM-1 à la concentration de 1,5 nM par ml, à raison de 100 ul par cupule, dans du tampon phosphate à Ph 7,2. Les microplaques sont laissées une nuit à la température du laboratoire, en chambre humide.

Après 3 lavages à l'aide de tampon phosphate à Ph 7,2 (PBS), 200 ul d'une solution à 1 % d'albumine de sérum de veau (BSA) dans du PBS, sont placés dans chaque cupule, dans le but de bloquer la surface non recouverte de GM-1. Les microplaques sont alors placées 30 mn à 37°C en chambre humide.

De nouveau, 3 lavages sont effectués à l'aide de PBS. La réaction est alors effectuée en remplissant les cupules à l'aide de surnageants de culture obtenus avec chacun des milieux.

Les microplaques sont laissées une nuit, à la température ambiante du laboratoire, en chambre humide. Le lendemain, les microplaques sont lavées 3 fois à l'aide de PBS contenant 0,05 % de Tween 20.

On dépose alors dans chaque cupule, 100 ul de sérum antitoxine cholérique, dilué dans du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 1 % de BSA, à la dilution adéquate. On laisse agir 4 H à 37°C.

Après 3 lavages à l'aide de PBS + 0,05 % de Tween 20, on met le conjugat à raison de 100 ul par cupule. On laisse agir une nuit à la température du laboratoire.

Après lavage comme ci-dessus, on ajoute le substrat à la concentration de 1 mg/ml dans du tampon carbonate ph 9,8, à raison de 200 ul par cupule. On incube alors les microplaques 1 H à 37°C. Immédiatement après, on effectue la lecture de la densité optique à l'aide d'un Spectrophotomètre Multistank, type Titertek, à 400 nm.

Pour chaque souche et chaque milieu, la réaction est effectuée dans 2 cupules.

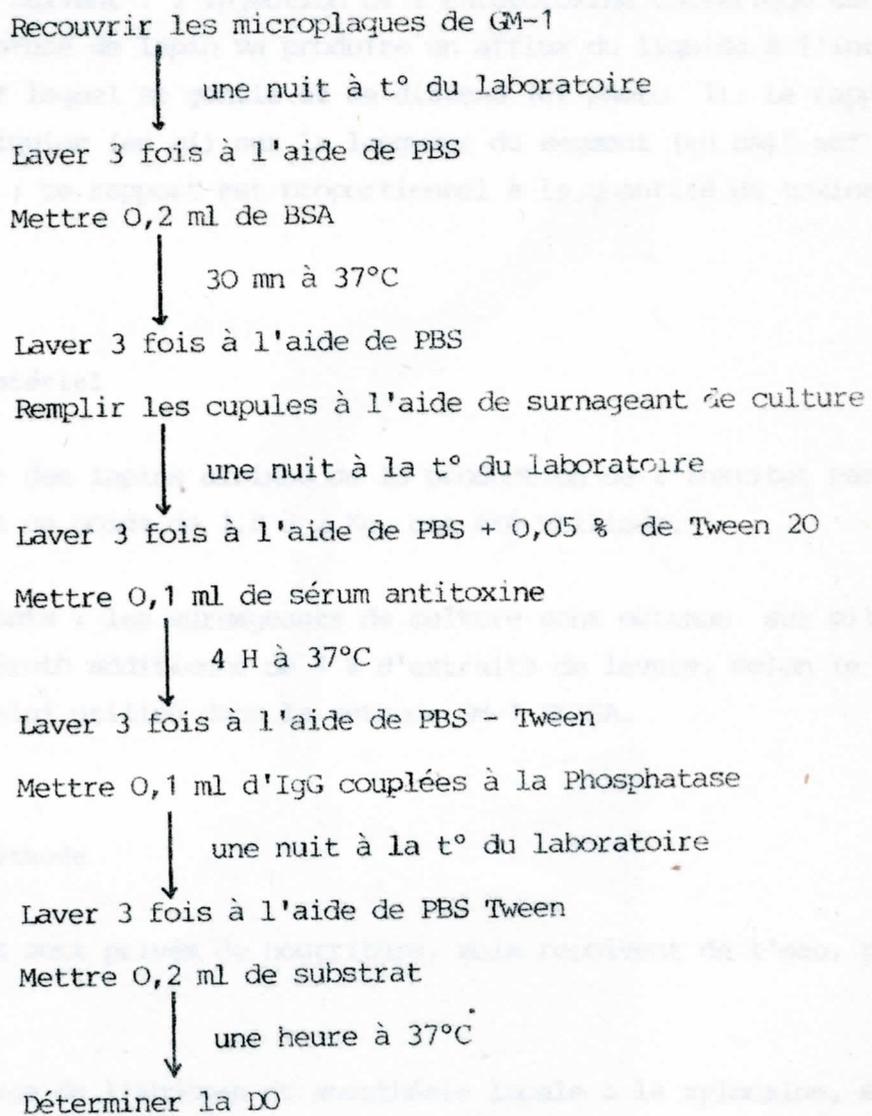
Des témoins filtrats sont également préparés pour chaque souche et chaque milieu, dans 2 cupules, selon le même protocole que ci-dessus mais le sérum antitoxine cholérique est remplacé par du PBS contenant 1 % de BSA.

Les témoins positifs sont constitués par la toxine cholérique purifiée (SCHWARZ /MANN), utilisée à la concentration de 0,1 ug/ml. Cette toxine, placée sous un volume de 100 ul par cupule, remplace dans la technique indiquée ci-dessus, le surnageant de culture.

Les résultats sont interprétés comme suit : est considérée comme positive toute souche dont la différence entre la moyenne des DO des 2 cupules "réaction" et celle des 2 cupules "témoins négatifs" est égale ou supérieure à 0,05.

La technique est résumée dans la figure 4.

Figure 4 : Schéma de la technique GM-1 ELISA



## 2. 1. 2. - Technique sur intestin ligaturé de lapin

La technique utilisée est celle de Burrows et Coll. (18) dont le principe est le suivant : l'injection de l'entérotoxine cholérique dans l'intestin ligaturé de lapin va produire un afflux du liquide à l'intérieur du segment lequel se gonfle et se distend (cf photo 1). Le rapport "volume de ce liquide (en ml) sur la longueur du segment (en cm)" est alors déterminé ; ce rapport est proportionnel à la quantité de toxine injectée (80).

### 2. 1. 2. 1. - Matériel

- Lapins : des lapins albinos de la production de l'Institut Pasteur d'Algérie, ayant un poids de 1,8 à 2 Kg, ont été utilisés.

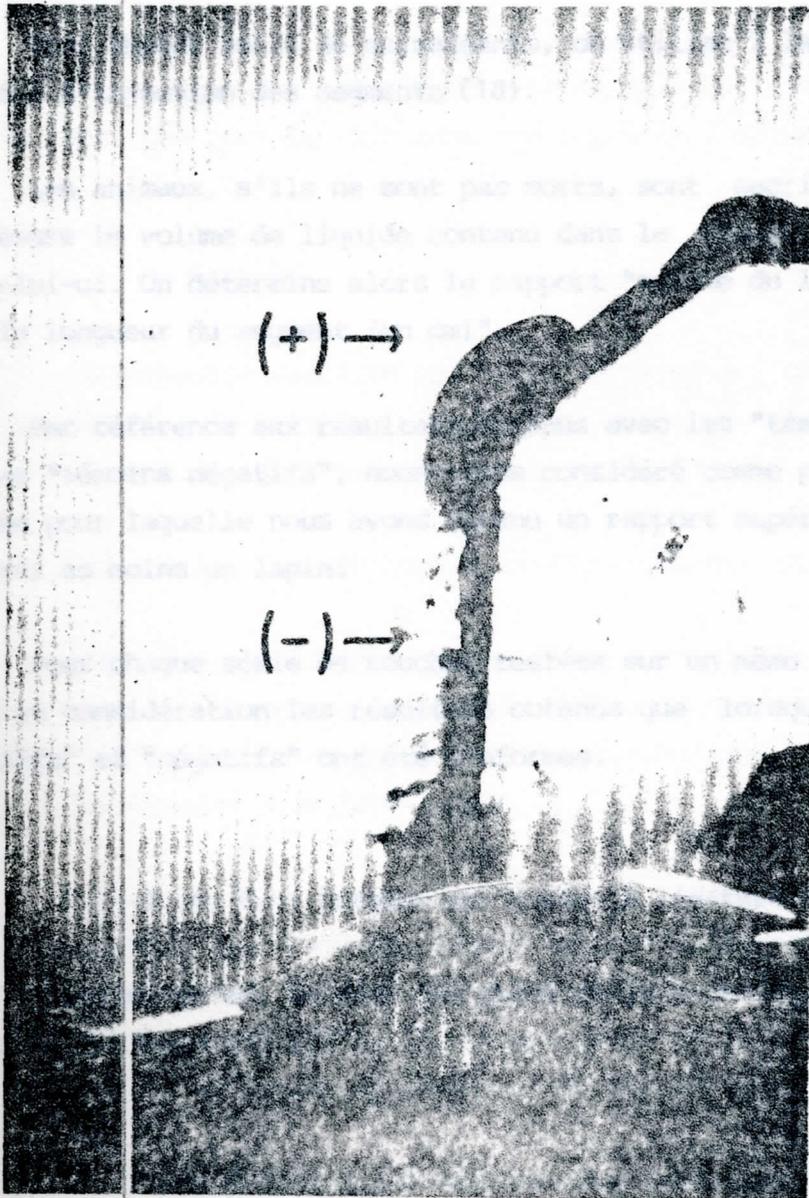
- Surnageants : les surnageants de culture sont obtenus sur milieu Trypticase Soy Broth additionné de 1 % d'extraits de levure, selon le même protocole que celui utilisé dans la méthode GM-1 ELISA.

### 2. 1. 2. 2. - Méthode

Les lapins sont privés de nourriture, mais reçoivent de l'eau, pendant 24 H.

Après rasage de l'abdomen et anesthésie locale à la xylocaine, et générale à la kétamine base (Ketalar) de l'animal, on effectue une incision au niveau de la ligne médiane de l'abdomen, on retire l'intestin et, partant de l'appendice (18), on ligature des segments d'environ 5 cm de longueur. Au total, 26 segments sont ainsi constitués.

PHOTO 1 : Réponse de l'intestin ligaturé de lapin  
à l'injection de la toxine cholérique



Dans chaque segment, on injecte 1 ml de surnageant de culture. Parallèlement on prépare 2 "témoins positifs" en injectant 1 ml de toxine cholérique purifiée, à la concentration de 0,5 ug par ml entourés chacun de 2 "témoins négatifs" auxquels est injecté du milieu de culture stérile, non ensemencé. On replace l'intestin dans l'abdomen et on suture.

Pour chaque série de surnageants, on utilise 2 lapins en inversant l'ordre d'injection des segments (18).

Les animaux, s'ils ne sont pas morts, sont sacrifiés 18 H après. On mesure le volume de liquide contenu dans le segment et la longueur de celui-ci. On détermine alors le rapport "volume du liquide (en ml) sur la longueur du segment (en cm)".

Par référence aux résultats obtenus avec les "témoins positifs" et les "témoins négatifs", nous avons considéré comme positive toute souche pour laquelle nous avons obtenu un rapport supérieur ou égal à 0,1 sur au moins un lapin.

Pour chaque série de souches testées sur un même lapin, nous n'avons pris en considération les résultats obtenus que lorsque ceux des "témoins positifs" et "négatifs" ont été conformes.

### 2. 1. 3. - Méthode sur intestin ligaturé de souris

Le principe est le même que celui de la technique sur intestin ligaturé de lapin (113).

### 2. 1. 3. 1. - Matériel

- Souris : nous avons utilisé des souris blanches (N.H.R.I.), âgées de 6 à 8 semaines (113), provenant de l'élevage de l'Institut Pasteur d'Algérie.

- Surnageants : les surnageants de culture ont été obtenus de la même façon que pour la technique sur intestin ligaturé de lapin.

### 2. 1. 3. 2. - Méthode

La technique utilisée est celle en usage à l'Institut de Microbiologie Médicale de Goteborg (Suède) (Pr Holmgren, communication personnelle), inspirée de celle de Punyashthitik et Coll. (113).

Les souris sont soumises à la diète pendant 24 H.

Après anesthésie générale par inhalation d'ether, on ouvre l'abdomen des animaux et on retire l'intestin grêle. Au milieu de l'intestin, 3 segments d'environ 5 cm de longueur sont ligaturés. Ils sont séparés par des intersegments d'environ 1 cm.

Dans l'un d'eux on injecte 0,2 ml de surnageant de culture de la souche testée. Les 2 autres constituent, l'un "le témoin positif" et l'autre "le témoin négatif". Dans le premier, on injecte 0,2 ml de toxine cholérique purifiée à la concentration de 0,5 ug par ml, et dans le second 0,2 ml de milieu de culture stérile. On referme l'abdomen.

Un lot de 5 souris est utilisé pour chaque souche.

Les animaux sont sacrifiés 3 à 4 H plus tard. Les intestins sont retirés, les segments sont alors découpés, pesés et leur longueur mesurée. On détermine alors la différence entre le rapport "poids (en mg) sur longueur du segment (en cm)" contenant le surnageant de la souche testée et celui du "témoin négatif". Sont considérées comme positives, les souches pour lesquelles cette différence est égale ou supérieure à 20 chez 3 souris au moins.

## 2. 2. - Mise en évidence de la mucinase

La méthode que nous avons utilisée est celle de Kusama et Craig (83) dont le principe est le suivant : la mucinase, contenue dans le surnageant de culture des souches à tester dégrade l'ovomucine (qui constitue le substrat) et la rend non précipitable par le bromure de cétyle triméthyl ammonium (C.T.A.B.) (12).

### 2. 2. 1. - Matériel

- Milieux : dans le but de déterminer le meilleur milieu pour la production de l'enzyme, 5 milieux ont été testés :

- . le milieu syncase (44)
- . le milieu "eau peptonnée alcaline" qui est le milieu d'enrichissement pour les vibrions (5),
- . le milieu à l'infusion de coeur (HIB) (Difco)
- . le milieu à l'infusion de coeur additionné de 5 % de glycérol (utilisé pour la mise en évidence du pouvoir hémolytique des vibrions cholériques)(5),
- . le milieu à l'infusion de coeur et de cerveau (BHIB) (Difco).

Le choix de ces milieux nous a été dicté d'une part par le souci d'utiliser ceux employés couramment dans nos laboratoires et d'autre part, par le besoin de tester ceux utilisés par les autres auteurs.

- Surnageants de culture : les surnageants de culture sont obtenus en ensemençant chacun des milieux mentionnés ci-dessus selon le même protocole que celui utilisé pour la mise en évidence de la toxine ; cependant, les surnageants sont recueillis après 24 H et 48 H d'incubation dans le but d'étudier l'influence du temps d'incubation sur la production de la mucinase et sur le Ph.

Le Ph des surnageants est déterminé et éventuellement ramené à 8 à l'aide de NaOH (solution normale).

- Substrat : la préparation du substrat de la mucinase, constitué par l'ovomucine, est effectuée selon la méthode décrite par Freter (53) 6 blancs d'oeufs, soigneusement séparés du jaune, sont placés dans 2 litres d'eau distillée préalablement refroidie à +4°C. Sans agiter, on place les flacons contenant cette préparation à +4°C pendant un nuit, dans le but de précipiter les blancs d'oeufs.

Le lendemain, le maximum d'eau qui surnage, est éliminé. Le précipité est centrifugé à 1000 tours par minute pendant 30 mn à la température ambiante.

Tout le surnageant est alors jeté. Le précipité est dissout dans un volume minimum d'une solution stérile de NaCl à 5 %. A l'aide d'eau distillée, la concentration de NaCl dans la solution de blanc d'oeuf est ensuite ramenée à 0,89 %.

On centrifuge de nouveau à 1000 tours par minute pendant 30 mn. Le surnageant qui est, éventuellement, filtré sur gaze stérile, constitue le substrat.

Le substrat est ensuite titré comme suit : des dilutions de demi en demi de l'ovomucine sont effectuées à l'aide d'eau physiologique stérile, sous un volume de 1 ml. A chaque dilution on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de bromure de cétyl triméthyl d'ammonium (C.T.A.B.) à 1 %.

Le C.T.A.B. va précipiter l'ovomucine, donnant la formation de grumeaux floconneux en suspension.

La plus grande dilution d'ovomucine, donnant un précipité, constitue une unité de substrat.

Pour le titrage de la mucinase, le substrat est utilisé à la concentration de 2 unités contenues dans 0,5 ml.

- Solutions tampons : dans le but de déterminer leur influence sur la mise en évidence de la mucinase, 4 solutions tampons ont été utilisées pour la dilution des surnageants de culture des souches testées :

- . le tampon Tris EDTA
- . le tampon Tris 0,1 M , Ph 8
- . le tampon Borate (TB à Ph 8)
- . le tampon isotonique salé, Ph 8 (83).

## 2. 2. 2. - Méthode

A partir des surnageants de culture des souches à tester, on effectue des dilutions de demi en demi dans chacune des solutions tampons mentionnées ci-dessus, sous un volume de 0,5 ml. A chaque dilution on ajoute 2 unités de substrat contenues dans 0,5 ml. On agite vigoureusement pour bien mélanger l'enzyme et le substrat. On incube alors 30 mn à 37°C.

Pour chaque série de surnageants testés, on prépare des "témoins ovomucine" dans lesquels le surnageant est remplacé par chacune des solutions tampons et un "témoin surnageant" dans lequel on ne met pas de substrat.

Après incubation, on verse dans tous les tubes 2 à 3 gouttes d'une solution, à 1 % de C.T.A.B. pour détecter l'ovomucine non dégradée : une réaction positive (présence de mucinase) va se traduire par l'absence de formation d'un précipité floconneux. Par contre, le "témoin ovomucine" doit toujours donner ce précipité tandis que le "témoin surnageant" ne doit subir aucun changement.

Le titre de la mucinase est donné par l'inverse de la plus grande dilution de surnageant dans laquelle il n'y a pas de formation de précipité après addition de C.T.A.B.

### 2. 3. - Mise en évidence de la lécithinase

La technique est celle de Liu (86) dont le principe est le suivant : la lécithinase des vibrions qui est en fait une lysolecithinase contenue dans le surnageant de culture, dégrade la lysolecithine contenue dans le jaune d'oeuf en libérant des acides gras (37).

#### 2. 3. 1. - Matériel

- Milieux : 2 milieux ont été testés afin de déterminer celui qui favorise le mieux la production de lécithinase : milieu syncase et milieu à l'infusion de coeur (HIB).

- Surnageants : les souches sontensemencées dans les 2 milieux cités ci-dessus et les surnageants de culture sont obtenus selon le même protocole utilisé pour la mise en évidence de la toxine.

- Substrat : il est constitué par la lysolécithine contenue dans le jaune d'oeuf qui est préparée selon la technique décrite par Liu (86) que nous avons légèrement modifiée : la solution de jaune d'oeuf est traité au kaolin et au  $\text{CaCl}_2$  et diluée au quart :

Un jaune d'oeuf, débarrassé du blanc et de la membrane qui l'entoure, est placé dans 250 ml d'eau physiologique stérile contenant 0,2 % de  $\text{CaCl}_2$  et 1 % de Kaolin. On mélange et on passe la solution sur papier Whatmann n°2 pour éliminer le Kaolin et les débris qu'il a adsorbés. Le filtrat est ensuite dilué au quart dans de l'eau physiologique.

### 2. 3. 2. - Méthode

Les surnageants de culture des souches à tester sont dilués de demi en demi, sous un volume de 0,5 ml dans de l'eau physiologique. Le substrat est ajouté sous un volume de 2 ml dans chacune des dilutions. Le tout est alors incubé une nuit à 37°C.

Pour chaque série de surnageants, on effectue un témoin substrat dans lequel le surnageant est remplacé par de l'eau physiologique.

Une réaction positive (présence de lécithinase dans le surnageant) va se traduire par la formation d'un anneau jaune (constitué par les acides gras libérés) à la surface et un éclaircissement du liquide en dessous.

Le titre de l'enzyme est donné par l'inverse de la plus forte dilution du surnageant qui donne une réaction positive.

### 2. 4. - Mise en évidence de la neuraminidase

La méthode utilisée est celle de Moriyama et Coll. (96) : la neuraminidase, contenue dans le surnageant de culture, agit sur son substrat en libérant de l'acide N.acétyl neuraminique (A.N.A.N.). La quantité d'acide libérée est proportionnelle à celle de l'enzyme présente (1).

Le dosage de cet acide est effectué par la méthode de Warren (147) dont le principe est le suivant : dans un premier temps, on transforme l'A.N.A.N. en acide  $\beta$  formyl purivique par oxydation à l'aide de périodate. L'addition d'acide thiobarbiturique donne alors lieu à la formation d'un chromophore de coloration rose. Après extraction de ce dernier par un mélange d'acide-butanol, on en détermine la densité optique.

#### 2. 4. 1. - Matériel

- Milieux de culture : le milieu utilisé est le milieu à l'infusion de coeur (HIB).

- Surnageants de culture : préparés selon le même protocole utilisé pour la mise en évidence de la toxine.

- Substrat de la neuraminidase : il est constitué par la fétuine contenue dans le sérum de veau foetal (121). Le sérum nous provient de l'Institut Mérieux.

- Réactifs : toutes les solutions chimiques utilisées ont été préparées selon les formules données par Warren (147).

#### 2. 4. 2. - Méthode

Dans des tubes à hémolyse, on met 0,5 ml de tampon phosphate 0,5 M, Ph 6,5, 0,5 ml de sérum de veau foetal et 0,5 ml de surnageant de culture de la souche à tester. On incube une nuit à 37°C.

On ajoute alors 1 ml d'une solution d'acide phosphotungstique à 5 % dans le but d'arrêter la réaction (96). Après agitation, on laisse 20 mn à la température du laboratoire. On centrifuge pendant 5 mn à 3000 tours par minute.

A 0,2 ml du surnageant recueilli on ajoute 0,1 ml d'une solution de métapériodate de sodium 0,2 M. Après agitation, les tubes sont laissés 20 mn à la température ambiante. On ajoute alors 1 ml d'une solution d'arsenite de sodium à 10 %. Les tubes sont agités jusqu'à disparition de la coloration jaune qui s'est formée. Dans chaque tube on met alors 3 ml d'une solution d'acide thiobarbiturique à 0,6 %.

Les tubes sont placés 15 mn dans un bain-marie bouillant, puis dans de l'eau froide pendant 5 mn. On procède alors à l'extraction de la coloration rose qui s'est formée par addition de 4 ml de n-butanol à 5 % d'acide chlorhydrique pur. On agite. On prélève la phase supérieure dont on détermine la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman. La lecture est effectuée à 549 nm.

La méthode est résumée dans la figure 5.

