50.376
1965
18

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

50376
1965
18

MEMOIRE PRESENTE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
POUR L'OBTENTION
DU TITRE DE DOCTEUR-ES-SCIENCES

par Mr Jean GUILLAUME

PREMIER MEMOIRE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE QUELQUES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES : MODE D'ACTION ET MECANISME DE LA RESISTANCE DES BACTERIES

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Présenté le 27 Mars 1965 devant la commission d'examen

Président : M. M. DURCHON

Examinateurs : MM. J. MONTREUIL, G. VIVIER et Ch. GERNEZ-RIEUX

TABLE DES MATIERES

Préface 1

Chapître I - Action du glycocolle et des acides aminés de la série D sur E. coli - Sélection de mutants muqueux et étude de leur résistance.

Introduction 5

Constituants de la surface des bactéries 7

Cellules anormales sphériques 14

I - Mécanismes biochimiques de la formation des sphéroplastes 18

Synthèse de la paroi 18

Mécanisme de la formation des sphéroplastes . . . 22

II - Etude biologique et caractères culturaux des sphéroplastes induits par les acides aminés 26

Techniques 28

Recherche des substances inductrices 31

Etude de la transformation en sphéroplastes 33

III - Obtention de mutants synthétisant une substance muqueuse 44

Réversion après subcultures au sein de la gélose . 45

Culture en surface 47

Transfert génétique du caractère muqueux 48

Discussion 50

Nomenclature et entretien des mutants M 51

IV - Etude de la synthèse de la substance muqueuse . . . 54

Conditions de formation du mucus par culture sur milieu solide 54

Etude chimique de la substance muqueuse 55

Etude quantitative de la synthèse du polysaccharide par culture en milieu liquide 59

Facteurs influençant la synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes 62

Etude de l'aptitude des cellules à synthétiser le polysaccharide 66

Discussion 71

V - Résistance des mutants muqueux à l'agent inducteur 73

Aptitude à cultiver sous forme de sphéroplastes . . 74

Résistance à l'agent inducteur 78

Discussion 80

Chapître II - Action des histones et d'autres composés basiques sur les bactéries à Gram négatif

Introduction 84

Pouvoir bactéricide 85

Fixation sur les bactéries et pouvoir agglutinant . . 85

Inhibiteurs de l'action bactéricide 86

Mode de l'action antibactérienne 87

Techniques . . . . . .

I - Activité bactéricide - Fixation des histones sur E. coli - facteurs inhibiteurs 93

Concentrations bactéricides 93

Fixation sur les bactéries 94

Facteurs physiques influençant l'action des histones 95

Facteurs chimiques 96

II - Modification de la perméabilité cellulaire et troubles du métabolisme

Etude de la perméabilité cellulaire 100

Techniques 100

Perméabilité aux substances marquées au ^{32}P . . 102

" " " ^{35}S . . 103

" " " ^{14}C . . 104

Discussion 104

Etude du métabolisme 105

III - Essai d'étude du processus intime de l'action bactéricide des histones 109

Influence des histones sur l'activité galactosidasique 110

Comparaison de l'activité bactéricide des histones avec leur pouvoir de floculer les protéines 112

Influence de la température 114

Etude en microscopie électronique 117

IV - Discussion sur le mode d'action des histones 122

V - Comparaison de l'action des histones avec celle d'autres substances basiques antibactériennes 126

Peptides basiques d'origine animale 126

Molécules basiques actives sur la membrane . . . 127

Substances basiques étudiées 130

Résultats 131

Discussion 134

Chapître III - Actions de la chlortétracycline et de la demethylchlortetracycline sur Proteus mirabilis. Etude de la résistance

Introduction 137

Techniques 139

I - Preuves de l'existence d'un cycle tricarboxylique chez P. mirabilis 144

Expériences préliminaires 145

Etude des produits de dégradation 147

Voies de dégradation du glucose 149

II - Inhibition de l'oxydation du glucose par la chlortetracycline 152

Expériences préliminaires 152

Produits de dégradation du glucose en présence d'auréomycine 155

Produits de dégradation du glucose en présence de fluoracétate 157

Discussion 158

III - Comparaison du mode d'action de la chlortetracycline et de la demethylchlortetracine 159

IV - Etude du métabolisme de souches de P. mirabilis résistantes à la chlortetracycline. 162

Souches résistantes obtenues sur milieu complexe 163

Souches résistantes obtenues sur milieux synthétiques 168

Discussion 175

Discussion et conclusions 179

Bibliographie 187

PREFACE

Depuis son origine, un des buts de la microbiologie a été la recherche de composés chimiques capables de détruire électivement les microorganismes. La liste des agents bactériostatiques ou bactéricides s'allonge chaque jour, et leur utilisation pratique est considérable, en thérapeutique, comme dans l'industrie.

Il est d'usage de classer les substances antibactériennes en trois groupes : d'une part les antiseptiques ; ce sont des composés de structure chimique relativement simple, obtenus par synthèse ; leur pouvoir toxique n'est pas spécifique de la cellule bactérienne et leur mode d'action est aisément mis en évidence ; ils peuvent détruire les constituants protidiques (oxydants), dissocier les enveloppes cellulaires (phénols, détergents) ou bloquer certains enzymes (métaux lourds). D'autre part les analogues structuraux ; ils agissent soit en inhibant par compétition des systèmes enzymatiques (sulfamides, azasérine), soit en étant incorporés au cours de la biosynthèse des protéines (fluorophénylalanine) ou des acides nucléiques (azaguanine, bromouracile) ; leur activité résulte directement de leur formule stéréochimique. Enfin les antibiotiques ; ce sont, selon la définition de WAKSMAN, des antiseptiques élaborés par les microorganismes, les algues, les végétaux supérieurs ou même les tissus animaux. En fonction de leur application majeure comme agents thérapeutiques,

./.

il est d'usage d'employer le terme antibiotique dans un sens plus restrictif : pour être utilisable en chimiothérapie, un antibiotique, outre ses propriétés antiseptiques, doit être stable en présence des produits biologiques, diffuser convenablement dans l'organisme et se montrer nettement moins toxique pour la cellule animale que pour la cellule bactérienne. Les molécules d'antibiotique sont souvent complexes et la connaissance de leur structure ne peut généralement apporter aucune explication à leur activité antibactérienne ; le mécanisme de leur action n'a pu être abordé que par des études biologiques et biochimiques de la bactérie ou de fractions cellulaires mises en contact avec la substance antimicrobienne ; il est parfaitement déterminé pour ceux d'entre eux qui se comportent comme des analogues structuraux (cyclosérine, puromycine) ; pour d'autres, la réaction inhibée ou la structure cellulaire lésée est connue, mais le mécanisme intime de leur activité n'est pas élucidé (pénicilline, streptomycine, chloramphénicol) ; enfin, pour la plupart, la nature de leur pouvoir toxique reste du domaine de l'hypothèse. L'activité considérable des antibiotiques est limitée par la sélection rapide dans une population bactérienne, de mutants moins sensibles à leur action ; la cause de la résistance est connue seulement dans le cas des germes qui détruisent l'agent antimicrobien.

Le sujet de ce travail est l'étude de quelques substances antibactériennes agissant au niveau des structures externes de la cellule ; celle-ci est entourée d'une paroi protectrice rigide dont la synthèse est inhibée par les acides aminés de la série non naturelle comme par la

./.

pénicilline ; la membrane cytoplasmique sous-jacente est le siège des phénomènes de perméabilité ; elle possède une fonction analogue à celle des mitochondries de la cellule animale, fonction qui lui est propre ou qui provient des systèmes enzymatiques lui restant associés lors de son isolement ; c'est à son niveau qu'agissent, d'une part, les peptides basiques en provoquant des troubles de la perméabilité, d'autre part, la chlortétracycline en bloquant le catabolisme aérobie du glucose.

Nos recherches ont porté sur le mode d'action des substances antibactériennes, sa comparaison avec celui d'autres antibiotiques d'activité semblable et sur la détermination du mécanisme de la résistance des mutants sélectionnés par ces composés.

L'exposé de nos travaux comprend trois chapitres :

Dans le premier, nous décrivons nos recherches concernant les substances bloquant la synthèse de la paroi et provoquant la lyse cellulaire. Le mode d'action de certains d'entre eux comme la pénicilline ou la D cycloserine est bien établi ; cependant la mise en évidence et l'étude des propriétés lytiques des acides aminés de la série non naturelle nous ont conduit à envisager un mécanisme nouveau de résistance des bactéries aux antibiotiques agissant au niveau de la paroi.

Un second chapitre est consacré aux composés de nature polypeptidique, qui dégradent la membrane cytoplasmique. Le mécanisme d'action des histones et des protamines, protéines basiques d'origine animale, est semblable à celui de la polymyxine et à celui d'autres

./.

produits basiques de synthèse. Ces résultats permettent de discuter des relations existant, dans ce groupe d'agents antimicrobiens, entre structure chimique et activité biologique.

Enfin, nous avons étudié dans un dernier chapitre le mode d'action des tétracyclines ; après avoir déterminé à quel stade la chlortétracycline et la déméthylchlortétracycline inhibent la dégradation du glucose, nous avons montré comment des mutants résistants pouvaient survivre en évitant la voie de catabolisme bloquée.

Nous exprimons notre gratitude à Messieurs les Professeurs GERNEZ-RIEUX, BOULANGER, OSTEUX, BISERTE et MONTREUIL pour l'aide qu'ils nous ont apporté à la réalisation de ce travail. Nous remercions Messieurs DERIEUX, MARTIN et WATTEL pour leur collaboration à des recherches concernant quelques aspects particuliers de cette étude et qui ont fait l'objet de leurs thèses de Doctorat en Pharmacie et en Médecine. Les moyens matériels d'effectuer ce travail nous ont été donnés par le Centre National de la Recherche Scientifique et l'Institut Pasteur de Lille ; nous les en remercions vivement.

./.

CHAPITRE I

ACTION LYTIQUE DES ACIDES AMINES SUR ESCHERICHIA COLI - ETUDE BIOLOGIQUE DES SPHEROPLASTES - SELECTION DE MUTANTS MUQUEUX ET RESISTANCE AUX AGENTS INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DE LA PAROI.