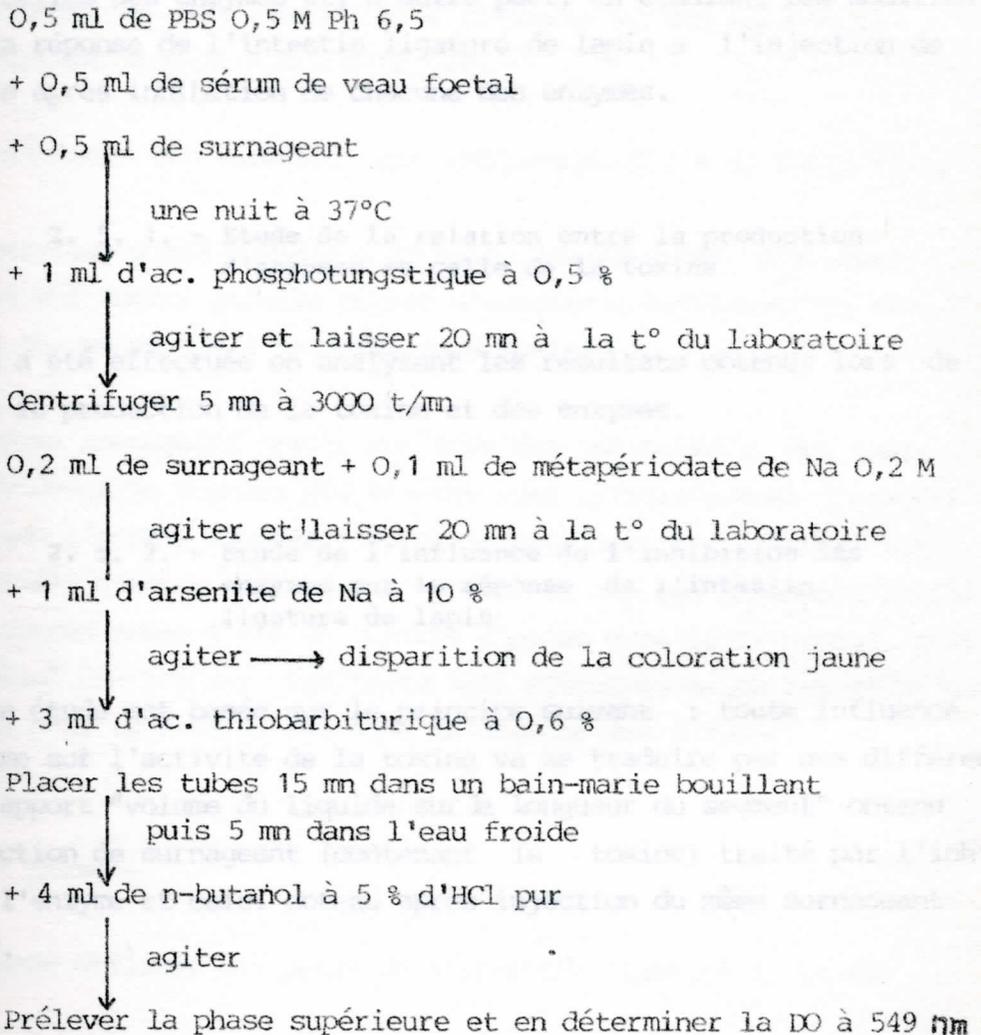
Parallèlement, on a préparé et utilisé un témoin négatif dans lequel le surnageant de culture est remplacé par du milieu de culture non ensemencé.

Nous avons considéré comme positif tout surnageant de culture dont la différence entre sa densité optique et celle du "témoin négatif" est supérieure à 0.

Cette différence de densité optique est convertie en unité internationale (UI) de neuraminidase en se référant à un tableau de correspondance entre la densité optique et le nombre d'unités internationales de neuraminidase établi à l'aide d'une solution standard de neuraminidase de vibron cholérique (B.D.H. Chemical LTD Polle England).



Figure 5 : Résumé de la méthode de mise en évidence de la neuraminidase





## 2. 5. - Etude de l'influence des enzymes sur l'activité de la toxine

L'étude de l'influence des enzymes sur l'activité de la toxine est effectuée d'une part en étudiant la relation entre la production de la toxine et celles des enzymes et, d'autre part, en étudiant les modifications de la réponse de l'intestin ligaturé de lapin à l'injection de surnageants après inhibition de chacune des enzymes.

### 2. 5. 1. - Etude de la relation entre la production d'enzymes et celle de la toxine

Elle a été effectuée en analysant les résultats obtenus lors de l'étude de la production de la toxine et des enzymes.

### 2. 5. 2. - Etude de l'influence de l'inhibition des enzymes sur la réponse de l'intestin ligaturé de lapin

Cette étude est basée sur le principe suivant : toute influence d'une enzyme sur l'activité de la toxine va se traduire par une différence entre le rapport "volume du liquide sur la longueur du segment" obtenu après injection de surnageant (contenant la toxine) traité par l'inhibiteur de l'enzyme et celui obtenu après injection du même surnageant non traité.

#### 2. 5. 2. 1. - Matériel

- Souches : notre étude a porté sur 10 souches parmi celles que nous avons testées et qui produisent l'entérotoxine et les 3 enzymes à la fois.

- Surnageants : ils sont préparés selon le même protocole utilisé pour la mise en évidence de la toxine, en milieu HIB.

La mucinase est inactivée en ramenant le Ph des surnageants à 6. Les surnageants ainsi traités sont incubés 4 H à +37°C (13).

La neuraminidase est inhibée en ajustant le Ph des surnageants à 8 et en incubant ensuite 4 H à 37°C (14).

La lécithinase est inactivée par addition de 0,2 % de  $ZnCl_2$  (21).

Cette concentration a été choisie à la suite des résultats des tests effectués qui ont montré qu'elle permet d'inactiver totalement la lécithinase tout en conservant l'activité de la toxine.

Sur chaque surnageant traité par l'un des inhibiteurs, des tests de mise en évidence de chacune des enzymes sont effectués pour s'assurer d'une part, que l'enzyme inhibée est totalement inactivée (absence totale de son activité), d'autre part, que l'inhibiteur n'a pas diminué l'activité des deux autres (même titre de chacune d'elles dans le surnageant traité et dans celui non traité). Ces tests sont effectués selon les méthodes déjà décrites pour la mise en évidence de chacune des enzymes.

#### 2. 5. 2. 2. - Méthode

La méthode utilisée est celle de l'intestin ligaturé de lapin.

Pour l'étude de chaque souche, nous avons utilisé 12 segments d'intestin ligaturé soit 4 segments par enzyme.:

Dans 2 de ces 4 segments, nous avons injecté le surnageant brut et dilué au demi après traitement par l'inhibiteur et dans les 2 autres, le surnageant non traité, aux mêmes dilutions, dans le but de nous assurer que ce dernier donne une réaction positive sur l'intestin ligaturé de lapin.

Parallèlement, pour chaque lapin, nous avons réalisé d'une part, des "témoins positifs" constitués par l'injection de toxine cholérique purifiée (SCHWARZ /MANN) non traitée par l'inhibiteur et traitée par chacun des inhibiteurs (dans le but de nous assurer que ces derniers ne désactivent pas la toxine), d'autre part, des "témoins négatifs" constitués par l'injection de milieu de culture nonensemencé.

On détermine pour chaque segment le rapport "volume du liquide (en ml) sur la longueur du segment (en cm)". On compare le rapport obtenu après injection de surnageant non traité par l'inhibiteur à celui obtenu après injection de surnageant traité.

## 2. 6. - Etude statistique

L'étude statistique des résultats a été effectuée à l'aide de test du  $\chi^2$ .

## I. - ETUDE DE LA PRODUCTION EN LA TERRE

1.1.1. - Etude de l'influence des milieux de culture sur la production de la terre

# CHAPITRE III

Les résultats de l'étude comparative des 3 milieux utilisés, à savoir le milieu tryptique au brois additionné de 1 % d'extrait de levure (T.S.B. + 1 % E.L.), le milieu au caséum (milieu Y) et le milieu synthétique, sont reportés sur le tableau 2. Pour l'ensemble des souches, les meilleurs résultats sont obtenus sur milieu T.S.B. + 1 % E.L. ; en effet, 45,7 % des souches sont positives sur ce milieu, 28,6 % et 28,6 % le sont respectivement sur milieu Y et milieu synthétique. La différence observée est statistiquement significative.

# RESULTATS

Le milieu T.S.B. + 1 % E.L. offre les meilleurs résultats aussi bien pour les vibrions cholériques O1 que pour les vibrions N.A.G. En effet, pour les vibrions cholériques O1, 40,4 % des souches sont positives sur milieu T.S.B. + 1 % E.L., 27,6 % sur milieu Y et 25,5 % sur milieu synthétique (Tableau 2). Pour les vibrions N.A.G. (Tableau 4), 57,1 % des souches sont positives sur T.S.B. + 1 % E.L., 37,5 % sur milieu Y et 28,1 % sur milieu synthétique. Mais la différence observée n'est significative que pour les vibrions N.A.G.

La supériorité du milieu T.S.B. + 1 % E.L. d'extrait de levure sur les 2 autres est confirmée par les résultats obtenus lorsqu'on considère le nombre de souches positives indépendamment sur l'un des 3 milieux. Selon les résultats figurant sur le tableau 2, pour l'ensemble des souches, nous avons 20,4 % ne produisant la toxine que dans le milieu T.S.B. + 1 % E.L., 7,5 % dans le milieu synthétique et 7 % dans le milieu Y.

## I. - ETUDE DE LA PRODUCTION DE LA TOXINE

### 1.- 1. - Etude de l'influence des milieux de culture sur la production de la toxine

Les résultats de l'étude comparative des 3 milieux utilisés, à savoir le milieu trypticase soy broth additionné de 1 % d'extrait de levures (T.S.B. + 1 % E.L.), le milieu aux casaminoacides (milieu Y) et le milieu syncase, sont reportés sur le tableau 2. Pour l'ensemble des souches, les meilleurs résultats sont obtenus sur milieu T.S.B. + 1 % E.L. ; en effet, 45,7 % des souches sont positives sur ce milieu, 29,6 % et 25,8 % le sont respectivement sur milieu Y et milieu syncase. La différence observée est statistiquement significative.

Le milieu T.S.B. + 1 % E.L. donne les meilleures résultats aussi bien pour les vibrions cholériques O1 que pour les vibrions N.A.G. En effet, pour les vibrions cholériques O1, 40,4 % des souches sont positives sur milieu T.S.B. + 1 % E.L., 27,6 % sur milieu Y et 25,5 % sur milieu syncase (Tableau 3). Pour les vibrions N.A.G. (Tableau 4), 51,1 % des souches sont positives sur T.S.B. + 1 % E.L., 31,5 % sur milieu Y et 26,1 % sur milieu syncase. Mais la différence observée n'est significative que pour les vibrions N.A.G.

La supériorité du milieu T.S.B. + 1 % E.L. d'extrait de levure sur les 2 autres est confirmée par les résultats obtenus lorsqu'on considère le nombre de souches positives uniquement sur l'un des 3 milieux. Selon les résultats figurant sur le tableau 2, pour l'ensemble des souches, nous avons 20,4 % ne produisant la toxine que dans le milieu T.S.B. + 1 % E.L., 7,5 % dans le milieu syncase et 7 % dans le milieu Y.

Tableau 3 - Influence des milieux de culture

Cette différence entre les milieux est retrouvée aussi bien pour les vibrions cholériques O1 que pour les vibrions N.A.G. = ; en effet, 19,1% des souches V.C. O1 ne produisent la toxine que dans le milieu T.S.B. + 1 % E.L., 9,5 % dans le milieu Y et 6,4 % dans le milieu syncase , (Tableau 3). Pour les vibrions N.A.G., nous avons respectivement dans chacun des milieux 21,7 %, 4,3 % et 8,7 % (Tableau 4). Cette différence entre les résultats obtenus sur milieu T.S.B. + 1 % E.L. et les deux autres est statistiquement significative pour les deux groupes de vibrions cholériques.

Le fait que la production de toxine par une souche de vibron cholérique donnée dépend du milieu de culture est confirmée par les résultats obtenus lorsqu'on considère le nombre de souches produisant la toxine indépendamment du milieu. En effet, seules 19 souches sur le total des souches testées soit 10,2 % produisent la toxine sur les trois milieux à la fois (Tableau 2). Ce faible pourcentage est retrouvé aussi bien chez les vibrions cholériques O1 (9,6 %) que chez les vibrions N.A.G. (10,8 %) (Tableau 3 et 4.).

|                      |             |             |             |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Produisant la toxine | 43 (25,3%)  | 85 (45,7%)  | 55 (28,6%)  |
| Negatives            | 127 (74,7%) | 115 (64,3%) | 137 (71,4%) |

Tableau 2 : Influence des milieux de culture sur la production de toxine : étude sur l'ensemble des souches.

|                   | MILIEUX DE CULTURE |             |             | Souches testées<br>= 186 |      |
|-------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------------------|------|
|                   | Syncase            | TSB + 1% EL | Milieu Y    | Nbre                     | %    |
| Souches positives | +                  | +           | +           | 19                       | 10,2 |
|                   | +                  | -           | -           | 14                       | 7,5  |
|                   | -                  | +           | -           | 38                       | 20,4 |
|                   | -                  | -           | +           | 13                       | 7    |
|                   | +                  | +           | -           | 10                       | 5,4  |
|                   | -                  | +           | +           | 18                       | 9,7  |
|                   | +                  | -           | +           | 5                        | 2,7  |
| Souches négatives | -                  | -           | -           | 69                       | 37,1 |
| Total positif     | 48 (25,8%)         | 85 (45,7 %) | 55 (29,6 %) |                          |      |

Tableau 3 : Influence des milieux de culture sur la production de toxine : étude chez les *Vibrio cholerae* 01.

|                   | MILIEUX DE CULTURE |             |             | Souches testées<br>= 94 |      |
|-------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------------------|------|
|                   | Syncase            | TSB + 1% EL | Milieu Y    | Nbre                    | %    |
| Souches positives | +                  | +           | +           | 9                       | 9,6  |
|                   | +                  | -           | -           | 6                       | 6,4  |
|                   | -                  | +           | -           | 18                      | 19,1 |
|                   | -                  | -           | +           | 9                       | 9,5  |
|                   | +                  | +           | -           | 6                       | 6,4  |
|                   | -                  | +           | +           | 5                       | 5,3  |
|                   | +                  | -           | +           | 3                       | 3,2  |
| Souches négatives | -                  | -           | -           | 38                      | 40,4 |
| Total positif     | 24 (25,5 %)        | 38 (40,4 %) | 26 (27,6 %) |                         |      |

Tableau 4 : Influence des milieux de culture sur la production de toxine : étude chez les vibrions N.A.G.

|                   | MILIEUX DE CULTURE |             |             | Souches testées<br>= 92 |      |
|-------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------------------|------|
|                   | Syncase            | TSB + 1% EL | Milieu Y    | Nbre                    | %    |
| Souches positives | +                  | +           | +           | 10                      | 10,8 |
|                   | +                  | -           | -           | 8                       | 8,7  |
|                   | -                  | +           | -           | 20                      | 21,7 |
|                   | -                  | -           | +           | 4                       | 4,3  |
|                   | +                  | +           | -           | 4                       | 4,3  |
|                   | -                  | +           | +           | 13                      | 14,1 |
|                   | +                  | -           | +           | 2                       | 2,1  |
| Souches négatives | -                  | -           | -           | 31                      | 33,7 |
| Total positif     | 24 (26,1 %)        | 47 (51,1 %) | 29 (31,5 %) |                         |      |

1. 2. - Etude comparative des techniques  
de mise en évidence de la toxine

Après une étude préliminaire effectuée avec 30 souches de vibrions, la technique utilisant l'intestin ligaturé de souris a été abandonnée pour des raisons techniques qui seront détaillées lors de la discussion des résultats. Notre étude comparative a donc porté uniquement sur la technique GM-1 ELISA et celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin (I.L.L.).

En raison des résultats obtenus lors de l'étude de l'influence des milieux de culture sur la production de la toxine rapportée ci-dessus, nous avons utilisé le milieu T.S.B. + 1 % E.L.

Sur le tableau 5 sont présentés les résultats obtenus par la technique GM-1 ELISA et celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin (I.L.L.) : au total 85 souches soit 45,7 % sont positives par la technique GM-1 ELISA et 91 soit 48,9 % sur intestin ligaturé de lapin. Cette légère différence observée n'est pas statistiquement significative.

Le nombre de souches positives par les deux techniques à la fois n'est que de 48 soit 25,8 % ; 37 souches sont positives uniquement par la technique GM-1 ELISA soit 19,9 % et celles qui ne sont positives que sur intestin ligaturé de lapin représentent 23,1 % des cas.

Tableau 5 : Etude comparative des techniques de mise en évidence de la toxine : chez l'ensemble des souches.

|                   | TECHNIQUES  |             | Souches testées<br>= 186 |      |
|-------------------|-------------|-------------|--------------------------|------|
|                   | GM-1 ELISA  | I.L.L.      | Nbre                     | %    |
| Souches positives | +           | +           | 48                       | 25,8 |
|                   | +           | -           | 37                       | 19,9 |
|                   | -           | +           | 43                       | 23,1 |
| Souches négatives | -           | -           | 58                       | 31,2 |
| Total positif     | 85 (45,7 %) | 91 (48,9 %) |                          |      |

1. 3. - Etude comparative de la production de la toxine par les vibrions cholériques 01 et les vibrions N.A.G.

1. 3. 1. - Etude chez les vibrions cholériques 01 :

Le nombre de souches produisant la toxine varie en fonction de la technique utilisée pour sa mise en évidence. En effet, par la technique GM-1 ELISA, nous avons au total 38 souches soit 40,4 % qui sont positives et par la technique utilisant l'intestin ligaturé de lapin (I.L.L.), nous avons 54 soit 57,4 %. Seules 26,6 % des souches sont positives par les deux techniques à la fois ; 13 souches soit 13,8 % ne sont positives que par la technique GM-1 ELISA et 29 soit 30,8 % uniquement par celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin (I.L.L.) (Tableau 6).

Tableau 6 : Etude de la production de la toxine par les vibrions cholériques 01.

|                   | TECHNIQUES  |             | Souches testées = 94 |      |
|-------------------|-------------|-------------|----------------------|------|
|                   | GM-1 ELISA  | I.L.L.      | Nbre                 | %    |
| Souches positives | +           | +           | 25                   | 26,6 |
|                   | +           | -           | 13                   | 13,8 |
|                   | -           | +           | 29                   | 30,8 |
| Souches négatives | -           | -           | 27                   | 28,7 |
| Total positif     | 38 (40,4 %) | 54 (57,4 %) |                      |      |

1. 3. 2. - Etude chez les vibrions N.A.G.

Tout comme pour les vibrions cholériques O1, les résultats varient en fonction de la technique utilisée pour la mise en évidence de la toxine: au total, 47 souches soit 51,1 % sont positives par la technique GM-1 ELISA et 37 soit 40,2 % par la technique utilisant l'intestin ligaturé de lapin (I.L.L.) ; 23 souches soit 25 % sont positives par les deux techniques à la fois, 26,1 % uniquement par la technique GM-1 ELISA et 15,2 % par l'autre technique (I.L.L.) (Tableau 7).

Tableau 7 : Etude de la production de la toxine par les vibrions N.A.G.

|                   | TECHNIQUES  |             | Souches testées<br>= 92 |      |
|-------------------|-------------|-------------|-------------------------|------|
|                   | GM-1 ELISA  | I.L.L.      | Nbre                    | %    |
| Souches positives | +           | +           | 23                      | 25   |
|                   | +           | -           | 24                      | 26,1 |
|                   | -           | +           | 14                      | 15,2 |
| Souches négatives | -           | -           | 31                      | 33,7 |
| Total positif     | 47 (51,1 %) | 37 (40,2 %) |                         |      |

1. 3. 3. - Etude comparative de la production  
de toxine pour les vibrions cholériques O1  
et les vibrions N.A.G.

Au total, utilisant la technique sur l'intestin ligaturé de lapin, le nombre de souches de vibrions cholériques O1 positives est supérieur à celui retrouvé chez les vibrions N.A.G. , respectivement 54 souches soit 57,4 % et 37 souches soit 40,2 %. Cette différence est statistiquement significative.

Par la technique GM-1 ELISA, bien que nous observons un pourcentage de souches de vibrions N.A.G. positives supérieur à celui observé parmi les vibrions cholériques O1 (respectivement 51,1 % et 40,4 %), il n'y a pas de différence statistiquement significative. Le taux de souches positives par les deux techniques est le même dans les deux groupes de vibrions.

Lorsque nous comparons le nombre de souches de vibrions cholériques O1 positives uniquement par l'une des deux techniques à celui retrouvé chez les vibrions N.A.G., nous constatons une différence statistiquement significative. Le nombre de souches de vibrions cholériques O1 positives uniquement par la technique utilisant l'intestin ligaturé de lapin est supérieur à celui des vibrions N.A.G. (respectivement 29 souches soit 30,8 % et 14 souches soit 15,2 %). Par contre, par la technique GM-1 ELISA, le nombre de souches de vibrions N.A.G. positives est supérieur à celui des vibrions cholériques O1 : respectivement 24 soit 26,1% et 13 souches soit 13,8 %.

Alors que chez les vibrions N.A.G. il n'y a pas de différence statistiquement significative, entre le nombre de souches positives uniquement par l'une ou l'autre technique, chez les vibrions cholériques O1 le nombre de celles positives uniquement par la technique utilisant l'intestin ligaturé de lapin est nettement supérieur à celui de celles positives uniquement par la technique GM-1 ELISA et la différence est statistiquement significative (Tableau 6 et 7).

1. 4. - Etude de la production de toxine  
en fonction de l'origine des souches

1. 4. 1. - Etude chez les souches isolées  
de sujets hospitalisés

Les résultats varient en fonction de la technique de mise en évidence de la toxine utilisée.

Sur le total des souches étudiées (100), 46 soit 46 % sont positives par la technique GM-1 ELISA et 51 soit 51 % par celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin.

Le nombre de souches positives par les deux techniques à la fois est de 29 soit 29 % ; celui de celles positives uniquement par la technique GM-1 ELISA ou celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin est de, respectivement 17 soit 17 % et de 22 soit 22 % (Tableau 8).

Tableau 8 : Production de la toxine par les souches isolées de sujets hospitalisés : étude sur l'ensemble des souches.

|                   | TECHNIQUES |           | Souches testées<br>= 100 |    |
|-------------------|------------|-----------|--------------------------|----|
|                   | GM-1 ELISA | I.L.L.    | Nbre                     | %  |
| Souches positives | +          | +         | 29                       | 29 |
|                   | +          | -         | 17                       | 17 |
|                   | -          | +         | 22                       | 22 |
| Souches négatives | -          | -         | 32                       | 32 |
| Total positif     | 46 (46 %)  | 51 (51 %) |                          |    |

1. 4. 2. - Etude chez les souches isolées  
de sujets contacts :

Tout comme chez les souches isolées de sujets hospitalisés, nous observons une légère différence (non significative) entre les résultats obtenus, selon la technique de mise en évidence de la toxine. En effet, par la technique GM-1 ELISA, sur l'ensemble des souches 39 soit 45,3 % sont positives. Par celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin, nous avons 40 souches positives soit 46,5 % (Tableau 10). D'après ce dernier tableau, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le taux de souches positives par les deux techniques à la fois, celui des souches positives uniquement sur intestin ligaturé de lapin ou celui des souches négatives par les deux techniques à la fois (respectivement 22,1 % et 24,4 %, 30,2 %). On aboutit à la même conclusion lorsqu'on considère séparément les résultats obtenus chez les vibrions cholériques O1 et ceux obtenus chez les vibrions N.A.G. (Tableau 11).