INTRODUCTION

L'action inhibitrice de la pénicilline sur la synthèse de la paroi bactérienne a été parfaitement démontrée ces dernières années : la présence de l'antibiotique provoque la rupture de la paroi des cellules en phase de croissance, ayant pour conséquence, en milieu hypertonique, la sortie du protoplaste qui prend une forme sphérique, appelée sphéroplaste. Le glycocolle, à concentration élevée, présentant les mêmes propriétés que la pénicilline, nous avons essayé l'action d'autres acides aminés et montré que tous ceux de la série non naturelle bloquaient la synthèse de la paroi. Par cultures successives sous forme de sphéroplastes obtenus par l'action soit de la pénicilline, soit des acides aminés, il a été observé la sélection de mutants s'entourant d'une substance polysaccharidique de consistance muqueuse ; l'étude de sa synthèse a permis de déterminer qu'il s'agissait d'un mécanisme de résistance du microorganisme vis-à-vis des agents bactéricides agissant au niveau de la paroi.

En guise d'introduction à ce chapître et afin d'en alléger l'exposé, nous avons fait une brève description, d'une part, des différents constituants de la surface des bactéries, d'autre part, des formes sphériques bactériennes dépourvues d'enveloppe rigide.

Nous avons ensuite présenté notre travail selon le plan suivant :

./.

I - Etude bibliographique du mécanisme de la formation des sphéroplastes.

II - Induction des sphéroplastes d'Escherichia coli par les acides aminés.

III - Obtention de mutants synthétisant une substance muqueuse.

IV - Etude de la synthèse de la substance muqueuse.

V - Résistance des mutants muqueux à l'agent inducteur.

o o

o

CONSTITUANTS DE LA SURFACE DES BACTERIES

1) Composants extracellulaires de la surface des bactéries

Il existe une grande variété de substances recouvrant la surface de la paroi bactérienne ; leur présence est souvent inconstante et leur formation est sous la dépendance des conditions de croissance du germe. Individualité anatomique, la capsule est, selon la définition de TOMCSIK (170) une couche de consistance gélatino-muqueuse, entourant la paroi et présentant une surface externe libre et définie ; elle peut être réduite à un film appelé microcapsule par WILKINSON (182), décelable seulement par ses propriétés antigéniques, mais nettement différenciée de la paroi, car elle peut être enlevée sans que l'intégrité de la cellule en soit affectée. La capsule protège la bactérie contre la phagocytose, contre la pénétration du bactériophage et augmente sa résistance aux agents physiques; sa spécificité immunochimique (antigène K du pneumocoque) est utilisée pour la caractérisation des types bactériens. La cellule peut aussi secréter des substances visqueuses qui s'accumulent à sa surface, lorsqu'elle est cultivée sur un milieu solide ; celles-ci ne présentent aucune structure définie et sont facilement éliminées par lavage.

La nature chimique des différents produits extra-cellulaires est essentiellement polyosidique. Parmi les germes prenant la coloration de Gram, seuls certains Bacillus possèdent une capsule composée

./.

d'un peptide, polymère des acides D ou L glutamique (THORNE (168), BRUCKNER (16), BOVARNICK (12)). La capsule des pneumocoques est constituée de polyosides pouvant contenir du glucose, du galactose, du rhamnose, de l'acide glycuronique et des osamines (HEIDELBERGER (62) ainsi celle du type III possède une séquence de base formée de glycurono-4-β- glucose. Les streptocoques des groupes A et C ont leur capsule composée d'acide hyaluronique (LANCEFIELD (90), KASS (79)). Les bactéries à coloration de Gram négative sont recouvertes par une micro-capsule (WILKINSON (182)) constituée de protéines, polyosides et lipides, dont on ne connaît pas les liaisons exactes avec la paroi sous jacente ; mais la capsule, elle-même, est de nature semblable à celle des germes à Gram positif. Celle d'Aerobacter aérogenes est composée de glucose, fucose et d'un acide uronique (WILKINSON (181), DUDMAN (34)). Certains mutants d'E. coli synthétisent une substance muqueuse, formée de galactose, de fucose et d'un acide uronique (BEISER (6)).

2) La paroi bactérienne

Les bactéries doivent leur forme à l'existence d'une enveloppe rigide externe, dénommée paroi ; son rôle est de protéger les organes actifs de la cellule et elle est considérée généralement comme biochimiquement inerte.

Son étude a été rendue possible, grâce aux technique d'isolement par désintégration de la cellule et à l'utilisation d'enzymes comme le lysozyme ou les enzymes phagiques qui hydrolysent spécifiqueme

certains de ses constituants ; enfin la détermination du mode d'action des inhibiteurs de sa synthèse, en particulier celui de la pénicilline ont permis d'entrevoir le mécanisme de sa formation.

Il est maintenant bien établi, à la suite des travaux de SALTON (140), que les bactéries prenant la coloration de Gram possèdent une paroi de structure relativement simple et très pauvre en lipides, tandis que celle des bactéries qui ne conservent pas la coloration de Gram est complexe et contient environ 20 p. cent de substances lipidiques. Cependant, il existe une structure de base commune aux parois des deux types de bactéries.

Structure de base de la paroi

Par hydrolyse ménagée des parois des bactéries prenant le Gram, on obtient un certain nombre de polymères dont les principaux sont : des mucopeptides, des polysaccharides et des dérivés des acides téichoïques (polymères du ribitol phosphate ou du glycérophosphate). Le terme "mucopeptide" a été proposé par MANDELSTAM et ROGERS (103) pour décrire le complexe osamine-acides aminés que l'on retrouve régulièrement dans toutes les parois bactériennes. Il ne fait aucun doute que le mucopeptide dont les composants sont liés par covalence, forme la structure élémentaire rigide, à laquelle se trouvent souvent associés, par des liaisons labiles, des polysaccharides (extraits par l'acide picrique) ou les acides téichoïques (séparés par l'acide trichloracétique à froid) ; après solubilisation de ces composés, le mucopeptide reste sous forme de résidu insoluble gardant toujours l'apparence de la paroi originelle. Les

./.

substances formant les mucopeptides provenant des diverses espèces bactériennes sont remarquablement peu variées : on y trouve l'acetyl glucosamine, l'acide muramique (éther lactique de la N acetyl-glucosamine), la D et la L alanine, l'acide D glutamique et soit la L lysine, soit les acides D D ou L L diaminopiméliques découverts par WORK (184). Leur enchainement a été étudié soit par hydrolyse du mucopeptide lui-même, soit par identification d'intermédiaires de la synthèse accumulés sous l'action d'inhibiteurs ; c'est ainsi que STROMINGER (159) a montré la formation par Staphylococcus aureus sous l'influence de la pénicilline d'une séquence correspondant à N-acétyl-glucosaminyl → lactyl - L - Ala - D-Glu - L-Lys - D-Ala - D-Ala (***).

Par action du lysozyme sur la paroi de Micrococcus lyosdeikticus, SALTON et GHUYSEN (141) ont isolé, un disaccharide, le β-N-acétyl-glucosaminido-1,6-N-acétylmuramique. Les liaisons rencontrées le plus souvent entre les deux oses sont β-1,6 ; α-1,6 ; β-1,4 ; α-1,4 ; la fonction acide de l'acide muramique peut être libre ou combinée à un peptide.

Chez Staphylococcus aureus, après élimination du ribitol phosphate de la paroi, celle-ci est traitée par le lysozyme ; les produits obtenus sont alors hydrolysés par la β -N-acétyl-glucosaminidase qui enlève pratiquement toute l'acétylglucosamine, et conduit à des molécules relativement importantes dans lesquelles on peut identifier outre les composants du mucopeptide, des polyglycocolles. Mais les produits de

./.

(***) - Ala : alanine ; Glu : acide glutamique ; Lys : lysine.

réactions avec le 2-4 dinitro fluorobenzène indiquent que les deux groupes aminés de la lysine sont bloqués, ainsi que presque tous les groupements aminés du glycocolle, de l'alanine ou de l'acide glutamique. Ceci permet de proposer le schéma reproduit sur la figure 1 pour la structure de base de la paroi de Staphylococcus aureus (STROMINGER (165)).

Chez les bactéries à Gram négatif, la structure de base a pu être isolée sous forme relativement pure et les principaux produits d'hydrolyse sont les suivants : N-acetyl-glucosamine, acide N-acetyl-muramique, acide glutamique, acide α, ε diaminopimelique et alanine (PRIMOSIGH (130)).

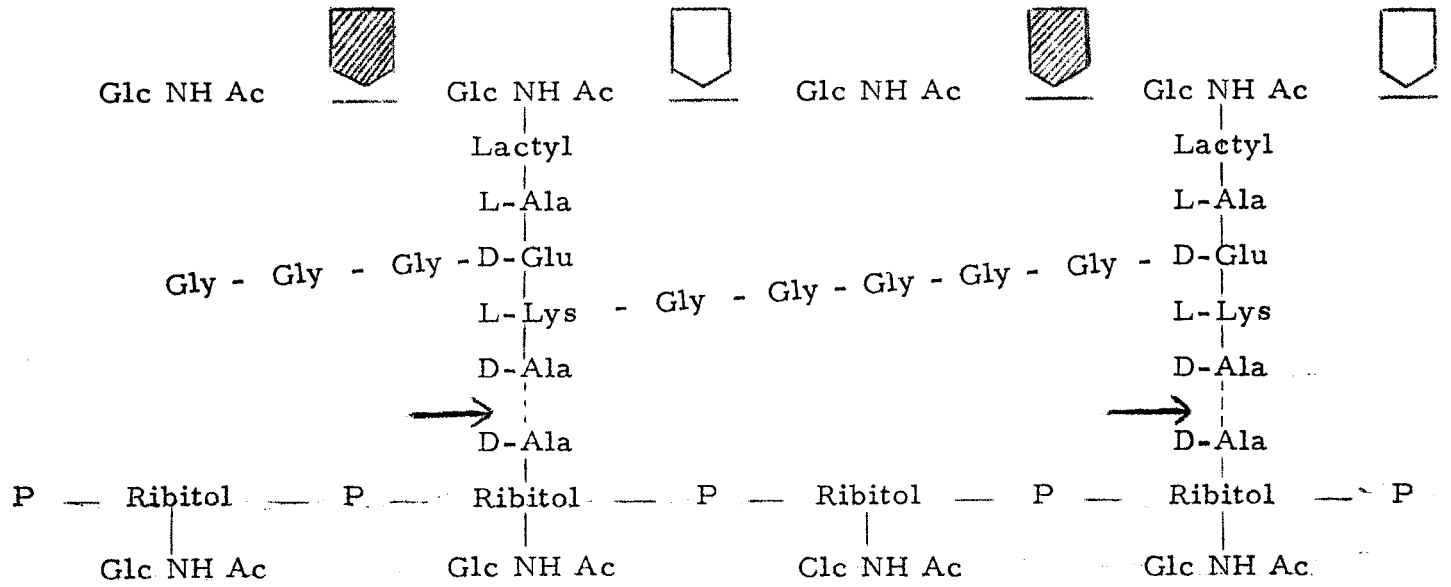
Quoique les recherches chez ce type de bactéries soient moins avancées, on constate une homogénéité étonnante dans la composition de la structure rigide de toutes les cellules bactériennes étudiées.