1. 4. 3. - Etude comparative de la production de toxine  
par les souches isolées de sujets hospitalisés  
et celles isolées de sujets contacts

L'étude comparative des résultats globaux obtenus avec les souches isolées de sujets hospitalisés (Tableau 8) et ceux obtenus avec les souches isolées de sujets contacts (Tableau 10), ne fait ressortir aucune différence statistiquement significative que l'on considère les souches positives ou négatives par les deux techniques à la fois, ou celles positives uniquement par l'une des deux techniques. Ceci est valable aussi bien pour les vibrions cholériques O1 que pour les vibrions N.A.G. (Tableau 9 et 11).

Tableau 10 : Production de la toxine par les souches isolées de sujets contacts : étude sur l'ensemble des souches.

|                   | TECHNIQUES  |             | Souches testées = 86 |      |
|-------------------|-------------|-------------|----------------------|------|
|                   | GM-1 ELISA  | I.L.L.      | Nbre                 | %    |
| Souches positives | +           | +           | 19                   | 22,1 |
|                   | +           | -           | 20                   | 23,3 |
|                   | -           | +           | 21                   | 24,4 |
| Souches négatives | -           | -           | 26                   | 30,2 |
| Total positif     | 39 (45,3 %) | 40 (46,5 %) |                      |      |

Tableau 11 : Production de la toxine par les souches isolées de sujets contacts : étude chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                   | V. C. O1   |            |                      |      | V. N.A.G.  |            |                      |      |
|-------------------|------------|------------|----------------------|------|------------|------------|----------------------|------|
|                   | TECHNIQUES |            | Souches testées = 45 |      | TECHNIQUES |            | Souches testées = 41 |      |
|                   | GM1 ELISA  | I.L.L.     | Nbre                 | %    | GM1 ELISA  | I.L.L.     | Nbre                 | %    |
| Souches positives | +          | +          | 10                   | 22,2 | +          | +          | 9                    | 22   |
|                   | +          | -          | 7                    | 15,6 | +          | -          | 13                   | 31,7 |
|                   | -          | +          | 16                   | 35,6 | -          | +          | 5                    | 12,2 |
| Souches négatives | -          | -          | 12                   | 26,6 | -          | -          | 14                   | 34,1 |
| Total positif     | 17 (37,8%) | 26 (57,7%) |                      |      | 22 (53,6%) | 14 (34,1%) |                      |      |

2. - ETUDE DE LA PRODUCTION DE LA MUCINASE

2. 1. - Etude des conditions nécessaires à la production de la mucinase

2. 1. 1. - Etude de l'influence des milieux de culture sur la production de la mucinase

Parmi les 5 milieux testés au départ, à savoir les milieux syncase, l'eau peptonée alcaline, le HIB additionné de 5 % de glycérol, le BHIB, et le HIB les trois premiers ont été rapidement abandonnés. En effet, les 10 premières souches testées se sont révélées positives sur HIB et BHIB et négatives sur les trois autres milieux.

Une étude faite à l'aide de 30 souches, dont les résultats sont reportés sur le tableau 12, nous a montré la supériorité du milieu HIB sur le BHIB. Sur milieu HIB toutes les souches sont productrices de mucinase tandis que sur BHIB 4 souches soit 13,3 % sont négatives.

L'étude quantitative de la production de la mucinase a confirmé l'étude qualitative sur milieu HIB seules 2 souches soit 6,7 % ont un titre inférieur à 4 unités tandis que sur milieu BHIB 20% des souches ont un tel titre.

Tableau 12 : Mucinase : étude comparative des milieux de culture

|                         | MILIEU BHIB |      | MILIEU HIB |      |
|-------------------------|-------------|------|------------|------|
|                         | Nbre        | %    | Nbre       | %    |
| Titre de mucinase > à 4 | 6           | 20   | 2          | 6,7  |
| Titre de mucinase > à 4 | 20          | 66,7 | 28         | 93,3 |
| Souches négatives       | 4           | 13,3 | 0          | 0    |
| TOTAL                   | 30          | 100  | 30         | 100  |

2. - ETUDE DE LA PRODUCTION DE LA MUCINASE

2. 1. - Etude des conditions nécessaires à la production de la mucinase

2. 1. 1. - Etude de l'influence des milieux de culture sur la production de la mucinase

Parmi les 5 milieux testés au départ, à savoir les milieux syncase, l'eau peptonée alcaline, le HIB additionné de 5 % de glycérol, le BHIB, et le HIB les trois premiers ont été rapidement abandonnés. En effet, les 10 premières souches testées se sont révélées positives sur HIB et BHIB et négatives sur les trois autres milieux.

Une étude faite à l'aide de 30 souches, dont les résultats sont reportés sur le tableau 12, nous a montré la supériorité du milieu HIB sur le BHIB. Sur milieu HIB toutes les souches sont productrices de mucinase tandis que sur BHIB 4 souches soit 13,3 % sont négatives.

L'étude quantitative de la production de la mucinase a confirmé l'étude qualitative sur milieu HIB seules 2 souches soit 6,7 % ont un titre inférieur à 4 unités tandis que sur milieu BHIB 20% des souches ont un tel titre.

Tableau 12 : Mucinase : étude comparative des milieux de culture

|                         | MILIEU BHIB |      | MILIEU HIB |      |
|-------------------------|-------------|------|------------|------|
|                         | Nbre        | %    | Nbre       | %    |
| Titre de mucinase > à 4 | 6           | 20   | 2          | 6,7  |
| Titre de mucinase > à 4 | 20          | 66,7 | 28         | 93,3 |
| Souches négatives       | 4           | 13,3 | 0          | 0    |
| TOTAL                   | 30          | 100  | 30         | 100  |

2. 1. 2. - Etude de l'influence du temps d'incubation et des solutions tampon sur la production et le titre de la mucinase

Le temps d'incubation n'influe pas sur la production de la mucinase aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif. Au total, 137 souches soit 73,6 % produisent la mucinase après 24 H d'incubation et 140 soit, 75,3 % après 48 H. Sur le plan quantitatif, il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage des souches produisant la mucinase à un titre supérieur ou égal à 4 après 24 H et celui obtenu après 48 H d'incubation, quelque soit le tampon utilisé pour les dilutions. (Tableau 13).

Lors de l'étude de l'influence sur le titre de la mucinase, des solutions tampons utilisées pour effectuer les dilutions, le tampon tris EDTA a été abandonné dès le départ en raison des mauvais résultats obtenus. Nous avons donc limité notre étude aux trois autres, à savoir, le tampon borate (T.B.), le tampon tris (T.T.) et le tampon isotonique salé (T.S.). Les meilleurs résultats (titre de mucinase supérieur ou égal à 4) sont obtenus à l'aide du tampon isotonique salé. Après 24 H d'incubation, 32,8 % des souches positives ont un titre supérieur ou égal à 4 lorsque les dilutions sont effectuées à l'aide du tampon borate 29,9 % à l'aide du tampon tris et 48,2 % à l'aide du tampon isotonique salé. Après 48 H d'incubation parmi les 140 souches positives, 42,8 % ont un titre supérieur ou égal à 4 lorsque les dilutions sont effectuées à l'aide du tampon borate, 36,4 % à l'aide du tampon tris et 57,1 % à l'aide du tampon isotonique salé. Cette différence entre le tampon isotonique salé et les deux autres est significative (Tableau 13).

Cette différence entre le tampon isotonique salé et les deux autres est significative (Tableau 13).

Tableau 13 : Influence du temps d'incubation et des solutions tampons sur la production et le titre de la mucinase

| Temps d'incubation | Souches testées |     | Souches positives |      | TITRE DE MUCINASE $\geq 4$ * |      |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------|-----|-------------------|------|------------------------------|------|------|------|------|------|
|                    |                 |     |                   |      | T.B.                         |      | T.T. |      | T.S. |      |
|                    | Nbre            | %   | Nbre              | %    | Nbre                         | %    | Nbre | %    | Nbre | %    |
| 24 H               | 186             | 100 | 137               | 73,6 | 45                           | 32,8 | 41   | 29,9 | 66   | 48,2 |
| 48 H               | 186             | 100 | 140               | 75,3 | 60                           | 42,8 | 51   | 36,4 | 80   | 57,1 |

T.B. = tampon borate ; T.T. = tampon tris ; T.S. = tampon isotonique salé

2. 2. - Production de la mucinase par les vibrions cholériques et les vibrions N.A.G.

Les résultats figurent sur le tableau 14. Ils sont obtenus en prenant en considération toute souche positive quelque soit le temps d'incubation et quelque soit le tampon utilisé pour les dilutions.

Nous remarquons d'après ce tableau, que la mucinase est produite par un taux élevé de souches de vibrions cholériques O1 et de vibrions N.A.G. et qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes : respectivement 83 % et 72,8 % des souches sont productrices de mucinase. De même, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes sur le plan quantitatif : 42 soit 53,8 % des souches de vibrions cholériques O1 productrices de l'enzyme et 37 soit 55,2 % de celles de vibrions N.A.G., ont un titre de mucinase supérieur ou égal à 4.

Tableau 14 : Etude qualitative et quantitative de la production de la mucinase par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |     | Souches positives |      | Titre de mucinase $\geq 4$ |      |
|-------------------------|-----------------|-----|-------------------|------|----------------------------|------|
|                         | Nbre            | %   | Nbre              | %    | Nbre                       | % *  |
| Vibrions cholériques O1 | 94              | 100 | 78                | 83   | 42                         | 53,8 |
| Vibrions N.A.G.         | 92              | 100 | 67                | 72,8 | 37                         | 55,2 |

\* % calculés par rapport au nombre de souches positives.

2. 3. - Production de mucinase en fonction de l'origine  
des souches

Les résultats de l'étude de la production de la mucinase en fonction de l'origine des souches, qui figurent sur le tableau 15, sont ceux obtenus sans tenir compte ni du temps d'incubation ni de la solution tampon utilisée pour les dilutions. Il ressort de ce tableau que le taux de souches produisant la mucinase est élevé aussi bien chez les souches isolées de sujets hospitalisés que chez celles isolées de sujets contacts, respectivement 80 % et 75,6 % , mais la différence n'est pas significative.

Sur le plan quantitatif, pour le total des souches, il n'y a également aucune différence significative entre les souches en fonction de leur origine. Parmi les souches positives isolées de sujets hospitalisés et celles isolées de sujets contacts, nous avons respectivement 56,2 et 56,9 % qui produisent la mucinase à un titre supérieur ou égal à 4.

Il en est de même, si l'on considère d'une part, les vibrions cholériques 01, d'autre part, les vibrions N.A.G. Chez les vibrions cholériques 01, 43 souches soit 87,7 % de celles isolées de sujets hospitalisés et 35 souches soit 77,8 % de celles isolées de sujets contacts produisent la mucinase. Parmi ces souches positives, il y a respectivement 48,8 % et 60 % qui ont un titre supérieur ou égal à 4.

Chez les vibrions N.A.G., 72,5 % des souches isolées de sujets hospitalisés et 73,2 % de celles isolées de sujets contacts produisent la mucinase. Parmi celles-ci, on a retrouvé respectivement 64,9 % et 53,3 % avec un titre de mucinase supérieur ou égal à 4.

Tableau 15 : Mucinase : production de la mucinase en fonction de l'origine des souches.

|                         | SUJETS HOSPITALISES |     |                   |      |                          |      | SUJETS CONTACTS |     |                   |      |                          |      |
|-------------------------|---------------------|-----|-------------------|------|--------------------------|------|-----------------|-----|-------------------|------|--------------------------|------|
|                         | Souches testées     |     | Souches positives |      | Titre mu-nase $\geq 4^*$ |      | Souches testées |     | Souches positives |      | Titre mu-nase $\geq 4^*$ |      |
|                         | Nbre                | %   | Nbre              | %    | Nbre                     | %    | Nbre            | %   | Nbre              | %    | Nbre                     | %    |
| Vibrions cholériques 01 | 49                  | 100 | 43                | 87,7 | 21                       | 48,8 | 45              | 100 | 35                | 77,8 | 21                       | 60   |
| Vibrions N.A.G.         | 52                  | 100 | 37                | 72,5 | 24                       | 64,9 | 41              | 100 | 30                | 73,2 | 16                       | 53,3 |
| TOTAL                   | 100                 | 100 | 80                | 80   | 45                       | 56,2 | 86              | 100 | 65                | 75,6 | 37                       | 56,9 |

\* les % sont calculés par rapport au nombre de souches positives.

|  |    |      |    |      |    |     |
|--|----|------|----|------|----|-----|
|  | 21 | 37,7 | 35 | 83,3 | 83 | 100 |
|  | 16 | 16,0 | 69 | 83,1 | 83 | 100 |

Relation de la lactinase par les vibrions cholériques et les vibrions N.A.G.

Les chiffres 37 figurent les résultats de l'étude qualitative et quantitative de la production de la lactinase par les vibrions cholériques et les vibrions N.A.G.

3. - ETUDE DE LA PRODUCTION DE LECITHINASE

3. 1. - Etude de l'influence des milieux de culture sur la production de lécithinase

L'étude de l'influence des milieux syncase et HIB sur la production de lécithinase, effectuée à l'aide de 83 souches de vibrions cholériques O1 et de vibrions N.A.G. donne les résultats figurant sur le tableau 16 : 28 souches soit 33,7 % produisent l'enzyme sur milieu HIB et 14 soit 16,8 % sur milieu syncase. Le milieu HIB donne donc de meilleurs résultats que le milieu syncase. A la suite de cette étude, pour le reste des souches la production de lécithinase a été étudiée sur milieu HIB.

Tableau 16 : Influence des milieux de culture sur la production de lécithinase

| MILIEUX | Souches positives |      | Souches négatives |      | TOTAL |     |
|---------|-------------------|------|-------------------|------|-------|-----|
|         | Nbre              | %    | Nbre              | %    | Nbre  | %   |
| H I B   | 28                | 37,7 | 55                | 62,3 | 83    | 100 |
| Syncase | 14                | 16,8 | 69                | 83,2 | 83    | 100 |

3. 2. - Production de la lécithinase par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

Sur le tableau 17 figurent les résultats de l'étude qualitative et quantitative de la production de la lécithinase par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

Sur le plan qualitatif, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes : 51 souches soit 55,4 % de vibrions N.A.G. et 48 soit 51,1 % de vibrions cholériques O1 produisent l'enzyme.

Par contre, la différence est nettement significative lorsqu'on examine les résultats sur le plan quantitatif : parmi les 48 souches positives de vibrions cholériques O1, 5 soit 10,4 % ont un titre de lécithinase inférieur ou égal à 8 et 43 soit 89,6 % ont un titre supérieur ou égal à 16 tandis que le nombre de souches de vibrions N.A.G. ayant un titre inférieur ou égal à 8 est de 16 soit 31,4 % et 35 souches soit 68,6 % ont un titre supérieur ou égal à 16.

Tableau 17 : Etude qualitative et quantitative de la production de la lécithinase par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |     | Souches positives |      | TITRE DE LECITHINASE * |      |           |      |
|-------------------------|-----------------|-----|-------------------|------|------------------------|------|-----------|------|
|                         | Nbre            | %   | Nbre              | %    | Brut à 8               |      | $\geq 16$ |      |
|                         |                 |     |                   |      | Nbre                   | %    | Nbre      | %    |
| Vibrions cholériques O1 | 94              | 100 | 48                | 51,1 | 5                      | 10,4 | 43        | 89,6 |
| Vibrions N.A.G.         | 92              | 100 | 51                | 55,4 | 16                     | 31,4 | 35        | 68,6 |

\* les % sont calculés par rapport au total des souches positives.

3. 3. - Production de la lécithinase  
en fonction de l'origine des souches

Sur le plan qualitatif, pour l'ensemble des souches, 57 soit 57 % de celles isolées de sujets hospitalisés et 42 soit 48,8 % de celles isolées de sujets contacts sont productrices de lécithinase. Parmi les vibrions cholériques 01, nous avons respectivement 53,1 % et 48,9 % et parmi les vibrions N.A.G. 60,8 % et 48,8 % (Tableau 18).

Tableau 18 : Etude qualitative de la production de la lécithinase en fonction de l'origine des souches.

|                   | SUJETS HOSPITALISES |     |                   |      | SUJETS CONTACTS |     |                   |      |
|-------------------|---------------------|-----|-------------------|------|-----------------|-----|-------------------|------|
|                   | Souches testées     |     | Souches positives |      | Souches testées |     | Souches positives |      |
|                   | Nbre                | %   | Nbre              | %    | Nbre            | %   | Nbre              | %    |
| V. Cholériques 01 | 49                  | 100 | 26                | 53,1 | 45              | 100 | 22                | 48,9 |
| Vibrions N.A.G.   | 51                  | 100 | 31                | 60,8 | 41              | 100 | 20                | 48,8 |
| TOTAL             | 100                 | 100 | 57                | 57   | 86              | 100 | 42                | 48,8 |

Sur le plan quantitatif, le pourcentage des souches produisant l'enzyme à un titre supérieur ou égal à 16 est élevé quelque soit l'origine des souches : pour l'ensemble des souches, nous avons 82,4 % parmi les positives isolées de sujets hospitalisés et 73,8 % parmi celles isolées de sujets contacts.

Lorsqu'on considère séparément les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G., nous avons parmi le premier groupe 92,3 % des souches isolées de sujets hospitalisés et 86,3 % de celles isolées de sujets contacts qui produisent la lécithinase à un titre supérieur ou égal à 16 et parmi le deuxième groupe, 74,2 % et 60 % respectivement (Tableau 19). L'étude statistique n'a pas montré de différence significative entre les différents groupes comparés entr'eux.

Tableau 19 : Etude quantitative de la production de lécithinase en fonction de l'origine des souches.

|                   | SUJETS HOSPITALISES  |      |             |      | SUJETS CONTACTS      |      |             |      |
|-------------------|----------------------|------|-------------|------|----------------------|------|-------------|------|
|                   | Titre de lecithinase |      |             |      | Titre de lecithinase |      |             |      |
|                   | Brut - 8             |      | $\geq$ à 16 |      | Brut - 8             |      | $\geq$ à 16 |      |
|                   | Nbre                 | %    | Nbre        | %    | Nbre                 | %    | Nbre        | %    |
| V. cholériques O1 | 2                    | 7,7  | 24          | 92,3 | 3                    | 13,6 | 19          | 86,3 |
| Vibrions N.A.G.   | 8                    | 25,8 | 23          | 74,2 | 8                    | 40   | 12          | 60   |
| TOTAL             | 10                   | 17,5 | 47          | 82,4 | 11                   | 26,2 | 31          | 73,8 |

N.B. / Les % sont calculés par rapport au nombre de souches positives dans chaque groupe (cf Tableau 18).

## 4. - ETUDE DE LA PRODUCTION DE NEURAMINIDASE

## 4. 1. - Production de la neuraminidase par les vibrions cholériques 01 et les vibrions N.A.G.

Sur le tableau 20 figurent les résultats de l'étude qualitative et quantitative de la production de la neuraminidase par les vibrions cholériques 01 et les vibrions N.A.G.

Au total, 75 souches soit 79,8 % de vibrions cholériques 01 et 46 soit 50 % de vibrions N.A.G. produisent la neuraminidase.

Parmi les souches positives de vibrions cholériques 01, 18 soit 24 % produisent plus de 100 UI de neuraminidase dans 0,5 ml de surnageant alors que seules 4 souches soit 8,7 % parmi les vibrions N.A.G. producteurs de l'enzyme ont un tel titre. Les calculs statistiques ont montré que la différence est significative aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif entre les vibrions cholériques 01 et les vibrions N.A.G.

Tableau 20 : Etude de la production de neuraminidase par les vibrions cholériques 01 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |     | Souches positives |      | Nombre d'unités de neuraminidase par 0,5 ml de surnageant (N) * |      |              |      |         |     |
|-------------------------|-----------------|-----|-------------------|------|---|------|--------------|------|---------|-----|
|                         | Nbre            | %   | Nbre              | %    | 0 < N ≤ 25  |      | 25 < N ≤ 100 |      | N > 100 |     |
|                         |                 |     |                   |      | Nbre  | %    | Nbre         | %    | Nbre    | %   |
| Vibrions cholériques 01 | 94              | 100 | 75                | 79,8 | 39  | 52   | 18           | 24   | 18      | 24  |
| Vibrions N.A.G.         | 92              | 100 | 46                | 50   | 26  | 56,5 | 16           | 34,8 | 4       | 8,7 |

\* les % sont calculés par rapport au nombre de souches positives dans chaque groupe.

4. 2. - Production de la neuraminidase en fonction de l'origine des souches

Sur le plan qualitatif et pour l'ensemble des souches, on note une différence significative entre les souches isolées de sujets hospitalisés et celles isolées de sujets contacts. Nous avons respectivement 73 souches soit 73 % et 48 souches soit 55,8 % qui produisent la neuraminidase. Cette différence est surtout nette dans le groupe de vibrions N.A.G. chez lesquels 31 souches soit 60,8 % isolées de sujets hospitalisés et 15 seulement soit 36,6 % de sujets contacts sont positives. Chez les vibrions cholériques O1, la différence observée entre les souches en fonction de leur origine n'est pas significative : 42 souches soit 85,7 % de celles isolées chez les sujets hospitalisés et 33 soit 73,3 % de celles de sujets contacts sont productrices de neuraminidase (Tableau 21).

Tableau 21 : Etude qualitative de la production de la neuraminidase en fonction de l'origine des souches

|                         | SUJETS HOSPITALISES |     |                   |      | SUJETS CONTACTS |     |                   |      |
|-------------------------|---------------------|-----|-------------------|------|-----------------|-----|-------------------|------|
|                         | Souches testées     |     | Souches positives |      | Souches testées |     | Souches positives |      |
|                         | Nbre                | %   | Nbre              | %    | Nbre            | %   | Nbre              | %    |
| Vibrions cholériques O1 | 49                  | 100 | 42                | 85,7 | 45              | 100 | 33                | 73,3 |
| Vibrions N.A.G.         | 51                  | 100 | 31                | 60,8 | 41              | 100 | 15                | 36,6 |
| TOTAL                   | 100                 | 100 | 73                | 73   | 86              | 100 | 48                | 55,8 |

Sur le plan quantitatif, la différence observée entre les souches en fonction de leur origine n'est pas significative aussi bien pour l'ensemble des souches que lorsqu'on considère séparément les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. (Tableau 22). Sur le total de souches isolées de sujets contacts testées, 5 souches soit 10,4 % produisent plus de 100 UI de neuraminidase, 27 soit 56,2 % moins de 25 UI ; chez celles isolées de sujets hospitalisés, nous avons respectivement 23,3 % et 52 %.