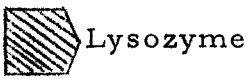
Autres composants de la paroi

Chez les bactéries prenant le Gram, les composants de la paroi, autres que la structure de base, sont relativement simples. Chez Staphylococcus aureus, on rencontre seulement du glycocolle et du ribitol phosphate (fig. 1), chez Micrococcus lysodeikticus, du glycocolle et du glucose, chez les Corynebactéries, des polysaccharides complexes, enfin, chez les Streptocoques, on trouve à la fois des polysaccharides et des protéines.

Par contre, pour les bactéries à Gram négatif, la structure de base ne représente qu'une faible proportion du poids de la

./.




Lysozyme

Acide

β -N-Acetyl glucosaminidase

Glc NH Ac : N-acetyl glucosamine
Ala : alanine
Glu : acide glutamique
Lys : lysine
Gly : glycocolle

Figure I

paroi (environ 20 p. cent). Les travaux de WEIDEL (176) permettent de se représenter l'arrangement des différents constituants de la paroi d'Escherichia coli (fig. 2) ; celle-ci est composée de trois couches : la plus externe est de nature lipoprotidique, l'intermédiaire lipopolysaccharidique, enfin la couche interne est le support de la rigidité. Cette dernière n'est pas homogène : elle est constituée de petites sphères formées de protéines banales, reliées entre elles par un réseau dense correspondant à la structure de base rigide ; par action du lysozyme, les liaisons sont rompues, les composants du mucopeptide sont mis en solution et les sphères libérées. La séparation de ces différentes enveloppes est réalisée par action du phénol chaud sur les parois ; celui-ci dissout les lipoprotéines, tandis que les lipopolysaccharides et les mucopeptides restent dans la phase aqueuse. La couche rigide sédimente par centrifugation à faible vitesse et peut être ainsi séparée de la couche lipopolysaccharidique. Cette dernière est intéressante car elle constitue l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Son pouvoir toxique est dû à sa fraction lipidique, qui peut être isolée par hydrolyse acide ; on y rencontre des polymères de phosphate de glucosamine dans lesquels les groupements aminés et hydroxyl libres sont combinés aux acides gras. Les composants polysaccharidiques de cette couche ont été particulièrement étudiés car ils sont responsables des propriétés antigéniques des Entérobactéries. Par hydrolyse, on peut identifier jusqu'à sept oses différents, dont on connaît mal le mode de liaison, cependant l'étude quantitative de la composition en sucres a permis, par exemple, de faire une classification des différentes espèces de Salmonella coïncidant avec la classification

./.

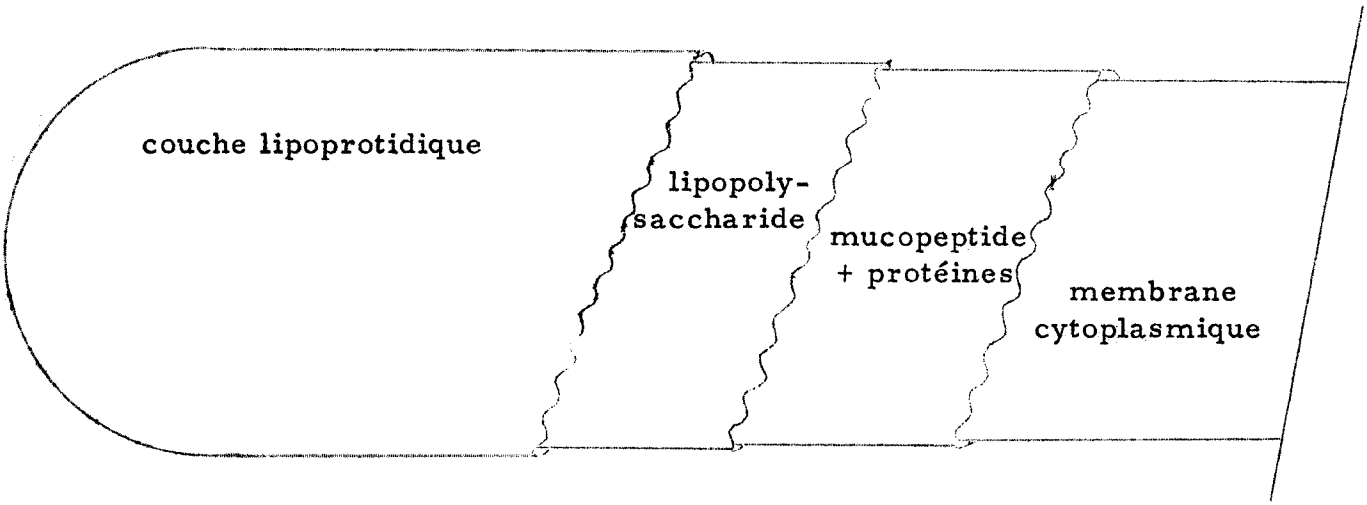

couche lipoprotidique
lipopoly-
saccharide
mucopeptide
+ protéines
membrane
cytoplasmique

Figure 2

sérologique de KAUFFMANN-WHITE (81). Cinq des huit isomères d'une nouvelle classe de sucres, les 3,6-didesoxyhexoses ont été découverts dans les lipopolysaccharides des souches "Smoth" (dont les colonies sont lisses), et on y rencontre de plus en abondance les 6-desoxyhexoses ; il semblerait que la spécificité des réactions immunologiques serait due à la présence des didesoxyhexoses en fin de chaine (WESTPHAL (21)).