**Tableau 22** : Etude quantitative de la production de neuraminidase en fonction de l'origine des souches

|                         | SUJETS HOSPITALISES   |           |              |             |           |             | SUJETS CONTACTS   |             |              |             |          |             |
|-------------------------|---|-----------|--------------|-------------|-----------|-------------|---|-------------|--------------|-------------|----------|-------------|
|                         | Nombre d'unités de neuraminidase/<br>0,5 ml de surnageant (N) |           |              |             |           |             | Nombre d'unités de neuraminidase/<br>0,5 ml de surnageant (N) |             |              |             |          |             |
|                         | 0 < N ≤ 25  |           | 25 < N ≤ 100 |             | N > 100   |             | 0 < N ≤ 25  |             | 25 < N ≤ 100 |             | N > 100  |             |
|                         | Nbre  | %         | Nbre         | %           | Nbre      | %           | Nbre  | %           | Nbre         | %           | Nbre     | %           |
| Vibrions cholériques O1 | 20  | 47,6      | 9            | 21,4        | 13        | 30,9        | 19  | 57,6        | 9            | 27,3        | 5        | 15,1        |
| Vibrions N.A.G.         | 18  | 58,1      | 9            | 29          | 4         | 12,9        | 8   | 53,3        | 7            | 46,6        | 0        | 0           |
| <b>TOTAL</b>            | <b>38</b>   | <b>52</b> | <b>18</b>    | <b>24,6</b> | <b>17</b> | <b>23,3</b> | <b>27</b>   | <b>56,2</b> | <b>16</b>    | <b>33,3</b> | <b>5</b> | <b>10,4</b> |

N.B./ Les % sont calculés par rapport au nombre de souches positives dans chaque groupe (cf Tableau 21).

## 5. - ETUDE DE LA PRODUCTION D'UNE ASSOCIATION D'ENZYMES

### 5. 1. - Etude de la production d'une association d'enzymes chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

Les résultats de l'étude de la production d'une ou plusieurs enzymes par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. figurent sur le tableau 23. La production des trois enzymes à la fois est plus fréquente chez les vibrions cholériques O1 que chez les vibrions N.A.G. : respectivement 34 % et 19,7 %.

L'association mucinase-neuraminidase est également retrouvée chez les vibrions cholériques à un pourcentage supérieur à celui des vibrions N.A.G. : 30,8 % et 17,4 %.

L'association mucinase-lécithinase est plus souvent observée chez les vibrions N.A.G. que chez les vibrions cholériques O1 : 23,9 % contre 7,4 %. Les différences observées sont statistiquement significatives.

Pour les vibrions cholériques O1, l'association la plus fréquente est celle où l'on trouve 3 enzymes, suivie de l'association mucinase-neuraminidase. Les associations lécithinase-neuraminidase et mucinase-lécithinase sont retrouvées à des taux très faibles. Par contre, pour les vibrions N.A.G., l'association mucinase-lécithinase est la plus fréquente. Elle est suivie par celle des 3 enzymes puis de celle neuraminidase-mucinase. L'association lécithinase-neuraminidase est là aussi de loin la moins fréquente.

Tableau 23 : Etude de la production d'une association d'enzymes par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |     | Aucune enzyme |     | Mucinase seule |      | Lecithinase seule |     | Neuraminidase seule |     | Mucinase + neuraminidase |      | Lecithinase + neuraminidase |     | Mucinase + lecithinase |      | Les 3 enzymes |      |
|-------------------------|-----------------|-----|---------------|-----|----------------|------|-------------------|-----|---------------------|-----|--------------------------|------|-----------------------------|-----|------------------------|------|---------------|------|
|                         | Nbre            | %   | Nbre          | %   | Nbre           | %    | Nbre              | %   | Nbre                | %   | Nbre                     | %    | Nbre                        | %   | Nbre                   | %    | Nbre          | %    |
| Vibrions cholériques O1 | 94              | 100 | 1             | 1,1 | 10             | 10,1 | 1                 | 1,1 | 6                   | 6,4 | 29                       | 30,8 | 8                           | 8,5 | 7                      | 7,4  | 32            | 34   |
| Vibrions N.A.G.         | 92              | 100 | 5             | 5,4 | 11             | 11,9 | 8                 | 8,7 | 9                   | 9,8 | 16                       | 17,4 | 3                           | 3,2 | 22                     | 23,9 | 18            | 19,5 |

5. 2. - Production d'une association d'enzymes  
en fonction de l'origine des souches

Lorsqu'on considère la production d'une association d'enzymes en fonction de l'origine des souches, nous constatons d'après le tableau 24, que 34 % des souches isolées de sujets hospitalisés produisent les 3 enzymes à la fois alors que chez celles isolées de sujets contacts cette association n'est retrouvée que dans 18,6 % des cas. Cette différence est statistiquement significative.

Par contre, les différences observées dans les autres types d'association entre celles retrouvées chez les souches isolées de sujets contacts et celles de sujets hospitalisés ne sont pas significatives.

Nous ferons remarquer que quelque soit leur origine, le nombre de souches ne produisant qu'une seule enzyme est faible. D'autre part, seules quelques rares souches ne produisent aucune enzyme (2 % parmi celles isolées de sujets hospitalisés et 4,6 % de sujets contacts).

6. - INFLUENCE DES ENZYMES SUR L'ACTIVITE DE LA TOXINE

6. 1. - Relation entre la production d'enzymes  
et le pouvoir toxigène

Pour étudier la relation existante entre la production d'enzymes et le pouvoir toxigène des souches, nous avons pris en considération les résultats obtenus sur intestin ligaturé de lapin où sont considérées comme toxigènes celles qui donnent une réaction positive par cette technique.

Tableau 24 : Etude de la production d'une association d'enzymes en fonction de l'origine des souches

| Souches testées     | Aucune enzyme |     | Mucinase seule |     | Lecithinase seule |      | Neuraminidase seule |     | Mucinase + neuraminidase |     | Lecithinase + neuraminidase |      | Mucinase + lecithinase |      | Les 3 enzymes |     |    |      |
|---------------------|---------------|-----|----------------|-----|-------------------|------|---------------------|-----|--------------------------|-----|-----------------------------|------|------------------------|------|---------------|-----|----|------|
|                     | Nbre          | %   | Nbre           | %   | Nbre              | %    | Nbre                | %   | Nbre                     | %   | Nbre                        | %    | Nbre                   | %    | Nbre          | %   |    |      |
| Sujets hospitalisés | 100           | 100 | 2              | 2   | 8                 | 8    | 4                   | 4   | 8                        | 8   | 25                          | 25   | 13                     | 13   | 6             | 6   | 34 | 34   |
| Sujets contacts     | 86            | 100 | 4              | 4,6 | 13                | 15,1 | 5                   | 5,8 | 7                        | 8,1 | 20                          | 23,2 | 16                     | 18,6 | 5             | 5,8 | 16 | 18,6 |

6. 1. 1. - Relation entre la production de chacune  
des enzymes et le pouvoir toxigène

6. 1. 1. 1. - Etude chez les vibrions cholériques O1  
et les vibrions N.A.G.

D'après les résultats reportés sur le tableau 25, il n'y a pas de différence significative entre les souches en fonction de leur pouvoir toxigène qu'elles soient de vibrions cholériques O1 ou de vibrions N.A.G.

Chez les vibrions cholériques O1, la mucinase est produite par 88,9% de souches toxigènes et 75 % de souches non toxigènes, la neuraminidase est synthétisée par, respectivement 83,3 % et 75 % des souches et la lécithinase par 48,1 % et 55 % des souches.

Chez les vibrions N.A.G., parmi les souches toxigènes, 73 % produisent la mucinase, 45,9 % la neuraminidase et 67,5 % la lécithinase. Le taux de souches non toxigènes productrices de ces enzymes a été respectivement de 72,8 %, 52,7 % et 47,3 %.

6. 1. 1. 2. - Etude en fonction de l'origine des souches

Les résultats de l'étude de la relation entre la production de chacune des enzymes et le pouvoir toxigène, en fonction de l'origine des souches sont consignés sur le tableau 26. Parmi les souches isolées de sujets hospitalisés et dans le lot des souches toxigènes 82,3 % produisent la mucinase, 76,5 % la neuraminidase et 62,7 % la lécithinase ; parmi les souches non toxigènes, nous avons respectivement pour chacune des enzymes 77,5 %, 69,4 % et 51 % de souches productrices.

En ce qui concerne les souches isolées de sujets contacts, la mucinase est produite par 82,5% des souches toxigènes et 67,4% des souches non toxigènes, la neuraminidase par respectivement 55% et 52,2%, et la lécithinase par 47,5 % et 47,8 %.

Toutes les différences observées ne sont pas significatives.

Tableau 25 : Relation entre la production de chacune des enzymes et le pouvoir toxigène : étude chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |          | Mucinase |          | Lécithinase |          | Neuraminidase |          | Aucune enzyme |         |
|-------------------------|-----------------|----------|----------|----------|-------------|----------|---------------|----------|---------------|---------|
|                         | T               | nT       | T        | nT       | T           | nT       | T             | nT       | T             | nT      |
| Vibrions cholériques O1 | 54 (100)        | 40 (100) | 48(88,9) | 30 (75)  | 26(48,1)    | 22 (55)  | 45(83,3)      | 30 (75)  | 0             | 1 (2,5) |
| Vibrions N.A.G.         | 37 (100)        | 55 (100) | 27( 73 ) | 40(72,7) | 25(67,5)    | 26(47,3) | 17(45,9)      | 29(52,7) | 1 (2,7)       | 4 (7,2) |

T = Toxinogènes ; nT = non toxinogènes ; ( ) = %

Tableau 26 : Relation entre la production de chacune des enzymes et le pouvoir toxine : étude en fonction de l'origine des souches

|                     | Souches testées |          | Mucinase |          | Lécithinase |          | Neuraminidase |          | Aucune enzyme |        |
|---------------------|-----------------|----------|----------|----------|-------------|----------|---------------|----------|---------------|--------|
|                     | T               | nT       | T        | nT       | T           | nT       | T             | nT       | T             | nT     |
| Sujets hospitalisés | 51 (100)        | 49 (100) | 42(82,3) | 38(77,5) | 32(62,7)    | 25 (51)  | 39(76,5)      | 34(69,4) | 1 (1,9)       | 1 (2)  |
| Sujets contacts     | 40 (100)        | 46 (100) | 33(82,5) | 31(67,4) | 19(47,5)    | 22(47,8) | 22 (55)       | 24(52,2) | 0 (0)         | 4(8,7) |

T = toxigènes ; nT = non toxigènes ; ( ) = %

6. 1. 2. - Relation entre la production d'une association d'enzymes et le pouvoir toxigène

6. 1. 2. 1. - Etude chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

L'analyse des résultats figurant sur le tableau 27, montre qu'il n'y a pas de relation entre le pouvoir toxigène des souches et la production des différentes associations d'enzymes aussi bien chez les vibrions cholériques O1 que chez les vibrions N.A.G.

Chez les vibrions cholériques O1, parmi les souches toxigènes, les trois enzymes sont produites en association par 35,2 % des souches, la mucinase et la neuraminidase par 37,1 %, la mucinase et la lécithinase par 9,2 % et la lécithinase et la neuraminidase par 3,7 %. Parmi les souches non toxigènes, ces différentes associations sont produites respectivement par : 32,5 %, 22,5 % et 15 % des souches.

Dans le groupe des vibrions N.A.G., 10 souches toxigènes soit 27 % produisent les trois enzymes à la fois alors que parmi les souches non toxigènes, nous en avons 8 soit 14,5 %. Les associations mucinase-neuraminidase et mucinase-lécithinase sont retrouvées respectivement chez 8,1 % et 24,3 % des souches toxigènes et chez 23,6 % et 23,6 % des souches non toxigènes. Le taux de souches productrices de lécithinase associée à la neuraminidase est très faible dans les deux cas.

6. 1. 2. 2. - Etude en fonction de l'origine des souches

Aussi bien chez les souches isolées de sujets hospitalisés que chez celles de sujets contacts, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les souches toxigènes et les non toxigènes en ce qui concerne la production d'une association d'enzymes.

Tableau 27 : Relation entre la production d'une association d'enzymes et le pouvoir toxinoène : étude chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

|                         | Souches testées |             | M + N        |              | L + M       |              | L + N      |            | L + N + M    |              | L           |            | M           |             | N          |             | Aucune enzyme |            |
|-------------------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|---------------|------------|
|                         | T               | nT          | T            | nT           | T           | nT           | T          | nT         | T            | nT           | T           | nT         | T           | nT          | T          | nT          | T             | nT         |
| Vibrions cholériques O1 | 54<br>(100)     | 40<br>(100) | 20<br>(37,1) | 9<br>(22,5)  | 5<br>(9,2)  | 2<br>(5)     | 2<br>(3,7) | 6<br>(15)  | 19<br>(35,2) | 13<br>(32,5) | 0           | 1<br>(2,5) | 4<br>(7,4)  | 6<br>(15)   | 4<br>(7,4) | 2<br>(5)    | 0             | 1<br>(2,5) |
| Vibrions N.A.G.         | 37<br>(100)     | 55<br>(100) | 3<br>(8,1)   | 13<br>(23,6) | 9<br>(24,3) | 13<br>(23,6) | 1<br>(2,7) | 2<br>(3,6) | 10<br>(27)   | 8<br>(14,5)  | 5<br>(13,5) | 3<br>(5,4) | 5<br>(13,5) | 6<br>(10,9) | 3<br>(8,1) | 6<br>(10,9) | 1<br>(2,7)    | 4<br>(7,3) |

M = mucinase ; N = neuraminidase ; L = lécitinase

T = toxinoène ; nT = non toxinoène ; ( ) = %

Chez les souches isolées de sujets hospitalisés, 21 soit 41,2 % parmi les toxigènes et 13 soit 26,5 % des non toxigènes produisent les trois enzymes à la fois. Les associations mucinase-neuraminidase mucinase-lécithinase et lécithinase-neuraminidase sont retrouvées respectivement chez 23,5 % , 13,7 % et 3,9 % des toxigènes , et 26,5 % , 12,2 % et 8,1 % des non toxigènes.

Chez les souches isolées de sujets contacts, parmi les toxigènes 20 % produisent les trois enzymes à la fois, 27,5 % l'association mucinase-neuraminidase, 17,5 % celle de la mucinase-lécithinase et 2,5 % de la lécithinase-neuraminidase. Parmi les souches non toxigènes, ces différentes associations sont retrouvées respectivement chez 17,4 % , 19,5 % et 8,7 % des souches (Tableau 28).

#### 6. 2. - Influence de l'inhibition de chacune des enzymes sur l'activité de la toxine

Les résultats de l'étude de l'influence de l'inhibition de la mucinase, la neuraminidase et la lécithinase sur la réponse de l'intestin ligaturé de lapin après injection de surnageants de souches toxigènes sont reportés respectivement sur les tableaux 29, 30 et 31. Nous remarquons qu'il n'y a pas de modification du rapport "volume du liquide / Longueur du segment" après inhibition de chacune des enzymes.

Tableau 28 : Relation entre la production d'une association d'enzymes et le pouvoir toxigène : étude en fonction de l'origine des souches

| Souches testées    | M + N       |             | L + M        |              | L + N       |             | L + N + M  |            | L            |            | M          |             | N           |            | Aucune enzyme |            |            |
|--------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|---------------|------------|------------|
|                    | T           | nT          | T            | nT           | T           | nT          | T          | nT         | T            | nT         | T          | nT          | T           | nT         | T             | nT         |            |
| Sujets<br>pitaisés | 51<br>(100) | 49<br>(100) | 12<br>(23,5) | 13<br>(26,5) | 7<br>(13,7) | 6<br>(12,2) | 2<br>(3,9) | 4<br>(8,1) | 21<br>(41,2) | 2<br>(3,9) | 2<br>(4,1) | 2<br>(3,9)  | 6<br>(12,2) | 4<br>(7,8) | 4<br>(8,1)    | 1<br>(0,9) | 1<br>(2)   |
|                    | 40<br>(100) | 46<br>(100) | 11<br>(27,5) | 9<br>(19,5)  | 7<br>(17,5) | 9<br>(19,5) | 1<br>(2,5) | 4<br>(8,7) | 8<br>(20)    | 3<br>(7,5) | 2<br>(4,3) | 7<br>(17,5) | 6<br>(13)   | 3<br>(7,5) | 4<br>(8,7)    | 0          | 4<br>(8,7) |

M = mucinase ; N = neuraminidase ; L = léctithinase

T = toxigène ; nT = non toxigène ; ( ) = %

Tableau 29 : Influence de l'inhibition de la mucinase sur l'activité de la toxine

| souches<br>n° | Rapport volume/longueur du segment - Surnageant brut |                | Rapport volume/longueur du segment - Surnageant dilué au 1/2 |                |
|---------------|--|----------------|--|----------------|
|               | Enzyme non inhibée                                   | Enzyme inhibée | Enzyme non inhibée   | Enzyme inhibée |
| 8544          | 1  | 0,81           | 0,75   | 0,66           |
| 11305         | 1,33   | 1,42           | 0,83   | 0,88           |
| 11538         | 0,8  | 0,76           | 0,69   | 0,72           |
| 11987         | 1  | 1,11           | 0,72   | 0,71           |
| 12224         | 0,63   | 0,62           | 0,25   | 0,22           |
| 12230         | 0,60   | 0,53           | 0,25   | 0,22           |
| 12234         | 0,71   | 0,77           | 0,20   | 0,18           |
| 12235         | 1,5  | 1,5            | 0,57   | 0,57           |
| 12237         | 1,14   | 1,14           | 0,75   | 0,77           |

Témoin toxine 0,5 ug sans inhibiteur : 1,38  
avec inhibiteur : 1,41

Tableau 30 : Influence de l'inhibition de la neuraminidase  
sur l'activité de la toxine

| Souches<br>n° | Rapport volume / longueur<br>Surnageant brut |                | Rapport volume / longueur<br>Surnageant dilué au 1/2 |                |
|---------------|--|----------------|--|----------------|
|               | Enzyme non inhibée                           | Enzyme inhibée | Enzyme non inhibée                                   | Enzyme inhibée |
| 8544          | 1,12   | 1,04           | 1,23   | 1,30           |
| 11305         | 0,97   | 1              | 0,85   | 0,91           |
| 11538         | 1,55   | 1,5            | 1,48   | 1,42           |
| 11987         | 1,44   | 1,35           | 1,45   | 1,19           |
| 11988         | 1,08   | 1              | 1  | 1,04           |
| 12224         | 1,4  | 1,24           | 0,97   | 0,98           |
| 12230         | 0,81   | 0,85           | 0,57   | 0,66           |
| 12234         | 0,69   | 0,75           | 0,57   | 0,60           |
| 12236         | 1,05   | 1,1            | 0,65   | 0,67           |
| 12237         | 0,97   | 1,06           | 0,77   | 0,85           |

Témoin toxine 0,5 ug sans inhibiteur : 1,25  
en présence d'inhibiteur : 1,12

Tableau 31 : Influence de l'inhibition de la lécithinase sur l'activité de la toxine

| souches<br>n° | Rapport volume / longueur<br>Surnageant brut |                | Rapport volume / longueur<br>Surnageant dilué au 1/2 |                |
|---------------|--|----------------|--|----------------|
|               | Enzyme non inhibée                           | Enzyme inhibée | Enzyme non inhibée                                   | Enzyme inhibée |
| 8544          | 0,83   | 0,74           | 0,53   | 0,6            |
| 11305         | 0,83   | 0,71           | 0,55   | 0,55           |
| 11538         | 1,1  | 1,28           | 0,34   | 0,3            |
| 12230         | 0,66   | 0,6            | 0,28   | 0,33           |
| 12224         | 1,1  | 1,28           | 0,34   | 0,33           |
| 12234         | 0,5  | 0,45           | 0,25   | 0,2            |
| 12237         | 0,87   | 0,8            | 0,77   | 0,66           |
| 12236         | 0,71   | 0,77           | 0,65   | 0,6            |
| 11987         | 1,25   | 1,25           | 1,28   | 1              |
| 11988         | 1,28   | 1              | 0,6  | 0,33           |

Témoin toxine (0,5 ug/ml) : sans inhibiteur : 1,29  
avec inhibiteur : 1,30

## CHAPITRE IV

## DISCUSSION

1. - ETUDE DES TECHNIQUES ET DES MILIEUX DE CULTURE

1. 1. - Etude des milieux de culture et des techniques  
utilisés pour la mise en évidence de la toxine

1. 1. 1. - Etude des milieux de culture

De nombreux auteurs font ressortir le fait que la production in vitro de la toxine par les vibrions cholériques dépend du milieu utilisé et que le milieu favorable pour une souche ne l'est pas forcément pour l'autre (19, 104, 114). Ceci est confirmé par nos résultats puisque seul un faible pourcentage de souches de vibrions cholériques O1 ou de vibrions N.A.G., produit la toxine indépendamment du milieu de culture utilisé (Tableau 2).

Il ressort de certains travaux, que les milieux semi-synthétiques ou synthétiques sont plus favorables à la production de toxine que les milieux à base de peptone (17).

D'après notre étude, le milieu syncase, qui est un milieu semi-synthétique, donne de moins bons résultats que le milieu peptonné, à savoir le milieu TSB additionné d'extrait de levure. Cette discordance entre nos résultats et ceux des auteurs peut s'expliquer par le fait que leurs études ont été faites à l'aide d'un petit nombre de souches (104). Nous-mêmes avons trouvé des souches non productrices de toxine sur le milieu TSB additionné d'extrait de levure mais il est celui qui favorise la production de toxine par la majorité des souches (Tableau 2).

Ce résultat est lié vraisemblablement à l'addition d'extrait de levure qui améliore le rendement des milieux :

En effet, d'une part, les auteurs qui ont utilisé le milieu TSB sans extrait de levure n'ont pas obtenu de production de toxine (104) et d'autre part, nous avons un pourcentage de souches positives sur milieu Y (dont la composition ne diffère de celle du milieu syncase que par : l'addition d'extrait de levure et l'absence de saccharose) supérieur à celui obtenu sur milieu syncase.

#### 1. 1. 2. - Etude des techniques

La technique sur intestin ligaturé de souris s'est montrée difficilement praticable pour diverses raisons :

- il nous a été difficile de nous procurer au moment voulu, des souris d'âge voulu (8 semaines),

- malgré de très nombreux essais, elle s'est montrée très difficile à mettre au point. Elle doit être utilisée par un personnel très expérimenté,

- cette technique nous a semblé peu recommandable pour l'étude d'un grand nombre de souches. En effet, elle nécessite 5 souris par souche et de plus, les manipulations à effectuer sont nombreuses : 10 pesées de la tare, 10 pesées et 10 mesures de segments intestinaux par souche.