CELLULES ANORMALES SPHERIQUES BACTERIENNES

La formation d'organismes sphériques à partir des bactéries est un fait connu de longue date ; dès 1900, FISCHER (38) avait observé, dans certaines conditions physiologiques, la rupture de la paroi bactérienne et la sortie, dans le milieu extérieur, du protoplaste sous forme de sphère. Depuis, de nombreux travaux ont été consacrés à ces formes anormales nommées forme "L", protoplastes ou sphéroplastes, et les procédés d'obtention se sont multipliés ; mais dans tous les cas, ces éléments globuleux sont le résultat d'une lésion au niveau de la structure rigide de la paroi. Celle-ci ne peut plus contraindre la cellule à garder sa morphologie originelle ; la pression interne considérable du protoplaste, maintenu alors dans des enveloppes plastiques, lui fait prendre une forme sphérique et le rend très fragile en milieu isotonique.

Devant une certaine confusion des termes employés pour nommer les différents éléments globuleux bactériens, il nous a paru nécessaire d'en préciser leur définition.

./.

Les protoplastes définis par BRENNER et coll. (15) correspondent aux organismes sphériques totalement dépourvus de leur paroi. L'absence de cette enveloppe doit être prouvée par la disparition des réactions données par les antigènes spécifiques et les composés particuliers de la paroi et par celle des sites d'absorption du bactériophage. Seule, l'action d'enzymes, comme le lysozyme, sur certaines espèces bactériennes à Gram positif, permet d'obtenir des protoplastes conformes à cette définition. Le lysozyme hydrolyse selon BRUMFITT (17) la liaison β -1-4 de l'acide muramique avec l'acetylglucosamine (cf. structure de la paroi) amenant la dégradation de la paroi. La formation de protoplastes par ce procédé fut mise en évidence en même temps chez Bacillus megaterium par TOMCSIK (171) et WEIBULL (174). Le phénomène s'est révélé constant chez quelques espèces, toutes prenant la coloration de Gram : Micrococcus lysodeikticus, Sarcina lutea, Bacillus subtilis ; par contre, l'obtention de formes sphériques à partir de bactéries à Gram négatif n'est réalisée au moyen du lysozyme que grâce à des artifices techniques mis au point par REPASKE (133) ; il ne s'agit pas, dans ce cas, de protoplastes vrais car le lysozyme laisse intactes les structures particulières

./.

de la paroi de ces germes (lipopolysaccharides - protéines). D'autres enzymes induisent, comme le lysozyme, des protoplastes : ce sont soit des enzymes lytiques produits par la bactérie elle-même (STRANGE (157) (158) DARK (26)), soit encore des enzymes phagiques étudiées par Mc QUILLEN (100), MURPHY (113), CAREY (19) et JACOB (74). Les protoplastes conservés en milieu hypertonique présentent un métabolisme actif mais sont considérés par la majorité des auteurs comme incapables de se diviser.

Sous le terme de sphéroplaste, sont englobées toutes les formes sphériques bactériennes dont l'absence totale de la paroi n'a pu être prouvée ; après élimination de l'agent inducteur, les sphéroplastes reprennent leur morphologie normale. On peut classer parmi les sphéroplastes les éléments formés par l'action du lysozyme sur les bactéries ne prenant pas le Gram, mais les plus intéressants sont ceux résultant d'une déviation du métabolisme de la paroi. Les études de LIEBERMEISTER (98), LEDERBERG (97) et HAHN (60) ont montré le processus de l'induction des sphéroplastes par la pénicilline chez Proteus vulgaris et Escherichia coli. Ces expériences ont pu être reproduites avec la plupart des bactéries à Gram négatif et au moyen de nouvelles substances antibiotiques comme la bacitracine, la D cyclosérine et la novobiocine, du glycocolle ou des acides aminés de la série D. Le mode d'action de ces divers agents inducteurs lié à l'étude de la synthèse de la structure

./.

rigide de la paroi, sera examiné en détail par ailleurs.

Les "Formes L" ont été découvertes par Madame KLIENBERGER-NOBEL (82) qui observa au milieu de colonies normales de Streptobacillus moniliformis des colonies composées d'éléments globuleux ; l'auteur les nomma "formes L" en hommage au Lister Institute auquel elle appartenait et en donne la définition suivante (83) : il s'agit d'une culture stable d'éléments protoplasmiques sans morphologie définie, ne possédant pas la forme rigide des bactéries, ne reversant pas vers cette forme, pouvant être cultivée indéfiniment et présentant des colonies caractéristiques sur milieu solide, semblables quelle que soit l'espèce bactérienne dont la culture "L" est dérivée. Les caractères de ces cellules bactériennes sont identiques à celles de bactéries pathogènes pour l'animal, sans morphologie définie, appelées "pleuropneumonia - like organisms" (PPLO).