Toutes ces difficultés rencontrées avec la technique sur intestin ligaturé de souris ont fait que nous l'avons abandonnée et avons limité notre étude aux 2 autres techniques.

Dans la technique GM-1 ELISA, la plupart des auteurs considèrent comme positive toute réaction ayant une DO supérieure à celle du témoin négatif (4). Si nous avons adopté ces normes, la plupart de nos souches se seraient révélées négatives. Or, nous avons remarqué au cours de nos essais qu'une différence de coloration entre les cupules "réactions" et les cupules "témoins négatifs", visible à l'oeil nu, correspond à une différence de DO d'au moins 0,05.

Du point de vue de la sensibilité, la plupart des auteurs qui ont comparé la technique GM-1 ELISA aux techniques in vivo ont trouvé des résultats positifs par la première technique, supérieurs à ceux obtenus par les tests in vivo. Ils ont conclu à une meilleure sensibilité de la technique GM-1 ELISA. Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de tirer une telle conclusion : l'existence d'un pourcentage élevé de souches positives uniquement par l'une des 2 techniques soit parmi les vibrions cholériques O1, soit parmi les vibrions N.A.G., ne serait pas dû à une différence de sensibilité entre les 2 techniques mais plutôt à une différence dans la nature de substances mises en évidence par chacune d'elles.

La technique GM-1 ELISA met en évidence des substances ayant le même site de fixation et la même structure antigénique que l'entérotoxine cholérique, sans pour autant qu'elles aient obligatoirement la même activité biologique. La technique sur intestin ligaturé de lapin, met en évidence des substances ayant l'activité biologique de l'entérotoxine mais pouvant en différer par leurs sites de fixation et (ou) leur structure antigénique.

La discordance entre nos résultats et ceux d'autres auteurs est peut être due au fait que eux ont utilisé ces tests pour la mise en évidence d'anticorps anti-entérotoxine cholérique et non de la toxine contenue dans les surnageants de culture (11, 153).

Puisque chacune des deux techniques semble mettre en évidence des substances différentes, il nous est difficile de conseiller l'utilisation de l'une ou de l'autre. Bien que la technique GM-1 ELISA soit plus facilement réalisable que celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin, le choix de la technique à utiliser dépendra de la nature de la substance que l'on veut mettre en évidence.

1. 2. - Etude des milieux et techniques utilisés pour l'étude des enzymes

1. 2. 1. - Milieux et techniques utilisés pour l'étude de la mucinase

Il ressort de notre étude que la solution tampon utilisée pour effectuer les dilutions influe sur la détermination du titre de la mucinase. Alors que les auteurs (42, 82, 125) ont utilisé indifféremment diverses solutions, nos résultats ont montré que le tampon isotonique salé est de loin le meilleur. Dans l'étude de la mucinase, le choix de la solution tampon adéquate pour effectuer les dilutions est donc à prendre en considération pour que l'enzyme se trouve dans les meilleures conditions d'activité.

En ce qui concerne les milieux, nous avons observé que le milieu syn-case, bien que souvent utilisé par les auteurs (52, 125), semble comme pour la production de la toxine, être beaucoup moins favorable à la production de l'enzyme que les milieux peptonnés tels que les milieux BHIB et HIB. En fait, ce milieu a surtout été utilisé pour l'étude de souches connues comme très bonnes productrices de cette substance particulièrement la souche 569 B, ce qui pourrait expliquer la discordance des résultats.

Kusama et Coll. (83), en effectuant une étude sur les conditions de la production de la mucinase et particulièrement de l'influence du temps d'incubation, ont trouvé des résultats variables en fonction des souches :

certaines avaient un titre maximum après 24 H et d'autres après 48 H. Il ressort de notre travail qu'un temps d'incubation de 48 H est meilleur pour l'étude de la mucinase. En effet, d'une part, nous obtenons un meilleur titre de l'enzyme (bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative) (Tableau 13), et d'autre part, on sait que la réaction de recherche de la mucinase s'effectue à un Ph égal ou supérieur à 8. Si le Ph des surnageants de culture est inférieur à cette valeur, comme c'est le cas pour certains après seulement 24 H d'incubation (Tableau 32), on doit procéder à un ajustement du Ph et laisser icuber pendant 4 H à 37°C avant d'effectuer la réaction (13). L'incubation durant 48 H nous éviterait cette manipulation supplémentaire.

Tableau 32 : Mucinase : influence du temps d'incubation sur le Ph

| Temps d'incubation | Ph < à 8 |     | Ph ≥ à 8 |      | Total souches testées |     |
|--------------------|----------|-----|----------|------|-----------------------|-----|
|                    | Nbre     | %   | Nbre     | %    | Nbre                  | %   |
| 24 H               | 13       | 6,9 | 173      | 93   | 186                   | 100 |
| 48 H               | 1        | 0,5 | 185      | 99,4 | 186                   | 100 |

1. 2. 2. - Milieux et techniques utilisés pour l'étude de la lécithinase

Lors des études effectuées par Mitra et Coll. pour déterminer les propriétés de la lécithinase et étudier la nature de ses activateurs ou de ses inhibiteurs, l'action des ions calcium n'a pas été testée (95).

Les tests préliminaires que nous avons effectués, nous ont démontré que les ions calcium sont nécessaires à l'activité de la lécithinase ou du moins l'améliore. En effet, les réactions positives que nous avons obtenues étaient nettement plus fortes en présence de chlorure de calcium qu'en son absence.

L'addition de Kaolin et la dilution au 1/4 de la solution de jaune d'oeuf préparé selon le protocole de Liu (86) nous donne une solution moins dense, ce qui facilite beaucoup la lecture des réactions positives.

2. - ETUDE COMPARATIVE DE LA PRODUCTION DE LA TOXINE  
ET DES ENZYMES PAR LES VIBRIONS CHOLÉRIQUES O1  
ET LES VIBRIONS N.A.G.

2. 1. - Production de la toxine

Les vibrions N.A.G. produisent une entérotoxine semblable à celles de vibrions cholériques O1 (151, 152).

Les travaux portant sur l'étude comparative de la production in vitro de cette toxine par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. font ressortir le fait que la différence entre les 2 groupes est d'ordre quantitatif. En effet, il ressort des travaux de certains auteurs, qu'en raison des faibles quantités de toxine produite par les vibrions N.A.G., il est nécessaire de concentrer au préalable leurs filtrats de culture pour obtenir une réaction positive sur intestin ligaturé de lapin. Par contre, cette opération n'est pas nécessaire avec les filtrats de culture des vibrions cholériques O1 (7, 23, 33, 107).



Les résultats que nous avons obtenus lors de notre étude comparative de la production de la toxine par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. diffèrent en fonction de la technique utilisée : par le test in vivo, à savoir l'intestin ligaturé de lapin, nos résultats confirment ceux des auteurs puisque nous avons trouvé plus de souches positives parmi les vibrions cholériques O1 que parmi les vibrions N.A.G. et cette différence est statistiquement confirmée (Tableaux 6 et 7).

Mais lorsque nous considérons les résultats obtenus par la technique GM-1 ELISA, la différence observée entre les 2 groupes n'est plus significative (Tableau 6 et 7).

Cette discordance est due à la nature de substances mises en évidence par chacune des techniques, comme nous l'avons déjà fait remarquer : il semble que par la technique GM-1 ELISA, on met en évidence des substances ayant les mêmes sites récepteurs et la même structure antigénique que l'entérotoxine cholérique. Par le test sur intestin ligaturé de lapin, on met en évidence des substances ayant son activité biologique : en conséquence, ne doivent être considérées comme productrices de l'entérotoxine cholérique que les souches dont les surnageants nous donnent une réaction positive par les 2 techniques à la fois.

Si l'on tient compte de cette définition, il ressort de notre étude qu'il n'y a pas de différence significative entre les souches de vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G., en ce qui concerne la production de l'entérotoxine proprement dite.

Par contre, nous relevons une différence significative en ce qui concerne la production de l'exotoxine mise en évidence uniquement par l'intestin ligaturé de lapin. En effet, 30,8 % de vibrions cholériques O1 et seulement 15,21 % de vibrions N.A.G. produisent cette toxine.

La production par les vibrions cholériques d'une exotoxine différente de l'entérotoxine a été rapportée par différents auteurs. En effet, d'après Sanyal et Coll. (122) et Nishibuchi et Coll. (104), des souches de vibrions cholériques ne possédant pas de gènes codant pour la production de l'entérotoxine, produisent néanmoins une exotoxine. Elle donne des réactions semblables à celles de l'entérotoxine lors des tests in vivo mais n'est pas neutralisée par un sérum antientérotoxine cholérique et, par conséquent, ne peut être mise en évidence par la technique GM-1 ELISA.

Il est à remarquer qu'aussi bien parmi les vibrions cholériques O1 que parmi les vibrions N.A.G. le pourcentage des souches produisant l'entérotoxine est presque le même que celui des souches produisant l'exotoxine mise en évidence uniquement par la technique utilisant l'intestin ligaturé : en effet, nous avons respectivement pour les vibrions cholériques O1 26,6 % et 30,8 % et pour les vibrions N.A.G. 25 % et 15,2 % (Tableaux 6 et 7).

L'entérotoxine étant considérée jusqu'à présent comme la seule exotoxine produite par les vibrions cholériques tous les travaux de recherche, visant à produire des vaccins induisant une immunité antitoxine, sont axés sur la mise au point d'un vaccin préparé à partir de l'entérotoxine. Ces vaccins ont pour but de donner lieu à la formation d'anticorps dirigés contre la fraction B de la toxine, qui est, d'une part, la partie responsable de la fixation de la toxine aux sites récepteurs et d'autre part, celle qui est la plus antigénique (72, 81, 140, 141, 143). Un tel vaccin ne pourrait donc pas protéger contre l'action de l'autre exotoxine qui a des sites de fixation et (ou) une structure antigénique différents de ceux de l'entérotoxine.

Vu l'importance du pourcentage de souches produisant cette nouvelle exotoxine, on devrait théoriquement en tenir compte dans tout essai de mise au point de vaccin procurant une immunité antitoxine. Cependant, il reste à démontrer que cette exotoxine excrétée par nos souches est réellement différente de l'entérotoxine. Une étude plus approfondie, et particulièrement des tests vérifiant la non neutralisation de son activité in vivo à l'aide de sérum antientérotoxine cholérique restent à entreprendre à cet effet.

La différence entre les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. réside également dans la production de la substance mise en évidence uniquement par la technique GM-1 ELISA : 26,1 % de souches de vibrions N.A.G. et seulement 13,8 % de souches de vibrions cholériques O1 sont positives uniquement par cette technique (Tableau 6 et 7).

Or, parmi les substances ayant les propriétés antigéniques et les sites récepteurs de l'entérotoxine, nous avons le choléragénoid. Ce choléragénoid a été retrouvé dans le filtrat de culture de certaines souches (47, 73). Les vibrions N.A.G. seraient donc de meilleurs producteurs de cette substance (26,1 %) que les vibrions cholériques O1 (13,8%).

Actuellement, les travaux de recherche portant sur la mise au point de vaccins donnant une immunité antitoxine utilisent soit uniquement la fraction B de l'entérotoxine (choléragénoid) après purification de la toxine et séparation des deux fractions A et B, soit des souches mutantes ne produisant que la fraction B (85). Tous ces travaux sont effectués à l'aide de souches de vibrions cholériques O1 de biotype eltor ou cholerae. Cependant, on rencontre des difficultés soit pour obtenir suffisamment de choléragénoid à partir de la toxine soit pour obtenir une souche mutante qui ne réverse pas vers la toxicité.

En raison des résultats que nous avons obtenus, il serait peut être plus avantageux d'utiliser les vibrions N.A.G. que les vibrions cholériques O1 pour produire le choléragénoid.

## 2. 2. - Production des enzymes

### 2. 2. 1. - Production de chacune des enzymes

On sait que les trois enzymes que nous avons étudiées sont produites aussi bien par les vibrions cholériques O1 que par les vibrions N.A.G. Cependant, aucune étude comparative de la production de ces enzymes par les deux groupes de vibrions n'a été effectuée, du moins utilisant un grand nombre de souches et dans les mêmes conditions. De ce fait, il nous est difficile de comparer nos résultats avec ceux d'autres auteurs.

Il ressort de notre étude que seule la mucinase est produite par un fort pourcentage de souches de vibrions cholériques O1 aussi bien que de souches de vibrions N.A.G. (Tableau 14), sans différence ni sur le plan qualitatif ni quantitatif. Mais il reste à savoir si la mucinase produite par les vibrions cholériques O1 et celle produite par les vibrions N.A.G. sont identiques.

Chez les vibrions cholériques O1, l'existence de deux types de mucinases, antigéniquement différentes, dans le surnageant de culture a été suggérée par Freter (53) et Kusama et Craig (83). Pour conclure à une similitude totale entre les deux groupes, il faudrait étudier les caractères de la (ou des) mucinase(s) produite(s) par chacun d'eux.

Sur le plan pratique, une telle étude aurait un double intérêt :

- la mucinase provoque la production d'anticorps chez les sujets atteints de choléra (53). Si l'on veut explorer l'immunité antimucinase, il faut savoir quel antigène (quelle mucinase) utiliser dans les réactions ;

- si l'on veut incorporer l'enzyme dans certaines préparations vaccinales, il faut déterminer le type de mucinase à introduire.

En comparaison avec les résultats obtenus pour la production de mucinase, la lécithinase est produite par un pourcentage de souches relativement plus faible dans les 2 groupes : 51,1 % des souches de vibrions cholériques O1 et 55,4 % de celles de vibrions N.A.G. sont positives.

Une différence significative entre les 2 groupes s'observe sur le plan quantitatif. Il semble que chez les vibrions cholériques O1, les souches sont soit très bonnes productrices de cette enzyme soit des non productrices ; 89,6 % des souches productrices de lécithinase ont un titre supérieur à 16 et seules 10,4 % ont un titre inférieur à 8. Par contre, chez les vibrions N.A.G. 31,4 % ont un titre inférieur à 8 (Tableau 17). Ceci serait peut être dû au fait que la production de cette enzyme soit sous un contrôle de régulation différent dans chacun des deux groupes.

L'étude de la production de la neuraminidase montre une différence très nette tant qualitative que quantitative entre les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.. Presque la totalité des souches de vibrions cholériques O1 (79,8 %) produisent l'enzyme et parmi celle-ci 24 % ont un titre supérieur à 100 UI par 0,5 ml de surnageant ;

Par contre, seules 50 % des souches de vibrions N.A.G. sont productrices parmi lesquelles seulement 8,7 % ont un titre de neuraminidase supérieur à 100 UI par 0,5 ml.

Les résultats que nous avons obtenus avec les vibrions cholériques sont à rapprocher de ceux obtenus par Milligan (94) avec les streptocoques B. Lors de cette étude, l'auteur trouve que 20 sur 26 souches de streptocoques groupe B type III, produisent l'enzyme et seules 3 sur 26 souches de streptocoques groupe B type I et II sont positives.

Le type de streptocoques le plus souvent responsable d'infections (type III) est donc meilleur producteur. C'est le cas chez les vibrions cholériques, ceux qui sont le plus souvent responsables d'infections (groupe O1) sont meilleurs producteurs de neuraminidase que les autres (vibrions N.A.G.).

#### 2. 2. 2. - Production d'une association d'enzymes

D'après Shneider et Coll. (126), la mucinase et la neuraminidase sont souvent produites en association. Son étude a été faite sur des vibrions cholériques O1. Dans le but de vérifier cette affirmation, nous avons étudié la production des différentes enzymes en association et comparé la fréquence de ces associations chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.

Nous remarquons d'après le tableau 24 qu'aussi bien chez les vibrions cholériques O1 que chez les vibrions N.A.G., la neuraminidase est surtout produite en association avec la mucinase.

Dans les 2 groupes, le pourcentage de souches produisant la neuraminidase seule ou associée uniquement à la lécithinase est très faible, ce qui confirme les résultats obtenus par Shneider. Selon le même auteur (125, 126), ceci serait dû au fait que les 2 enzymes (mucinase et neuraminidase) sont sous le même contrôle génétique. Ce contrôle génétique est donc le même chez les 2 groupes de vibrions cholériques.

Nous pensons que le fait d'avoir trouvé un pourcentage de souches produisant une association des 3 enzymes et une association mucinase-neuraminidase supérieur chez les vibrions cholériques O1 à celui retrouvé chez les vibrions N.A.G. est dû au fort pourcentage de souches productrices de neuraminidase parmi les vibrions cholériques O1 et non pas à une plus grande fréquence de ces associations chez les vibrions cholériques O1.

### 3. - ETUDE COMPARATIVE DE LA PRODUCTION DE LA TOXINE ET DES ENZYMES EN FONCTION DE L'ORIGINE DES SOUCHES

Le nombre de cas de porteurs sains est connu pour être plus important au cours des épidémies à *Vibrio cholerae* biotype *cholerae* (110). Le biotype eltor serait donc moins pathogène que le biotype *cholerae* et l'état de porteur sain dû à des facteurs inhérents aux souches. Le fait également que chez les porteurs sains, le nombre de vibrions cholériques excrétés dans les selles est inférieur à celui retrouvé dans les cas cliniques (respectivement  $10^2$  et  $10^6$ ) (5, 31) vient à l'appui de cette hypothèse.

Or, le mécanisme de pathogénicité des vibrions cholériques dépend de l'adhésion des germes (dont les facteurs ne sont pas bien déterminés) d'une part, et de la production, de la fixation et de l'action de la toxine, d'autre part. La différence entre les souches hautement pathogènes (isolées de sujets hospitalisés pour syndrômes cholériques) et celles qui le sont moins (isolées de porteurs sains) pourrait donc être due soit à la synthèse de la toxine soit à d'autres facteurs et notamment la production des enzymes incriminées dans la pathogénicité des vibrions cholériques.

### 3. 1. - Production de la toxine

Il est surprenant de constater que la moitié des souches seulement (51 %) dont la pathogénicité est incontestable (isolées de sujets présentant un syndrôme cholérique) soit productrices d'exotoxines mises en évidence sur intestin ligaturé de lapin (Tableau 8).

En fait, diverses explications peuvent être données à ce phénomène :

- selon Chitnis et Coll. (22), il faut, pour déclencher un syndrôme diarrhéique, une quantité de toxine beaucoup moins importante lorsqu'elle est produite in situ par les germes que lorsqu'elle est injectée dans un filtrat de culture. C'est pourquoi, certaines souches, bien que leur filtrat de culture ne donne pas de réaction positive dans les tests in vivo, produisent un syndrôme diarrhéique lorsqu'elles sont injectées vivantes. Ceci a été observé aussi bien avec les vibrions cholériques O1 qu'avec les vibrions N.A.G. (33). Les souches qui nous ont donné des résultats négatifs pourraient être de faibles productrices de l'exotoxine in vitro.

- Il semble de plus en plus que la pathogénie du choléra n'est pas due uniquement à l'action de l'exotoxine. D'autres substances peuvent intervenir ; c'est ainsi que d'après O'Brien et Coll. certaines souches de vibrions cholériques sont productrices d'une toxine ressemblant à celles du Bacille de Shiga (106) que l'on ne retrouve pas dans le surnageant de culture. Elle n'est obtenue qu'après lyse des bactéries. C'est cette toxine qui serait responsable de la symptomatologie observée.

- Certaines souches, ne produisant aucune toxine, peuvent cependant provoquer un syndrome diarrhéique. Ces souches dites entéropathogènes ont été retrouvées aussi bien parmi les vibrions cholériques O1 (90), que parmi les vibrions N.A.G. (8). Elles ont un mécanisme de pathogénicité particulier dans lequel aucune exotoxine n'intervient.

L'étude comparative de la production de toxines par les souches isolées de sujets hospitalisés et celles isolées de sujets contacts ne montre aucune différence significative entr'elles ; ceci en ce qui concerne aussi bien la production de l'entérotoxine (souches positives par les deux techniques) que les toxines mises en évidence uniquement par la technique d'intestin ligaturé de lapin (Tableau 8 et 10).

Or, d'après Blake (8), il y aurait une relation entre la production de l'entérotoxine et la gravité de l'infection, en particulier, chez les vibrions N.A.G. En effet, les malades chez lesquels on a isolé des souches produisant l'entérotoxine présentent des syndrômes plus sévères que ceux observés chez les malades dont on a isolé des souches non enterotoxinogènes.

Mais le fait que nous n'ayons pas observé de différence significative entre les souches en fonction de leur origine laisse plutôt penser que la toxine n'est pas seule à incriminer pour expliquer la gravité de l'infection.

Il est fort possible cependant, que cette différence ne soit pas observable in vitro mais qu'elle existe in vivo. Comme le suppose Finkelstein, l'état de "porteur sain" serait dû au fait que le milieu intestinal de certains individus ne favorise pas l'élaboration de la toxine par les germes (44).

### 3. 2. - Production des enzymes

#### 3. 2. 1. - Production de chacune des enzymes

D'après les résultats que nous avons obtenus, il n'y a pas de différence significative entre les souches en fonction de leur origine qu'elles soient des vibrions cholériques O1 ou des vibrions N.A.G., pour la production de la mucinase et de la lécithinase (Tableaux 15 et 18). En ce qui concerne la neuraminidase, nous retrouvons une différence statistiquement significative uniquement chez les vibrions N.A.G. (Tableau 21) et sur le plan qualitatif.

#### \* La mucinase

Freter (53) ayant retrouvé la mucinase aussi bien chez les souches isolées de cas mortels de cholera que de cas moins graves conclue que cette enzyme n'a pas de rôle dans la pathogénicité des vibrions cholériques.

Nous pensons plutôt que le fait que cette enzyme soit produite par un pourcentage élevé de souche indépendamment de leur origine, s'explique par le rôle que lui attribuent certains auteurs (67, 125) dans le phénomène de l'adhésion des bactéries : en détruisant la barrière constituée par le mucus, elle facilite l'adhésion des germes sur l'épithélium aussi bien chez les cas cliniques que chez les porteurs sains.

#### \* La lécithinase

Certains auteurs (91) suggèrent que la lécithinase des vibrions cholériques correspond à l'hémolysine et qu'elle intervient dans la pathogénicité des germes comme c'est le cas chez *Vibrio parahaemolyticus* qui est une espèce du même genre (76) ; cependant, l'étude que nous avons faite (résultats non rapportés ici) nous a montré que des souches productrices de lécithinase ne sont pas toutes hémolytiques et que des souches hémolytiques se sont révélées non productrices de lécithinase. La lécithinase mise en évidence est donc différente de l'hémolysine et ne semble pas jouer de rôle dans la pathogénie.

En effet, d'une part elle n'est produite que par environ la moitié des souches (Tableau 18) et d'autre part, il n'y a pas de différence significative entre les souches en fonction de leur origine ; même l'étude quantitative ne fait pas ressortir de différence (Tableau 19).

#### \* La neuraminidase

La relation entre la production de la neuraminidase et la pathogénicité des germes a été retrouvée chez plusieurs espèces bactériennes (101).