Cependant, par cultures répétées en présence de pénicilline, des formes "L" ont été obtenues à partir d'espèces bactériennes n'en donnant pas spontanément : (Proteus vulgaris, Salmonella typhi et para typhi B). L'absence de la paroi chez ces formes a été démontrée par KANDLER (78). Leurs propriétés ont fait l'objet de nombreux travaux dont ceux de DIENES (31) et de TULASNE (173).

./.

I - MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA FORMATION DES SPHEROPLASTES

Les sphéroplastes dont l'induction est provoquée par un trouble du métabolisme de la paroi sont obtenus par deux procédés différents : soit par addition à une culture bactérienne de substances interférant avec les réactions de synthèse de la paroi (pénicilline, D cyclosérine, acides aminés), soit par privation de la cellule d'un élément indispensable pour cette synthèse. Chez certaines espèces bactériennes, le bloquage de la chaine de synthèse peut s'accompagner de l'accumulation d'intermédiaires et notre connaissance des réactions conduisant à la structure rigide de la paroi est étroitement liée à celle du mode d'action de ses inhibiteurs. Nous examinerons donc, d'abord, la conception générale de la synthèse de la paroi chez Staphylococcus aureus, établie grâce à l'étude des composés accumulés en présence de certains inducteurs, puis, en nous aidant de ce schéma, nous ferons une description des principaux mécanismes de formation des sphéroplastes.

A) SYNTHESE DE LA PAROI

STROMINGER (159)a observé que dans une culture de S. aureus traitée par la pénicilline s'accumulaient immédiatement

./.

les trois nucléotides suivants :

UDP-Glc NHAc → ac. lactique

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (fig. 3).

La structure la plus complexe (fig. 3) est analogue à celle de l'uridine diphosphoglucose établie par CAPUTTO et LELOIR (18) dans lequel le glucose est remplacé par un sucre substitué. Ces nucléotides uridiniques ont un rôle prédominant comme transporteurs et activateurs de fragments osidiques pour les réactions de synthèse ; le muramyl-peptide pourrait donc être activé de la même manière pour entrer dans une réaction de synthèse de la structure rigide de la paroi, la pénicilline en bloquant cette synthèse provoquerait son accumulation ; la formation immédiate de ces nucléotides semble indiquer qu'ils sont en rapport direct avec le point d'attaque de la cellule par l'antibiotique.

La bacitracine dont le noyau renfermant un soufre est très proche du noyau thiazolidine de la pénicilline (fig. 4) provoque l'accumulation des mêmes nucléotides chez le Staphylocoque (ABRAHAM (1)).

Par contre, la D cyclosérine (CIAK (22)) induit la formation d'un nucléotide différent :

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys

L'absence des deux molécules de D alanine dans le nucléotide s'explique par l'analogie de structure entre la D cyclosérine et la D alanine (fig. 5)

./.

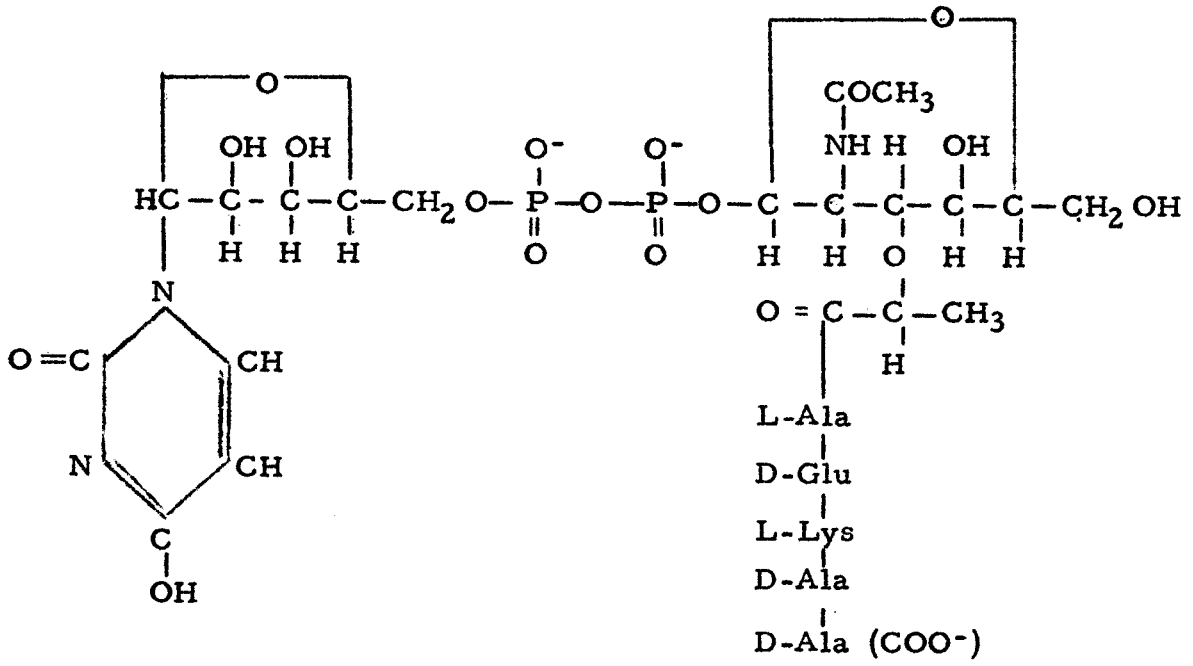
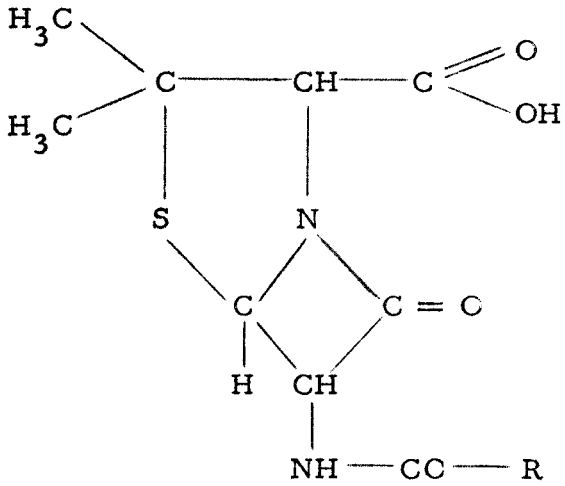