Par exemple, chez les streptocoques du groupe B et de type III, Milligan et Coll. (94) ont rapporté qu'il y avait plus de souches productrices de neuraminidase parmi celles isolées de cas cliniques que parmi celles isolées d'infections asymptomatiques.

Chez les vibrions cholériques nous n'avons trouvé de différence significative entre les souches en fonction de leur origine que chez les vibrions N.A.G. Par contre, chez les vibrions cholériques O1, le pourcentage de souches productrices de neuraminidase est élevé quelque soit l'origine des souches sans différence entr'elles (Tableau 22).

Si l'on considère les résultats obtenus chez les vibrions N.A.G., il semble qu'il y ait une relation entre la production de neuraminidase et le pouvoir pathogène des souches. Ces résultats confirment ceux que nous avons observés dans l'étude comparative de la production de cette enzyme par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. (indépendamment de leur origine) (Tableau 20) à savoir que la neuraminidase est retrouvée plus souvent chez les souches pathogènes (vibrions cholériques O1) que chez celles qui le sont moins (vibrions N.A.G.). Le fait que les vibrions N.A.G., bien que retrouvés plus souvent dans les eaux (facteur le plus fréquent de transmission du choléra) que les vibrions cholériques O1, ne soient que rarement responsables de syndrome cholérique, démontre qu'ils sont moins pathogènes que les autres. D'après Spira (134), ceci serait dû à des facteurs de transmission. En raison des résultats que nous avons obtenus, nous pensons que la neuraminidase, puisque c'est la seule substance pour laquelle nous avons trouvé une différence significative d'une part entre les souches de vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G., d'autre part entre les souches de vibrions N.A.G. en fonction de leur origine, serait le facteur déterminant la pathogénicité des vibrions N.A.G.

Il est possible que le pourcentage de souches de vibrions N.A.G. productrices de cette enzyme, trouvées dans l'eau, donc susceptibles d'être transmises, soit peu important, ce qui expliquerait dans une certaine mesure le peu de cas de choléra dûs à ces germes.

Chez les vibrions cholériques O1, le fait que nous n'ayons pas trouvé de différence dans la production de neuraminidase entre les souches en fonction de leur origine et qu'elle soit produite par un taux élevé de souches quelque soit leur origine (Tableau 21) laisse penser que dans ce groupe cette enzyme n'influe pas sur la gravité de l'infection sans pour autant dire qu'elle n'a pas de rôle dans la pathogénicité de ces germes.

### 3. 2. 2. - Production d'une association d'enzymes

Les résultats discordants obtenus chez les vibrions N.A.G. et les vibrions cholériques O1 pour la relation entre la production de la neuraminidase et le pouvoir pathogène peuvent également être dûs au fait que la neuraminidase produite par les vibrions N.A.G. a un mécanisme d'action différent de celle produite par les vibrions cholériques O1. Tous les travaux effectués pour déterminer le rôle de la neuraminidase dans la pathogénicité des vibrions cholériques l'ont été à l'aide d'une neuraminidase produite par les vibrions cholériques O1. Il ressort de ces travaux que la neuraminidase, bien que capable d'hydrolyser les di et tri-sialosyl-gangliosides pour donner des monosialosyl-gangliosides (62, 70, 101, 137) n'agit pas sur ceux trouvés au niveau de l'épithélium intestinal intact (71). Il existerait, en effet, au niveau de l'épithélium intestinal un mécanisme de défense, rendant les gangliosides inaccessibles à l'action de la neuraminidase (71). Pour qu'elle puisse agir, il faudrait l'intervention d'une autre substance, jusque là non déterminée, pour démasquer au préalable les gangliosides.

mes à la fois et que 10,6 % paraissent isolées de cas asymptomatiques en produisant ? La question reste posée.

D'autre part, selon Shneider (126), la neuraminidase pourrait agir non pas au niveau des sites récepteurs de la toxine mais, en synergie avec la mucinase, pour dégrader les mucines de l'épithélium intestinal, facilitant ainsi l'adhésion des bactéries. Ceci pourrait donc expliquer le fait que nous n'ayons pas trouvé de relation entre la production de chacune des enzymes et le pouvoir pathogène ou du moins la gravité de l'infection lors de l'étude des vibrions cholériques 01.

### 3. 2. 2. - Production d'une association d'enzymes

Comme exception faite de la production de neuraminidase par les vibrions N.A.G., nous n'avons pas trouvé de relation entre la production de chacune des enzymes et l'origine des souches, nous avons recherché l'existence d'une telle relation lorsqu'il y a production d'une association d'enzymes.

D'après nos résultats, nous ne retrouvons de différence significative entre les souches en fonction de leur origine que pour la production des trois enzymes à la fois : en effet, 34 % des souches isolées de sujets hospitalisés et 18,6% de celles isolées des sujets contacts sont positives (tableau 24). Ces résultats laisseraient à penser que les trois enzymes agissent en synergie pour influencer sur la gravité de l'infection.

Mais comment expliquer dans ce cas, le fait que 66 % des souches isolées de cas sévères (sujets hospitalisés) ne produisent pas les trois enzymes à la fois et que 18,6 % parmi celles isolées de cas asymptomatiques en produisent ? La question reste posée.

#### 4. - INFLUENCE DES ENZYMES SUR L'ACTIVITE DE LA TOXINE

Certains auteurs ont soulevé l'éventualité de l'existence d'une relation entre la production de certaines enzymes et la production ou l'activité de la toxine cholérique. C'est ainsi que Guhathakurta (69) ayant observé une augmentation de la production de la lécithinase après passage sur animal, tout comme c'est le cas pour la toxine, pense que cette enzyme pourrait être le facteur qui influe sur sa production.

La neuraminidase, d'autre part, favoriserait une augmentation de l'activité de la toxine en augmentant le nombre de sites récepteurs après hydrolyse des di et trisialosyl-gangliosides, ce qui augmenterait le nombre de molécules de toxine fixées (70).

Nous avons pensé que, si ces enzymes avaient de telles actions, nous trouverions une relation entre leur production et la réponse sur intestin ligaturé de lapin à la suite de l'injection des surnageants de cultures. Or, statistiquement, nous n'avons trouvé aucune différence significative entre la production de chacune des enzymes par les souches toxigènes (positives sur intestin ligaturé de lapin) et les non toxigènes (Tableau 26).

Les résultats obtenus avec la mucinase ne nous étonnent guère vu le rôle qui lui est attribué à savoir son influence sur l'adhésion des bactéries : ce rôle semble être confirmé par les travaux de certains auteurs. Lorsqu'on neutralise l'activité de cette enzyme par des anticorps spécifiques (126) ou lorsqu'on utilise des souches mutantes non productrices de mucinase (125), on observe une absence d'adhésion des bactéries. Nos résultats confirment donc le fait que, si la mucinase avait un rôle dans la pathogénicité des vibrions cholériques, son action ne se situerait pas au niveau de l'activité ou de la production des toxines.

Il n'y a donc aucune relation entre la production de l'une des enzymes étudiées ou d'une association d'enzyme et celle de la toxine.

Notre étude de la réponse de l'intestin ligaturé de lapin à l'injection des surnageants de culture après inhibition de chacune des enzymes semble confirmer les premières conclusions ; en effet, d'après les tableaux 29, 30 et 31, le rapport "volume du liquide/longueur du segment" obtenu après administration de surnageants contenant les enzymes et après inhibition de chacune d'elles est le même.

Cependant, comme il nous a été difficile de trouver des inhibiteurs chimiques pour chacune des enzymes et qui ne le soient ni pour les deux autres ni pour la toxine, il est fort possible que ceux que nous avons utilisés et surtout le Ph, peuvent ne pas agir in vivo c'est-à-dire qu'ils peuvent y être modifiés. En fait, le meilleur moyen d'inhiber l'activité de chacune des enzymes serait d'utiliser des anticorps spécifiques ; pour cela, il faudrait au préalable une purification de chaque enzyme.

Le travail que nous avons entrepris visait à établir :

1) - La raison de la diversité des milieux de culture et des méthodes utilisées pour la production et la mise en évidence de la toxine tétanique et de certaines enzymes, nous avons voulu déterminer, par des méthodes pratiques dans nos laboratoires, nous dérivations les plus adéquates.

2) - Le ressort de notre travail que :

a) - en ce qui concerne les milieux de culture à utiliser pour la production de la toxine tétanique, le milieu trypticase soy agros additionné de 1 à 0,2 d'extract de levure est celui qui donne les meilleurs résultats parmi ceux que nous avons testés. Les milieux riches en protéines sont également valables pour les enzymes : en effet, pour la maritase que pour la lectinase le milieu M11 s'est avéré meilleur que le milieu agros.

## CONCLUSION

Pour l'étude de la maritase, lors d'une étude quantitative de cette enzyme, le milieu à utiliser sera le dilution s'agros. Parmi les solutions liquides que nous avons testées, le milieu trypticase soy agros s'est révélé être le meilleur.

b) - Parmi les techniques de mise en évidence de la toxine que nous avons testées, celle utilisant l'injecteur léger s'est avérée la plus adéquate pour l'étude d'un grand nombre de souches.

Le travail que nous avons entrepris visait divers objectifs :

1°) - En raison de la diversité des milieux de culture et des techniques utilisées pour la production et la mise en évidence de la toxine cholérique et de certaines enzymes, nous avons voulu déterminer ceux qui, facilement praticables dans nos laboratoires, nous donneraient de bons résultats.

Il ressort de notre travail que :

a) - en ce qui concerne les milieux de culture à utiliser pour la production de la toxine cholérique, le milieu trypticase soy broth additionné de 1 % d'extrait de levure est celui qui donne les meilleurs résultats parmi ceux que nous avons testés. Les milieux riches sont donc préférables aux milieux synthétiques pour la production de la toxine, ce qui est également valable pour les enzymes : en effet, aussi bien pour la mucinase que pour la lécithinase le milieu HIB s'est montré meilleur que le milieu syncase.

Pour l'étude de la mucinase, lors d'une étude quantitative le choix d'une solution tampon à utiliser pour les dilutions s'impose. Parmi les solutions tampons que nous avons testées, le tampon isotonique salé s'est révélé être le meilleur.

b) - Parmi les techniques de mise en évidence de la toxine que nous avons testées, celle utilisant l'intestin ligaturé de souris est à déconseiller pour l'étude d'un grand nombre de souches.

Sur le plan pratique, la technique GM-1 ELISA est plus facilement réalisable que celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin. Mais le choix de l'utilisation de l'une ou de l'autre technique dépendra de la nature de la substance que l'on veut mettre en évidence. La première est à utiliser chaque fois que l'on veut mettre en évidence des substances ayant les mêmes sites récepteurs et la même structure antigénique que l'entérotoxine cholérique qu'elles aient ou non la même activité biologique. Par contre, la deuxième, celle utilisant l'intestin ligaturé de lapin, est à utiliser lorsqu'on veut mettre en évidence des substances douées de la même activité biologique que l'entérotoxine mais pouvant avoir des sites récepteurs et (ou) une structure antigénique différents.

2°) - Comme les vibrions N.A.G. posent un problème quant à leur rôle comme agents étiologiques du choléra (très souvent isolés des eaux, ils ne sont que rarement responsables de syndromes cholériformes) nous avons entrepris une étude de la production des substances incriminées dans la pathogénicité des vibrions cholériques O1 afin de comparer le mécanisme de pathogénicité des deux groupes. Il s'est avéré lors de notre étude que toutes les substances incriminées dans la pathogénicité des vibrions cholériques, à savoir l'entérotoxine, les autres exotoxines et les trois enzymes que nous avons étudiées (la mucinase, la lécithinase, et la neuraminidase), sont produites aussi bien par les vibrions cholériques O1 que par les vibrions N.A.G., bien qu'il y ait parfois des différences dans les pourcentages des souches positives. Ceci prouve donc que les vibrions N.A.G. ont un pouvoir pathogène potentiel semblable à celui des vibrions cholériques O1 ; ce qui doit nous inciter à ne pas négliger ces germes et surtout à veiller à prendre les mêmes mesures sanitaires qui s'imposent lorsqu'ils sont retrouvés dans les selles ou dans les eaux, en prévention de l'apparition éventuelle d'épidémies de choléra dues à ces germes.

Cependant, ceci ne nous explique pas pourquoi jusqu'à présent ces germes (les vibrions N.A.G.) bien que plus fréquemment isolés des eaux (qui est le facteur le plus fréquent de transmission du choléra) sont beaucoup moins souvent responsables de syndrômes cholériques que les vibrions O1. Peut être que la majorité des souches isolées de l'environnement ne produit pas les substances incriminées dans la pathogénicité des vibrions. Pour vérifier cette hypothèse, une étude de la production des substances que nous avons étudiées dans le présent travail doit être effectuée chez les souches de vibrions N.A.G. isolées des eaux en comparaison avec celles de vibrions cholériques O1 de même origine.

3°) - Le nombre de cas de porteurs sains au cours des épidémies de choléra étant élevé, nous avons voulu savoir si ce phénomène n'est pas dû à des caractères inhérents aux souches et particulièrement à leur incapacité de produire des substances incriminées dans la pathogénicité des vibrions contrairement aux souches isolées de cas cliniques de choléra.

Le fait que nous n'ayons pas trouvé de différence significative entre les souches isolées de sujets hospitalisés et celles isolées de sujets contacts en ce qui concerne la production des toxines et des enzymes étudiées, exception faite de la neuraminidase chez les vibrions N.A.G., montre que l'état de porteur sain ne dépend pas de l'élaboration ou non des substances étudiées dans ce travail.

Cependant, comme nous avons vu qu'in vitro les milieux de culture influent sur la production aussi bien de la toxine que des enzymes, il est fort possible qu'in vivo, les souches ne trouvent pas les mêmes conditions favorables à la production de ces substances chez tous les individus.

D'après les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de la production de l'entérotoxine par des souches dont la pathogénicité n'est pas à mettre en doute (souches isolées de sujets hospitalisés pour syndrome cholérique) il semble que le mécanisme de pathogénicité du choléra n'est pas dû uniquement à l'élaboration de l'entérotoxine, mécanisme qui est jusqu'à présent le plus admis et le mieux connu. En effet, cette toxine n'est produite d'après nos résultats que par 29 % des souches. Nous en avons 22 % qui produisent une exotoxine qui n'a pas les mêmes sites récepteurs et (ou) la même structure antigénique que l'entérotoxine. Le reste des souches soit 49 % ne semblent produire aucune exotoxine.

Ces mécanismes de pathogénicité des vibrions cholériques dans lesquels n'intervient pas l'entérotoxine soit 71 % des cas, demandent donc à être mieux connus afin que l'on en tienne compte dans toute tentative de mise au point de vaccins. En effet, toute vaccination cherchant à provoquer une immunité anti-entérotoxine spécifique ne sera pas totalement efficace.

4°) - Comme le rôle de certaines enzymes dans la pathogénicité des vibrions et leur niveau d'action éventuel sont controversés, nous avons voulu vérifier les hypothèses de certains auteurs selon lesquels certaines enzymes joueraient un rôle dans la pathogénicité du choléra en raison de leur influence sur l'activité de la toxine. Pour cela, nous avons effectué d'une part, une étude de la relation entre la présence de ces enzymes et celle de la toxine et d'autre part, l'influence de l'inhibition de chacune des enzymes sur l'activité de la toxine.

Nous n'avons trouvé aucune relation entre la production de chacune des enzymes étudiées ou une association de ces enzymes et le pouvoir toxigène des souches; ce qui indique que les enzymes n'ont pas d'influence sur l'activité de la toxine; ceci a été confirmé par l'absence de modification de la réponse de l'intestin ligaturé de lapin à l'injection de toxine après inhibition des enzymes.

## BIBLIOGRAPHIE

Ces résultats cependant, ne signifient pas que les enzymes n'ont pas de rôle à jouer dans la pathogénicité des germes. Hormis la lécithinase qui, nous pensons, n'intervient pas dans la pathogénie du choléra en raison du faible pourcentage de souches qui la produisent, les deux autres enzymes pourraient avoir un rôle dans l'adhésion des bactéries. Ceci demande à être confirmé par l'étude de l'influence de ces enzymes sur l'adhésion des vibrions cholériques.

A

1. - Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis (11)  
Immunology Series n°s procedure Guide, Ed. U.S. Dept. of Health  
Education and Welfare, 1975.
2. - ALDOVA (S.), LAZNIKHOVA (K.), STEPANKOVA (E.), LITVACKA (J.).  
"Isolation of nonagglutinable vibrios from an enteric cholera  
in Czechoslovakia".  
J. Infect. Dis., 118, 23 - 31, 1969.
3. - AZURIN (J.G.), BOGART (E.), BANJA (D.), ALVINO (A.), GIBBY (M.),  
DISCH (J.F.), MURRAY (R.), SWILCO (R.), LEVINSKI (L.).  
"A long term carrier of cholera: cholera Belovar".  
Bull. WHO, 21, 345 - 349, 1967.

B

4. - BACE (R.), SWENNERHOLM (A.N.), HELSTEN (J.), HOLBY (H.).  
"Evaluation of a modified agarose gel diffusion assay for detection  
of cholera vibrios".  
J. Infect. Dis., 131, 100 - 104, 1976.

# BIBLIOGRAPHIE

5. - BANJA (D.).  
"Laboratory diagnosis of cholera".  
In Cholera (Barua and Barrow eds.) W.B. Saunders Co - Philadelphia  
London - Toronto, 85 - 126, 1974.
6. - BHATTACHARJEE (S.W.), SRIVASTAVA (S.S.).  
"Adherence of wild type and mutant strains of vibrio cholerae to  
normal and immune intestinal tissue".  
Bull. WHO, 51, 123 - 128, 1979.
7. - BHATTACHARJEE (S.), BISE (A.E.), GIBBY (M.).  
"Permeability and enterotoxic factors of non agglutinable vibrios.  
Vibrio alginigena and parahaemolyticus".  
Appl. Microb., 21, 1153 - 1161, 1971.

## A

1. - Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis (In)  
Immunology Series n°6 procedure Guide. Ed. U.S. Dept. of Health  
Education and Welfare, 1975.
2. - ALDOVA (E.) , LAZNIKOVA (K.), STEPANKOVA (E.), LIETAVA (J.).  
"Isolation of nonagglutinable vibrio from an enteritis outbreak  
in Czechoslovakia".  
J. Infect. Dis., 118, 25 - 31, 1968.
3. - AZURIN (J.C.), KOBARI (K.), BARUA (D.), ALVERO (M.), GOMEZ (C.Z.),  
DIZON (J.J.), NAKANO (E.), SUPLIDO (R.), LEDESMA (L.).  
"A long term carrier of cholera : cholera Dolores".  
Bull. OMS, 37, 745 - 749, 1967.

## B

4. - BACK (E.), SVENNERHOLM (A.M.), HOLMGREN (J.), MOLLBY (R.).  
"Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection  
of E.coli heat labile enterotoxin".  
J. Clin. Microb., 10, 791 - 795, 1979.
5. - BARUA (D.).  
"Laboratory diagnosis of cholera".  
in Cholera (Barua and Burrow eds.) (W.B. Saunders Co - Philadelphia -  
London - Toronto), 85 - 126, 1974.
6. - BHATTACHARJEE (J.W.), SRIVASTAVA (B.S.).  
"Adherence of wild type and mutant strains of Vibrio cholerae to  
normal and immune intestinal tissue".  
Bull. OMS, 57, 123 - 128, 1979.
7. - BHATTACHARYA (S.), BOSE (A.K.), GOSH (A.K.).  
"Permeability and enterotoxic factors of non agglutinable vibrios,  
Vibrio alcaligenes and parahaemolyticus".  
Appl. Microb., 22, 1159 - 1161, 1971.

8. - BLAKE (P.A.).  
"Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios".  
Ann. Rev. Microb., 34, 341 - 367, 1980.
9. - BENYAJATI (C.).  
"Experimental cholera in humans".  
Brit. Med. J., 140 - 142, 1966.
10. - BRIZOU (J.).  
"Techniques d'enzymologie bacterienne".  
Masson et cie, Ed. Paris VI, 139 - 143, 1971.
11. - BROWNE (R.M.), YOUNG (C.R.), LEVINE (M.M.), CRAIG (J.P.).  
"Microtiter enzyme linked immunosorbent assay for immunoglobuline G cholera antitoxin in humans : sensibility and specificity".  
Inf. Imm., 27, 497 - 500, 1980.
12. - BURNET (F.M.).  
"Ovomucin as a substrate for the mucinolytic enzymes of Vibrio cholerae filtrates".  
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 27, 245 -258, 1949.
13. - BURNET (F.M.), STONE (J.D.).  
"Desquamation of intestinal epithelium in vitro by Vibrio cholerae filtrates. Characterization of mucinase and tissue desintegrating enzymes".  
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 25, 219 - 226, 1947.
14. - BURNET (F.M.), STONE (J.D.).  
"The receptor destroying enzyme of Vibrio cholerae".  
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 25, 227 - 233, 1947.
15. - BURROWS (W.).  
"Endotoxins".  
Ann. Rev. Microb., 6, 181 - 196, 1951.
16. - BURROWS (W.).  
"Cholera toxins".  
Ann. Rev. Microb., 22, 245 - 268, 1968.

17. - BURROWS (W.), KAUR (J.).  
"Cholera toxins".  
In: Cholera (Barua and Burrows) Ed; W.B. Sanders Co.-Philadelphia,  
London - Toronto, 143 - 167, 1974.

18. - BURROWS (W.), MUSTEIKIS (G.M.).  
"Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop".  
J. Inf. Dis., 116, 183 - 190, 1966.

C

19. - CALLAHAN (L.T.), RICHARDSON (S.H.).  
"Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. Nutritional requirement for toxin production and the effects of Ph on toxin elaboration in chemically defined media".  
Inf. Immun., 7, 567 - 572, 1973.

20. - CASH (R.A.), MUSIC (S.I.), LIBONATI (J.P.), SNYDER (M.J.),  
WENZEL (R.P.), HORNICK (R.B.).  
"Reponse of man to infection with *Vibrio cholerae* I. Clinical, serological and bacteriological responses to a known inoculum".  
J. Inf. Dis., 129, 45 - 52, 1974.

21. - CHATTERJEE (D.C.), DAS (S.K.).  
"Purification and some properties of *Vibrio eltor* phospholipase B".  
Enzymologia, 28, 346 - 354, 1965.

22. - CHITNIS (D.S.), SHARMA (K.D.), KAMAT (R.S.).  
"Role of bacterial adhesion in the pathogenesis of cholera".  
J. Med. Microb., 15, 43 - 51, 1982.

23. - CIZNAR (I.), DRASKOVICOVA (M.), HOSTACKA (A.), KAROKCEK (J.).  
"Partial purification and characterisation of NAG *Vibrio* enterotoxin".  
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Grig A; 239, 493 - 503, 1977.

24. - COLEMAN (W.H.), KAUR (J.), IWERT (M.E.), KASAI (G.J.), BURROWS (W.).  
"Cholera toxins : purification and preliminary characterisation  
of ileal loop reactive type 2 toxin".  
J. Bacteriol., 96, 1137 - 1143, 1968.
25. - CRAIG (J.P.).  
"A permeability factor (toxin) found in cholera stools and cul-  
ture filtrates and its neutralization by convalescent cholera  
sera".  
Nature, 207, 614 - 616, 1965.
26. - CRAIG (J.P.), YAMAMOTO (K.), TAKEDA (Y.), MIWATANI (T.).  
"Production of cholera like enterotoxin by a strain of *Vibrio*  
*cholerae* non O1, isolated from environment".  
Inf. Immun., 34, 90 - 97, 1981.

## D

27. - DE (S.N.).  
"Enterotoxicity of bacteria free filtrate of *Vibrio cholerae*".  
Nature, 183, 1533 - 1539, 1959.
28. - DE (S.N.), CHATTERJEE (D.N.).  
"An experimental study of the mechanism of cholerae on the intes-  
tinal mucuous membrane".  
J. Pathol. Bacteriol., 66, 559 - 562, 1953.
29. - DE (S.N.), GHOSE (M.L.), CHANDRA (J.).  
"Further observations on cholera enterotoxin".  
J. Trans. Roy. Soc. Trop. Med., 56, 241 - 245, 1962.
30. - DE MOOR (C.E.).  
"Paracholera (E1 Tor) enteritis choleriformis eltor van Loghem".  
Bull. OMS, 2, 5 - 19, 1949.
31. - DIZON (J.J.), FUKUMI (H.), BARUA (D.), VALERA (J.) et Coll.  
"Studies on cholera carriers".  
Bull. OMS, 37, 737 - 743, 1967.

32. - DODIN (A.), FELIX (H.).  
"Du rôle de la sueur dans l'épidémiologie du cholera en pays secs".  
Bull. Acad. Nat. Med., 156, 845 - 852, 1972.
33. - DRASKOVICOVA (M.), KAROLCEK (J.L.), WINKLER (D.).  
"Experimental toxigenicity of NAG Vibrios".  
Zbl. Bakl. Hyg. I. Abt. Orig. A, 237, 65 - 71, 1977.
34. - DURITHIN (K.V.).  
"Cholera toxin and neuraminidase production by cholera vibrios in vitro".  
Bull. Exp. Biol. Med., 81, 707 - 708, 1976.
35. - DUTTA (NK), PANSE (M.V.), KULKARNI (D.R.).  
"Role of cholera toxin in experimental cholera".  
J. Bacteriol., 78, 594 - 595, 1959.

## E

36. - ENGWAL (E.), PERIMANN (P.).  
"Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA.III : quantitation of specific antibodies by enzyme labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes".  
J. Immunol., 109, 129 - 135, 1972.
37. - ESSELMAN (M.T.), LIU (P.V.).  
"Lecithinase production by gram negative bacteria".  
J. Bacteriol., 81, 939 - 945, 1961.

## F

38. - FEACHEM (R.G.).  
"Environmental aspect of cholera epidemiology I : a review of selected reports of endemic and epidemic situation during 1961 - 1980".  
Trop. Dis. Bull., 78, 675 - 698, 1981.

39. - FEACHEM (R.G.).  
"Environment aspects of cholera epidemiology III : transmission and control".  
Trop. Dis. Bull., 79, 1 - 47, 1982.
40. - FEACHEM(R.G.), MILLER (C.), DRASAR (B.).  
"Environmental aspect of cholera epidemiology II : occurrence and survival of *Vibrio cholerae* in the environment".  
Trop. Dis. Bull., 78, 865 - 880, 1981.
41. - FELSENFELD (O.).  
"Present statut of the eltor problem".  
Bact. Review, 28, 72 - 86, 1964.
42. - FINKELSTEIN (R.A.).  
"Cholera enterotoxin : Robert Koch revisited".  
Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. A, 235, 13 - 19, 1976.
43. - FINKELSTEIN (R.A.).  
"The relevance of the irrelevant".  
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A, 239, 283 - 293, 1977.
44. - FINKELSTEIN (R.A.), ATTAHSAMPUNNA (P.), CHARUNMETHEE (P.).  
"Pathogenesis of experimental cholera : biologic activities of purified procholerae A".  
J. Immunol., 96, 440 - 449, 1966.
45. - FINKELSTEIN (R.A.), BOESMAN (M.), NEOH (S.), La RUE (M.K.), DELANAY (R.).  
"Dissociation and recombination of subunits of cholera enterotoxin (cholerae A)".  
J. Immunol., 113, 145 - 150, 1974.
46. - FINKELSTEIN (R.A.), La RUE (M.K.), LOSPALLUTO (J.J.).  
"Properties of cholera exoenterotoxin : effects of dispersing agents in gel filtration and electrophoresis".  
Inf. Imm., 6, 934 - 944, 1972.
47. - FINKELSTEIN (R.A.), LOSPALLUTO (J.J.).  
"Pathogenesis of experimental cholera : preparation and isolation of cholerae A and cholerae A".  
J. Exp. Med., 130, 185 - 202, 1969.

48. - FINKELSTEIN (R.A.), LOSPALLUTO (J.J.).  
"Crystalline cholera toxin and toxoid".  
Science, 175, 529 - 530, 1972.
49. - FINKELSTEIN (R.A.), MUKERJEE (S.).  
"Hemagglutination : a rapid method for differentiating *Vibrio cholerae* and eltor *Vibriosis*".  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 355 - 359, 1963.
50. - FINKELSTEIN (R.A.), NORRIS (H.T.), DUTTA (H.).  
"Pathogenesis of experimental cholera in infant rabbits I : observation on the intraintestinal infection and experimental cholera produced with cell-free products".  
J. Inf. Dis., 114, 203 - 216, 1964.
51. - FINKELSTEIN (R.A.), PETERSON (J.W.).  
"In vitro detection of cholera enterotoxin in cholera patients and laboratory animals".  
Inf. Imm., 1, 21 - 29, 1970.
52. - FINKELSTEIN (R.A.), SOBOSINSKI (P.Z.), ATTHSAMPUNNA (P.), CHARUNMETHEE (P.).  
"Pathogenesis of experimental cholera : identification of cholera-gen (procholera-gen A) by disc immunoelectrophoresis and its differentiation from cholera mucinase".  
J. Immunol., 97, 25 - 33, 1966.
53. - FRETER (R.).  
"The serologic character of cholera vibrio mucinase".  
J. Inf. Dis., 97, 238 - 245, 1955.
54. - FRETER (R.).  
"Studies of the mechanism of action of intestinal antibody in experimental cholera".  
Tex. Rep. Biol. Med., 27, 299 - 316, 1969.
55. - FRETER (R.), ALLWEIS (B.), O'BRIEN (P.C.M.), HALSTEAD (S.A.), MACSAI (M.S.).  
"Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa : in vitro studies".  
Inf. Imm., 34, 241 - 249, 1981.

56. - FRETER (R.), O'BRIEN (P.C.M.), MACSAI (M.S.).  
"Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with  
intestinal mucosa : in vivo studies".  
*Inf. Immun.*, 34, 234 - 240, 1981.

## G

57. - GALLUT (Y.).  
"Tendances actuelles du choléra asiatique".  
*Rev. Hyg. Med. Soc.*, 14, 699 - 722, 1966.
58. - GALLUT (J.).  
"The cholera vibrios".  
*In: cholera* (Barua, and Burrows eds.), 17 - 40, (W.B. Saunders  
Company - Philadelphia - London - Toronto), 1974.
59. - GAN (K.H.), TJIA (S.K.).  
"A new method for the differentiation of *Vibrio comma* and *Vibrio*  
*eltor*".  
*AMER, J. Hyg.*, 77, 184 - 186, 1963.
60. - GANGAROSA (E.J.), BEISEL (W.R.), BENYAJATI (C.), SPING (H.),  
PIYARATA (P.).  
"The nature of the gastrointestinal lesion in asiatic cholera  
and its relation to pathogenesis : a biopsy study".  
*AMER, J. Trop. Med.*, 9, 125 - 135, 1960.
61. - GARDNER (A.D.), VENKATRAMAN (K.V.).  
"The antigen of cholera groupe vibrios".  
*J. Hyg. (Camb)*, 35, 262, 1935.
62. - GASCOYNE (N.), VAN HEYMINGEN (W.E.).  
"Unmasking of actual and potentiel receptor sites for cholera  
toxin in intestinal mucosal homogenates".  
*J. Inf. Dis.*, 139, 235 - 236, 1979.
63. - GERDES (J.C.), ROMIG (W.R.).  
"Genetic basis of toxin production and pathogenesis in *Vibrio*  
*cholerae*. Evidence against phage conversion".  
*Inf. Imm.*, 11, 445 - 452, 1975.

- 64. - GHOSH (A.K.), DE (S.P.), MUKERJEE (S.).  
 "Immunogenic studies on non agglutinable vibrios with particular reference to toxigenicity".  
 Ann. Inst. Pasteur, 118, 41 - 48, 1970.
  
- 65. - GOTTSCHALK (A.).  
 "Neuraminidase : the specific enzyme of Influenza virus and Vibrio cholerae".  
 B.B.A., 23, 645, 1956.
  
- 66. - GUECHI (Z.), MERED (M.).  
 "Quèlques aspects de l'évolution du cholera en Algérie de 1971 - à 1975".  
 Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 53, 241 - 246, 1978-1979.
  
- 67. - GUENTZEL (M.N.), BERRY (L.J.).  
 "Motility as virulence factor for Vibrio cholerae".  
 Inf. Immun., 11, 890 - 897, 1975.
  
- 68. - GUERRANT (R.L.), BRUNTON (L.L.), SCHNAITMAN (T.C.), REBHUN (I.T.), GILMAN (A.G.).  
 "Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology : a rapid sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and E.Coli".  
 Inf. Immun., 10, 320 - 327, 1974.
  
- 69. - GUHATHAKURTA (B.) , BHATTACHARYA (S.), DATTA (G.C.), GHOSH (A.K.).  
 "Enzymes of non agglutinable vibrio and their possible role in developement of enterotoxigenic factor".  
 Experientia, 15, 903 - 904, 1973.
  

**H**

  
- 70. - HAKSAR (A.), MANDSLEY (D.V.), PERON (D.V.), PERON (F.G.).  
 "Neuraminidase treatment of adrenal cells increases their response to cholera enterotoxin".  
 Nature, 251, 514 - 515, 1974.

71. - HOHNGREN (J.).  
"Action of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera".  
Nature, 292, 413 - 417, 1981.
72. - HOLMGREN (J.), LONNROTH (I.).  
"Oligometric structure of cholera toxin : characteristics of the H and L subunits".  
J. Gen. Microbiol., 86, 49 - 65, 1975.
73. - HOLMGREN (J.), LONNROTH (I.), OUCHTERLONY (O).  
"Immunochemical studies of two cholera toxin-containing standard culture filtrate preparation of Vibrio cholerae".  
Inf. Immun., 3, 745 - 755, 1971.
74. - HOLMGREN (J.), LONNROTH (I.), SVENNERHOLM (L.).  
"Tissue receptor for cholera exotoxin : postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids".  
Inf. Immun., 8, 208 - 214, 1973.
75. - HOLMGREN (J.), SVENNERHOLM (L.).  
"Mechanism of disease and immunity in cholera : a review".  
J. Inf. Dis., 136, S105 - S112, 1977.
76. - HONDA (T.), FINKEISTEIN (R.A.).  
"Purification and characterization of a hemolysine produced by Vibrio cholerae biotype eltor ; another toxic substance produced by cholera vibrios".  
Inf. Immun., 26, 1020 - 1027, 1979.
77. - JENSEN (K.E.).  
"Immunologic characterization of a mucolytic enzyme of Vibrio cholerae".  
J. Inf. Dis., 93, 107 - 110, 1953.
78. - JUSATZ (H.J.).  
"150 years of pandemics of asiatic cholera 1831 - 1981".  
Zbt, Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. A, 252, 257 - 267, 1982.

K

79. - KAMAL (A.M.).  
"The seventh pandemic of cholera".  
In: Cholera (Barua and Burrows eds.) (W.B. Saunders company - Philadelphia - London - Toronto), 1 - 14, 1974.
80. - KASAI (G.J.), BURROWS (W.).  
"The titration of cholera toxin and antitoxin in the rabbit ileal loop".  
J. Inf. Dis., 166, 606 - 614, 1966.
81. - KING (C.A.), VAN HEYNINGEN (W.E.).  
Deactivation of cholera toxin by sialidase resistant monosialoganglioside".  
J. Inf. Dis., 127, 639 - 647, 1973.

M

82. - KUBERSKI (T.), FLOOD (T.), TERA (T.), and the New Zealand cholera relief Team.  
"Cholera in the Gilbert Islands I. : Epidemiology features".  
AMER. J. Trop. Med. Hyg., 28; 677 - 684, 1979.
83. - KUSAMA (H.), CRAIG (J.P.).  
"Production of biologically active substances by two strains of *Vibrio cholerae*".  
Inf. Immun., 1, 80 - 87, 1970.

L

84. - LAI (C.Y.), MENDEZ (E.), CHANG (D.).  
"Chemistry of cholera toxin : the subunit structure".  
J. Inf. Dis., 133, S23 -S30, 1976.
85. - LEVINE (M.M.), KAPER (J.B.), BLACK (R.E.), CLEMENTS (M.L.).  
"New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development".  
Microb. Reviews, 47, 510 - 550, 1983.

86. - LIU (P.V.), ABE (Ya), BATES (J.L.).  
"The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis".  
J. Inf. Dis., 108, 218 - 228, 1961.
87. - LONNROTH (I.), HOLMGREN (J.).  
"Subunit structure of cholera toxin".  
J. Gen. Microbiol., 76, 417 - 427, 1973.
88. - LOSPALLUTO (J.J.), FINKELSTEIN (R.A.).  
"Properties of cholera exoenterotoxin (choleraegen) and its spontaneously formed toxoid (choleraegenoid)".  
B.B.A., 257, 158 - 166, 1972.
89. - LOWENTHAL (J.P.).  
"Stability of a fluid cholera mucinase preparation when combined with a commercially prepared cholera vaccine".  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93, 103 - 106, 1956.

## M

90. - MADDEN (J.M.), NEMATOLAKI (M.P.), HILL (W.E.), Mc CORDELLE (B.A.), MTWEDT (R.).  
"Virulence of three clinical isolates of *Vibrio cholerae* non O1 serogroup in experimental enteric infections in rabbits".  
Inf. Imm., 33, 616 - 619, 1981.
91. - MAGNUSSON (B.), GULASEKHARAM (J.).  
"A lecithin hydrolysing enzyme which correlates with haemolytic activity in eltor vibrio supernates".  
Nature, 206, 728, 1965.
92. - Mc INTYRE (O.R.), FEELY (J.C.), GREENOUGH (W.B.), BENENSON (A.S.); HASSAN (S.), SAAD (A.).  
"Diarrhea caused by non cholera vibrios".  
AM. J. Trop. Med. Hyg. 14, 412,- 418, 1966.
93. - MERED (M.), BOUGUERMOUH (A.), ABBADI (M.) RAHAL (K.), MOKHTARI (Z.) et Coll.  
"L'épidémie de cholera observée en 1971 en Algérie".  
Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 49, 85 - 97, 1971.

94. - MILLIGAN (T.W.), BAKER (C.J.), STRAUSS (D.C.), MATTINGLY (S.J.).  
"Association of elevated levels of extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B streptococci".  
Inf. Immun., 21, 738 - 746, 1978.
95. - MITRA (S.), CHATTERJEE (G.C.).  
"Lecithin splitting enzymes of *Vibrio cholerae*".  
Nature, 189, 837, 1961.
96. - MORIYAMA (T.), BARKSDALE (L.).  
"Neuraminidase of *Corynebacterium diphtheriae*".  
J. Bacteriol., 94, 1565 - 1581, 1967.
97. - MOSLEY (W.H.), ALVERO (M.G.), JOSEPH (P.R.), TAMAYO (J.F.),  
GOMEZ (G.Z.), MONTAGUE (T.), DIZON (J.J.), HENDERSON (D.A.).  
"Studies of cholera eltor in the Philippines. 4 : Transmission of infection among neighbourhood and community contacts of cholera patients".  
Bull. OMS, 33, 651 - 660, 1965.
98. - MOSLEY (W.H.), AZIZ (K.M.S.), AHMED (A.).  
"Serological evidence for the identity of the vascular permeability factor and ileal loop toxin of *Vibrio cholerae*".  
J. Inf. Dis., 121, 243 - 250, 1970.
99. - MUKERJEE (S.).  
"The bacteriophage susceptibility test in differentiating *Vibrio cholerae* and *Vibrio eltor*".  
Bull. OMS, 28, 333 - 336, 1963.
100. - MULLER (H.E.).  
"Occurrence of neuraminidase and acylneuraminidate pyruvate lyase in a strain of *Vibrio* falling in Heiberg's group II isolate from a patient with diarrhea".  
Inf. Immun., 8, 430 - 433, 1973.
101. - MULLER (H.E.).  
"Neuraminidase of bacteria and protozoa and their pathogenic role".  
Behring Inst. Mitt., 55, 34 - 56, 1974.
102. - MURTI (C.R.K.).  
"The Enzymology of *Vibrio cholerae*".  
J. Sci. Indust. Res., 27, 430 - 447, 1968.

# N

- 138 -

103. - NELSON (E.T.), CLEMENTS (J.D.), FINKESTEIN (R.A.).  
 "Vibrio cholerae adherence and colonization in experimental cholera : electron microscopic studies".  
 Inf. Immun., 14, 527 - 547, 1976.
104. - NISHIBUCHI (M.), SEIDLER (R.J.).  
 "Medium dependant production of extracellular enterotoxins by non O1 Vibrio cholerae, Vibrio mimicus and Vibrio fluvialis".  
 Appl. Environm. Microbiol., 45, 228 - 231, 1983.
105. - NORRIS (H.T.).  
 "The pathology of cholera".  
 In Cholera (Barua and Burrows eds.) (W.B. Saunders Company - Philadelphia - London - Toronto) 169 - 187 , 1974.

# O

106. - O'BRIEN (A.D.), CHEN (M.E.), HOLMES (R.K.), KAPER (J.), LEVINE (M.M.)  
 "Environmental and human isolates of Vibrio cholerae and vibrio parahaemolyticus produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin".  
 Lancet, 1, N°8368, 77 - 78, 1984.
107. - OHASHI (M.), SHIMADA (T.), FUKUMI (H.).  
 "In vitro production of enterotoxin and hemorrhagic principle by Vibrio cholerae NAG".  
 Jap. J. Med. Sci. Biol., 25, 179 - 194, 1972.
108. - OZA (N.B.), DUTTA (N.K.).  
 "Experimental cholera produced by toxin prepared by ultrasonic desintegration of Vibrio comma".  
 J. Bacteriol., 85, 497 - 498, 1963.

# P

109. - PETERSON (J.W.), LOSPALLUTO (J.), FINKESTEIN (R.A.).  
 "Localization of cholera toxin in vivo".  
 J. inf. Dis. 6, 617 - 628, 1972.

110. - PIERCE (N.F.), MONDAL (A.).  
"Clinical features of cholera".  
In Cholera (Barua and Burrows Eds) (W.B. Saunders Co, Philadelphia  
London - Toronto), 209 - 220, 1974.
111. - POLLITZER (R.).  
"Cholera studies 3 : bacteriology".  
Bull. OMS, 12, 777 - 875, 1955.
112. - POLLITZER (R.).  
"Cholera".  
Monographic series n° 43, OMS, Geneve, 1959.
113. - PUNY ASHTHITIK (K.), FINKELSTEIN (R.A.).  
"Enteropathogenicity of Escherichia coli. I : evaluation of mouse  
intestinal loops".  
Inf. Immun., 4, 473 - 478, 1971.
114. - RICHARDSON (S.H.).  
"Factors influencing in vitro skin permeability factor production  
by Vibrio cholerae".  
J. Bacteriol., 100, 27 - 34, 1969.
115. - RICHARDSON (S.H.).  
"Biochemistry of Vibrio cholerae virulence : purification and  
biochemical properties of PF/Cholera enterotoxin".  
Inf. Immun., 1, 546 - 554, 1970.
116. - RICHARDSON (S.H.), NOFTLE (K.A.).  
"Purification and properties of permeability factor/cholera  
enterotoxin from complex and synthetic media".  
J. Inf. Dis., 121, 73 - 79, 1970.
117. - SAKAZAKI (R.), TAMURA (K.), GUNDE (C.S.), SEN (R.).  
"Ecological studies of the cholera group of vibrios".  
Lancet, N° 8328, 809 - 807, 1963.
118. - SAKAZAKI (R.), GUNDE (C.S.), SEN (R.).  
"Chemical studies of the so-called SAG vibrios".  
Lancet, N° 8328, 809 - 807, 1963.
119. - SAKAZAKI (R.), TAMURA (K.), GUNDE (C.S.), SEN (R.).  
"Ecological studies of the cholera group of vibrios".  
Lancet, N° 8328, 809 - 807, 1963.
120. - SAHMAN (A.S.M.), MYUNG (M.), FARUQUE (A.S.G.).  
"Classical Vibrio cholerae biotype displaces enterotoxin in Bangladesh".  
Lancet, N° 8328, 809 - 807, 1963.
121. - SARTER (G.V.), YEE-FOON (J.), GLICK (M.C.).  
"A rapid assay for neuraminidase : the detection of SAG differ-
122. - SARTER (G.V.), ALAM (K.), NEGGI (P.K.B.), HUI (M.T.), ALMAHMOUD (M.).  
"A rapid assay for neuraminidase : the detection of SAG differ-
123. - SCHICK (H.J.), SCHMIDTMEYER (R.J.), BRANUCCI (M.G.).  
"Mapping of a gene in Vibrio cholerae that determines the anti-
124. - SCHICK (H.J.), SCHMIDTMEYER (R.J.).  
"Affinity of Vibrio cholerae neuraminidase to different human  
sialoglycoproteins".  
Behring Inst. Mitt., 55, 123 - 128, 1974.

S

117. - SACK (D.A.), HUDA (S.), NEOGI (P.K.P.), DANIEL (R.R.), SPIRA (W.M.).  
"Microtiter ganglioside enzyme linked immunosorbent assay for Vibrio and E.coli heat labile enterotoxin and antitoxin".  
J. Clin. Microbiol., 11, 35 - 40, 1980.
118. - SAKAZAKI (R.), GOMEZ (C.I.), SEBALD (M.).  
"Taxonomical studies of the so-called NAG vibrios".  
Jap. J. Med. Sci. Biol., 20, 265 - 280, 1967.
119. - SAKAZAKI (R.), TAMURA (K.), GOMEZ (C.Z.), SEN (R.).  
"Serological studies on the cholera groupe of vibrios".  
Jap. J. Med. Sci. Biol., 23, 13 - 20, 1970.
120. - SAMADI (A.R.), HUQ (M.I.), SHAHID (N.), KHAN (M.U.), EUSOF (A.), RAHMAN (A.S.M.), MYUNUS (M), FARUQUE (A.S.G.).  
"Classical Vibrio cholerae biotype displaces eltor in Bangladesh".  
Lancet, N°8328, 805 - 807, 1983.
121. - SANTER (U.V.), YEE-FOON (J.), GLICK (M.C.).  
"A rapid assay for neuraminidase : the detection of TWO differences in activity associated with virus transformation".  
Bioch. Bioph. Acta, 523, 435 - 442, 1978.
122. - SANYAL (S.C.), ALAM (K.), NEOGI (P.K.B.), HUQ (M.I.), ALMAHMUD (K.A.).  
"A new cholera toxin".  
Lancet, I, 1337, 1983.
123. - SAUNDERS (D.W.), SCHAMBACHER (K.J.), BRAMUCCI (M.G.).  
"Mapping of a gene in Vibrio cholerae that determines the antigenic structure of cholera toxin".  
Inf. Immun., 38, 1109 - 1116, 1982.
124. - SCHICK (H.J.), SCHMIDTBERGER (R.).  
"Affinity of Vibrio cholerae neuraminidase to different human sialoglycoproteines".  
Behring Inst. Mitt., 55, 123 - 128, 1974.

125. - SCHNEIDER (D.R.), PARKER (C.D.).  
"Isolation and characterization of protease deficient mutants of *Vibrio Cholerae*".  
J. Inf. Dis., 138, 143 - 151, 1978.
126. - SCHNEIDER (D.R.), PARKER (C.D.).  
"Purification and characterization of mucinase of *Vibrio cholerae*".  
J. Inf. Dis., 145, 474 - 482, 1982.
127. - SCHRANK (G.D.), VERWEY (W.F.).  
Distribution of cholera organisms in experimental *Vibrio cholerae* infections : proposed mechanism of pathogenesis and antibacterial immunity".  
Inf. Imm., 13, 195 - 203, 1976.
128. - SEIDLER (D.), MULLER (M.E.).  
"Neuraminidase neutralizing antibodies in pigs with chronic erysipelothrix insidiosa infection".  
Behring Inst. Mitt., 55, 152 - 154, 1974.
129. - SHEWAN (J.M.), VERON (M.).  
"The genus vibrio".  
In R.E. Buchanam et N.E. Gibbons - Bergey's manual of determinative bacteriology 8e ed. Williams et Wilkins - Baltimore, 340 - 355, 1974.
130. - SHRIVASTAVA (D.L.).  
"Enzymes in *Vibrio cholerae*".  
Ind. J. Med. Res., 801 - 808, 1964.
131. - SING (G.), AHUJA (M.L.).  
"Observation on the intestinal epithelium desquamating enzyme of vibrios isolated of cholera and non cholera sources".  
Ind. J. Med. Res., 41, 285, 1953.
132. - SINGH (S.J.), SANYAL (S.C.),  
"Enterotoxicity of the so called NAG vibrios".  
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 58, 133 - 140, 1978.
133. - SMITH (H.L.).  
"Serotyping of non cholera vibrios".  
J. Clin. Microb., 10, 85 - 90, 1979.

134. - SPIRA (W.M.), FEDORKA CRAY (P.J.), PETTEBONE (P.).  
"Colonization of the rabbit small intestine by clinical and environmental isolates of non O1 vibrio cholerae and vibrio mimicus".  
Inf. Imm. 41, 1175 - 1183, 1983.
135. - SPYRIDES (G.J.), FEELY (J.C.).  
"Concentration and purification of cholera exotoxin by absorption on aluminium compound gels".  
J. Inf. Dis., 121, 96 - 99, 1970.
136. - SRIVASTAVA (R.), SINBA (S.B.), SRIVASTAVA (B.S.).  
"Events in the pathogenesis of experimental cholera : role of bacterial adherence and multiplication".  
J. Gen. Microb., 13, 1 - 9, 1980.
137. - STARK (J.), RONNEBERGER (H.J.), VIEGANDT (H.).  
"Neuraminidase : a virulence factor in Vibrio cholerae infection".  
Behring Inst. Mitt., 55, 145 - 146, 1974.
138. - STOLL (B.J.), HOLMGREN (J.), BARDHAN (P.K.), HUQ (I.), GREENOUGH III (W.B.), FREDMAN (P.), SVENNERHOLM (L.).  
"Binding of intraluminal toxin in cholera : trial of GM1 Ganglioside charcoal".  
Lancet, II, 888 - 891, 1980.
139. - SVENNERHOLM (A.M.), HOLMGREN (J.).  
"Identification of E.coli heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1 ELISA)".  
Curr. Microbiol., 1, 19 - 24, 1978.
- V
140. - VAN HEYMINGEN (S.).  
"Cholera toxin : interaction of subunits with gangliosides GM1".  
Science 183, 656 - 657, 1974.
141. - VAN HEYMINGEN (S.).  
"The subunits of cholera toxin : structure, stoichiometry and fonction".  
J. Inf. Dis., 133, S5 - S13, 1976.

134. - SPIRA (W.M.), FEDORKA CRAY (P.J.), PETTEBONE (P.).  
"Colonization of the rabbit small intestine by clinical and environmental isolates of non O1 vibrio cholerae and vibrio mimicus".  
Inf. Imm. 41, 1175 - 1183, 1983.
135. - SPYRIDES (G.J.), FEELY (J.C.).  
"Concentration and purification of cholera exotoxin by absorption on aluminium compound gels".  
J. Inf. Dis., 121, 96 - 99, 1970.
136. - SRIVASTAVA (R.), SINBA (S.B.), SRIVASTAVA (B.S.).  
"Events in the pathogenesis of experimental cholera : role of bacterial adherence and multiplication".  
J. Gen. Microb., 13, 1 - 9, 1980.
137. - STARK (J.), RONNEBERGER (H.J.), VIEGANDT (H.).  
"Neuraminidase : a virulence factor in Vibrio cholerae infection".  
Behring Inst. Mitt., 55, 145 - 146, 1974.
138. - STOLL (B.J.), HOLMGREN (J.), BARDHAN (P.K.), HUQ (I.), GREENOUGH III (W.B.), FREDMAN (P.), SVENNERHOLM (L.).  
"Binding of intraluminal toxin in cholera : trial of GM1 Ganglioside charcoal".  
Lancet, II, 888 - 891, 1980.
139. - SVENNERHOLM (A.M.), HOLMGREN (J.).  
"Identification of E.coli heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1 ELISA)".  
Curr. Microbiol., 1, 19 - 24, 1978.

V

140. - VAN HEYMINGEN (S.).  
"Cholera toxin : interaction of subunits with gangliosides GM1".  
Science 183, 656 - 657, 1974.
141. - VAN HEYMINGEN (S.).  
"The subunits of cholera toxin : structure, stoichiometry and fonction".  
J. Inf. Dis., 133, S5 - S13, 1976.

142. - VAN HEYMINGEN (S.).  
"Cholera toxin".  
Biol. Rev., 52, 509 - 549, 1977.
143. - VAN HEYMINGEN (W.E.).  
"Gangliosides as membrane receptors for tetanos toxin, cholera toxin and serotonin".  
Nature, 249, 415 - 417, 1974.
144. - VAN HEYMINGEN (W.E.), CARPENTER (C.C.J.), PIERCE (N.), GREENOUGH III (W.B.).  
"Deactivation of cholera toxin by ganglioside".  
J. Inf. Dis., 124, 415 - 418, 1971.
145. - VASIL (H.L.), HOLMES (R.K.), FINKELSTEIN (R.A.).  
"Studies on toxigenesis in *Vibrio cholerae*:II : an in vitro test for enterotoxin production".  
Inf. Immun., 9, 195 - 197, 1974.
146. - VASIL (H.L.), HOLMES (R.K.), FINKELSTEIN (R.A.).  
"Conjugal transfer of a chromosomal gene determining production of enterotoxin in *Vibrio Cholerae*".  
Science, 187, 849 - 850, 1975.

## W

147. - WARREN (L.);  
"The thiobarbituric acid assay of sialic acids".  
J. Biol. Chemistry, 234, 1972-1975, 1959.
148. - WATANABE (Y.).  
"Antimicrobial immunity in cholera".  
In Cholera (Barua and Burrows eds.) (W.B. Saunders Company - Philadelphia - London - Toronto), 283 - 306, 1974.
149. - W.H.O. Scientific working group :  
"Cholera and other vibrio-associated diarrheas".  
Bull. OMS, 58, 353 - 374, 1980.

Y

150. - YALA (F.), DODIN (A.), DIANA (Y.).  
"Role de la contamination interhumaine pendant l'épidémie de cholera en République Populaire du Congo (1978 - 1979)".  
Bull. Soc. Path. Exo., 75, 345 - 351, 1982.
151. - YAMAMATO (K.), TAKEDA (Y.), MIWATANI (T.), CRAIG (P.).  
"Purification and some properties of non O1 Vibrio cholerae enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin".  
Inf. Immun., 39, 1128 - 1135, 1983.
152. - YAMAMATO (K.); TAKEDA (Y.), MIWATANI (T.), CRAIG (J.P.).  
"Evidence that a non O1 vibrio cholerae produces an enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin".  
Inf. Immun., 41, 896 - 901, 1983.
153. - YOUNG (C.R.), LEVINE (M.M.), CRAIG (J.P.), BROWN (R.R.).  
"Microtiter enzyme linked immunosorbent assay for immunoglobulin G cholera antitoxin in humans method and correlation with rabbit skin vascular permeability factor techniques".  
Inf. Immun., 27, 492 - 496, 1980.

## REMERCIEMENTS

---

*Nous remercions vivement,*

- *Le Professeur F. BOULAHBAL pour avoir accepté de nous faire l'honneur d'être notre Directeur de thèse et pour toute l'aide prodiguée au cours de ce travail.*
  
- *Le Professeur M. BENHASSINE, Directeur de l'Institut Pasteur d'Algérie, pour toute son aide.*
  
- *Messieurs Youssef BENYAHIA  
Badr Eddine BOUDJELLAB  
Belkacem TAOUCHICHET*
- *Madame Nadia NAILI*

*Techniciens au Laboratoire Choléra Recherche pour leur collaboration technique, sans laquelle ce travail n'aurait pu être réalisé.*

- *Mlle F.Zohra OULD-CHERIF pour avoir assuré la frappe de cette thèse.*

T A B L E      D E S      M A T I E R E S

---

|  | PAGE |
|--|------|
| INTRODUCTION .....   | 1    |
| CHAPITRE I. : Rappels sur la bactériologie, l'épidémiologie<br>et la pathogénie du cholera |      |
| 1. - Epidémiologie du cholera .....  | 8    |
| 1.1. - Rappel clinique et mode de transmission<br>du cholera .....                         | 8    |
| 1.2. - Historique du cholera dans le monde et<br>de la découverte des agents responsables  | 8    |
| 1.2.1.- Le choléra dans le monde .....   | 8    |
| 1.2.2.- Les agents responsables du choléra   | 8 X  |
| 2. - Rappel bactériologique .....  | 12   |
| 2.1. - Définition et classification des germes<br>responsables du choléra .....            | 12 X |
| 2.2. - Principaux caractères biochimiques des<br>germes responsables du choléra .....      | 13   |
| 2.3. - Structure antigénique .....   | 14   |
| 2.4. - Substances élaborées par les vibrions ...   | 15   |
| 2.4.1.-L'entérotoxine cholérique .....   | 16   |
| 2.4.1.1.- Découverte de l'entérotoxine ..  | 16   |
| 2.4.1.2.- Propriétés de l'entérotoxine<br>cholérique .....                                 | 18   |
| 2.4.2. - La mucinase .....   | 19   |
| 2.4.3. - La neuraminidase .....  | 21   |
| 2.4.4. - La lécithinase .....  | 22   |

|  |        |
|--|--------|
| 3. - Pathogénie du cholera .....                                 | 22 X   |
| 3.1. - Adhésion des bactéries à la muqueuse<br>intestinale ..... | 23     |
| 3.2. - Action de l'entérotoxine cholérique .....                 | 23     |
| 3.3. - Rôles éventuels de ces enzymes .....                      | 25     |
| 3.3.1.- Rôle éventuel de la mucinase .....                       | 25     |
| 3.3.2.- Rôle éventuel de la neuraminidase ..                     | 25     |
| 3.3.3.- Rôle éventuel de la lécithinase ....                     | 26     |
| <br>CHAPITRE II : Matériel et méthodes .....                     | <br>28 |
| 1. - Souches étudiées .....                                      | 29     |
| 2. - Techniques .....  | 30     |
| 2.1. - Techniques de mise en évidence de la toxine..             | 30     |
| 2.1.1.- Technique GM-1 ELISA .....                               | 30     |
| 2.1.1.1.- Matériel .....   | 31     |
| 2.1.1.2.- Méthode .....  | 33     |
| 2.1.2.- Technique sur intestin ligaturé<br>de lapin .....        | 37     |
| 2.1.2.1.- Matériel .....   | 37     |
| 2.1.2.2.- Méthode .....  | 37     |
| 2.1.3.- Méthode sur intestin ligaturé<br>de souris .....         | 39     |
| 2.1.3.1.- Matériel .....   | 40     |
| 2.1.3.2.- Méthode .....  | 40     |
| 2.2. - Mise en évidence de la mucinase .....                     | 41     |
| 2.2.1.- Matériel .....   | 41     |
| 2.2.2.- Méthode .....  | 44     |
| 2.3. - Mise en évidence de la lécithinase .....                  | 45     |
| 2.3.1.- Matériel .....   | 45     |
| 2.3.2.- Méthode .....  | 46     |
| 2.4. - Mise en évidence de la neuraminidase .....                | 46     |
| 2.4.1.- Matériel .....   | 47     |
| 2.4.2.- Méthode .....  | 47     |

|   |    |
|---|----|
| 2.5. - Etude de l'influence des enzymes<br>sur l'activité de la toxine .....  | 50 |
| 2.5.1.- Etude de la relation entre la pro-<br>duction d'enzymes et celle de la<br>toxine .....                            | 50 |
| 2.5.2.- Etude de l'influence de l'inhibition<br>des enzymes sur la réponse de l'in-<br>testin ligaturé de lapin .....     | 50 |
| 2.5.2.1.- Matériel .....  | 50 |
| 2.5.2.2.- Méthode .....   | 51 |
| 2.6. - Etude statistique .....  | 52 |
| CHAPITRE III : Résultats .....  | 53 |
| 1. - Etude de la production de la toxine .....  | 54 |
| 1.1. - Etude de l'influence des milieux des culture<br>sur la production de la toxine .....                               | 54 |
| 1.2. - Etude comparative des techniques de mise en<br>évidence de la toxine .....   | 59 |
| 1.3. - Etude comparative de la production de la<br>toxine par les vibrions cholériques O1 et<br>les vibrions N.A.G. ....  | 61 |
| 1.3.1.- Etude chez les vibrions cholériques O1  | 61 |
| 1.3.2.- Etude chez les vibrions NAG .....   | 62 |
| 1.3.3.- Etude comparative de la production<br>de toxine pour les vibrions choléri-<br>ques O1 et les vibrions N.A.G. .... | 63 |
| 1.4. - Etude de la production de toxine en fonction<br>de l'origine des souches .....                                     | 64 |
| 1.4.1.- Etude chez les souches isolées<br>de sujets hospitalisés .....  | 64 |
| 1.4.2.- Etude chez les souches isolées<br>de sujets contacts .....  | 66 |
| 2. - Etude de la production de la mucinase .....  | 67 |
| 2.1. - Etude des conditions nécessaires à la pro-<br>duction de la mucinase .....   | 67 |
| 2.1.1.- Etude de l'influence des milieux<br>de culture sur la production de la<br>mucinase .....                          | 67 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.2.- Etude de l'influence du temps<br>d'incubation et des solutions<br>tampon sur la production et le<br>titre de la mucinase ..... | 68 |
| 2.2. - Production de la mucinase par les vibrions<br>cholériques O1 et les vibrions N.A.G. ....  | 70 |
| 2.3. - Production de la mucinase en fonction de<br>l'origine des souches .....   | 71 |
| 3. - Etude de la production de la lécithinase .....  | 73 |
| 3.1. - Etude de l'influence des milieux de culture<br>sur la production de lécithinase .....   | 73 |
| 3.2. - Production de la lécithinase par les vibrions<br>cholériques O1 et les vibrions N.A.G. ....                                     | 73 |
| 3.3. - Production de la lécithinase en fonction de<br>l'origine des souches .....  | 75 |
| 4. - Etude de la production de neuraminidase .....   | 77 |
| 4.1. - Production de la neuraminidase par les vi-<br>brions cholériques O1 et les vibrions N.A.G....                                   | 77 |
| 4.2. - Production de la neuraminidase en fonction<br>de l'origine des souches .....  | 78 |
| 5. - Etude de la production d'une association d'enzymes ...  | 80 |
| 5.1. - Etude de la production d'une association<br>d'enzymes chez les vibrions cholériques O1<br>et les vibrions N.A.G. ....           | 80 |
| 5.2. - Production d'une association d'enzymes en<br>fonction de l'origine des souches .....  | 82 |
| 6. - Influence des enzymes sur l'activité de la toxine ...   | 82 |
| 6.1. - Relation entre la production d'enzymes et<br>le pouvoir toxinogène .....  | 82 |
| 6.1.1.- Relation entre la production de cha-<br>cune des enzymes et le pouvoir toxi-<br>nogène .....                                   | 84 |
| 6.1.1.1.- Etude chez les vibrions cholériques<br>O1 et les vibrions N.A.G.....   | 84 |
| 6.1.1.2.- Etude en fonction de l'origine des<br>souches .....  | 84 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.2.- Etude de l'influence du temps<br>d'incubation et des solutions<br>tampon sur la production et le<br>titre de la mucinase ..... | 68 |
| 2.2. - Production de la mucinase par les vibrions<br>cholériques O1 et les vibrions N.A.G. ....  | 70 |
| 2.3. - Production de la mucinase en fonction de<br>l'origine des souches .....   | 71 |
| 3. - Etude de la production de la lécithinase .....  | 73 |
| 3.1. - Etude de l'influence des milieux de culture<br>sur la production de lécithinase .....   | 73 |
| 3.2. - Production de la lécithinase par les vibrions<br>cholériques O1 et les vibrions N.A.G. ....                                     | 73 |
| 3.3. - Production de la lécithinase en fonction de<br>l'origine des souches .....  | 75 |
| 4. - Etude de la production de neuraminidase .....   | 77 |
| 4.1. - Production de la neuraminidase par les vi-<br>brions cholériques O1 et les vibrions N.A.G....                                   | 77 |
| 4.2. - Production de la neuraminidase en fonction<br>de l'origine des souches .....  | 78 |
| 5. - Etude de la production d'une association d'enzymes ...  | 80 |
| 5.1. - Etude de la production d'une association<br>d'enzymes chez les vibrions cholériques O1<br>et les vibrions N.A.G. ....           | 80 |
| 5.2. - Production d'une association d'enzymes en<br>fonction de l'origine des souches .....  | 82 |
| 6. - Influence des enzymes sur l'activité de la toxine ...   | 82 |
| 6.1. - Relation entre la production d'enzymes et<br>le pouvoir toxinogène .....  | 82 |
| 6.1.1.- Relation entre la production de cha-<br>cune des enzymes et le pouvoir toxi-<br>nogène .....                                   | 84 |
| 6.1.1.1.- Etude chez les vibrions cholériques<br>O1 et les vibrions N.A.G.....   | 84 |
| 6.1.1.2.- Etude en fonction de l'origine des<br>souches .....  | 84 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.1.2. - Relation entre la production d'une association d'enzymes et le pouvoir toxino-gène .....                               | 87  |
| 6.1.2.1.- Etude chez les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G.....   | 87  |
| 6.1.2.2.- Etude en fonction de l'origine des souches .....  | 87  |
| 6.2.- Influence de l'inhibition de chacune des enzymes sur l'activité de la toxine .....  | 89  |
| <br>CHAPITRE IV : Discussion .....  | 94  |
| 1. - Etude des techniques et des milieux de culture ....  | 95  |
| 1.1. - Etude des milieux de culture et des techniques utilisés pour la mise en évidence de la toxine .....                      | 95  |
| 1.1.1.- Etude des milieux de culture .....  | 95  |
| 1.1.2.- Etude des techniques .....  | 96  |
| 1.2. - Etude des milieux de culture et techniques utilisés pour l'étude des enzymes .....                                       | 98  |
| 1.2.1.- Milieux et techniques utilisés pour l'étude de la mucinase .....  | 98  |
| 1.2.2.- Milieux et techniques utilisés pour l'étude de la lécithinase .....   | 99  |
| 2. - Etude comparative de la production de la toxine et des enzymes par les vibrions cholériques O1 et les vibrions N.A.G. .... | 100 |
| 2.1. - Production de la toxine .....  | 100 |
| 2.2. - Production des enzymes .....   | 104 |
| 2.2.1.- Production de chacune des enzymes ..  | 104 |
| 2.2.2.- Production d'une association d'enzymes .....  | 106 |
| 3. - Etude comparative de la production de la toxine et des enzymes en fonction de l'origine des souches ..                     | 107 |
| 3.1. - Production de la toxine .....  | 108 |
| 3.2. - Production des enzymes .....   | 110 |
| 3.3.1.- Production de chacune des enzymes ..  | 110 |

3.2.2. - Production d'une association  
d'enzymes ..... 114

4. - Influence des enzymes sur l'activité de la toxine ... 115

CONCLUSION ..... 118 X

BIBLIOGRAPHIE ..... 124

Tableau : étude chez les virusés cholériques O1 ..... 24

Tableau : influence des milieux de culture sur la production de  
toxine : étude chez les virusés F.A.S. .... 26

Tableau : étude comparative des techniques de dosage de l'enzyme  
toxine : chez l'ensemble des virusés cholériques ..... 27

Tableau : étude de la production de la toxine par les virusés  
cholériques O1 ..... 28

Tableau : étude de la production de la toxine par les virusés  
cholériques O1 ..... 29

Tableau : production de la toxine par les souches isolées de sujets  
hospitalisés : étude sur l'ensemble des virusés ..... 34

Tableau : production de la toxine par les souches isolées de sujets  
hospitalisés : étude chez les V.C. O1 et les F. F.A.S. .... 35

Tableau : production de la toxine par les souches isolées de sujets  
hospitalisés : étude sur l'ensemble des virusés ..... 36

Tableau : production de la toxine par les souches isolées de sujets  
hospitalisés : étude chez les virusés cholériques O1 et  
les virusés F.A.S. .... 37

Tableau : étude comparative des milieux de culture ..... 38

Tableau : influence de temps d'incubation et de pH sur la production  
de la toxine et le titre de la toxine ..... 39

Tableau : étude quantitative et qualitative de la production de la  
toxine par les virusés cholériques O1 et les virusés  
F.A.S. .... 40

Tableau : production de la toxine par les virusés de  
l'origine des virusés ..... 41

Tableau : influence des milieux de culture sur la production de  
toxine ..... 42