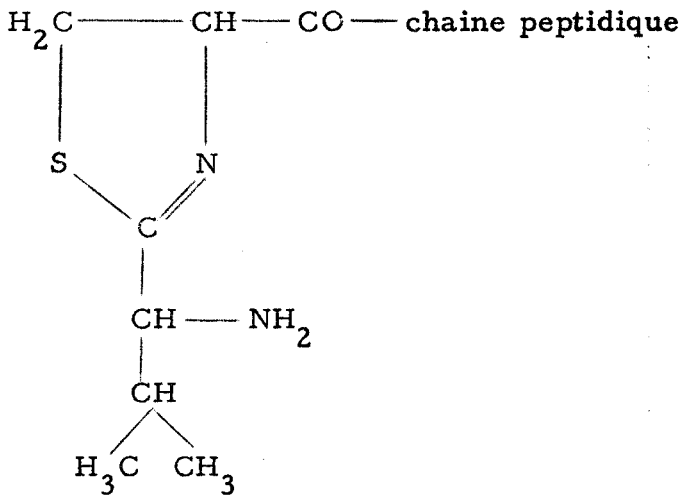
Figure 3

Nucléotide accumulé chez S. aureus sous l'action de la péricilline

(Strominger (159))

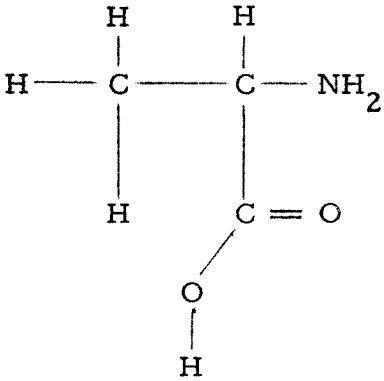


pénicilline

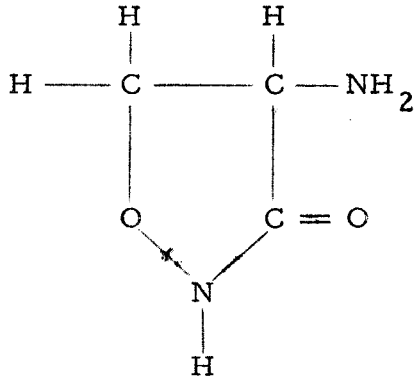


bacitracine

Fig. 4



D-alanine



D-cyclosérine

Fig. 5

en effet, STROMINGER (164) a montré que la D cyclosérine est un antagoniste compétitif à la fois de l'alanine racemase et de la D-alanyl-D-alanine synthétase, elle cause une déficience en D-alanine provoquant l'accumulation de l'intermédiaire ne la contenant pas.

STROMINGER (160) a montré que le violet de gentiane présentait une action semblable à celle des antibiotiques déjà cités ; en sa présence, on constate la formation de deux nucléotides :

UDP-Glc NHAc

UDP-Glc NHAc-acide lactique.

Le manque d'activité de la plupart des échantillons du colorant laisse supposer que l'accumulation est due à une impureté du violet de gentiane.

Enfin, S. aureus est capable de synthétiser sa paroi en milieu synthétique contenant seulement du glucose, de la D L Alanine, de l'acide L-glutamique et de la L-lysine et dans ces conditions, sous l'action de la pénicilline, on observe la formation des nucléotides (STROMINGER et THRENN (163 mais dans ce même milieu, privé de L-lysine, et en absence de pénicilline, on constate l'accumulation d'un nouvel intermédiaire :

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala-D-Glu

La formation de ce nucléotide est due à l'incapacité de la cellule de synthétiser la lysine entrant dans la composition du mucopeptide de la paroi.

La connaissance de la structure des nucléotides

./.

(a) - BERG P. et JOKLIK W. (7)
(b) - STROMINGER J. L. et SMITH M. (162)
(c) - STROMINGER J. L. (160)
(d) - RICHMOND M. et PERKINS H. (134)
(e) - ITO E. et STROMINGER J. L. (70)
(f) - ITO E. et STROMINGER J. L. (71)
(g) - ITO E. et STROMINGER J. L. (69)
(h) - ITO E. et STROMINGER J. L. (72)
(i) - PARK J. et STROMINGER J. L. (126)

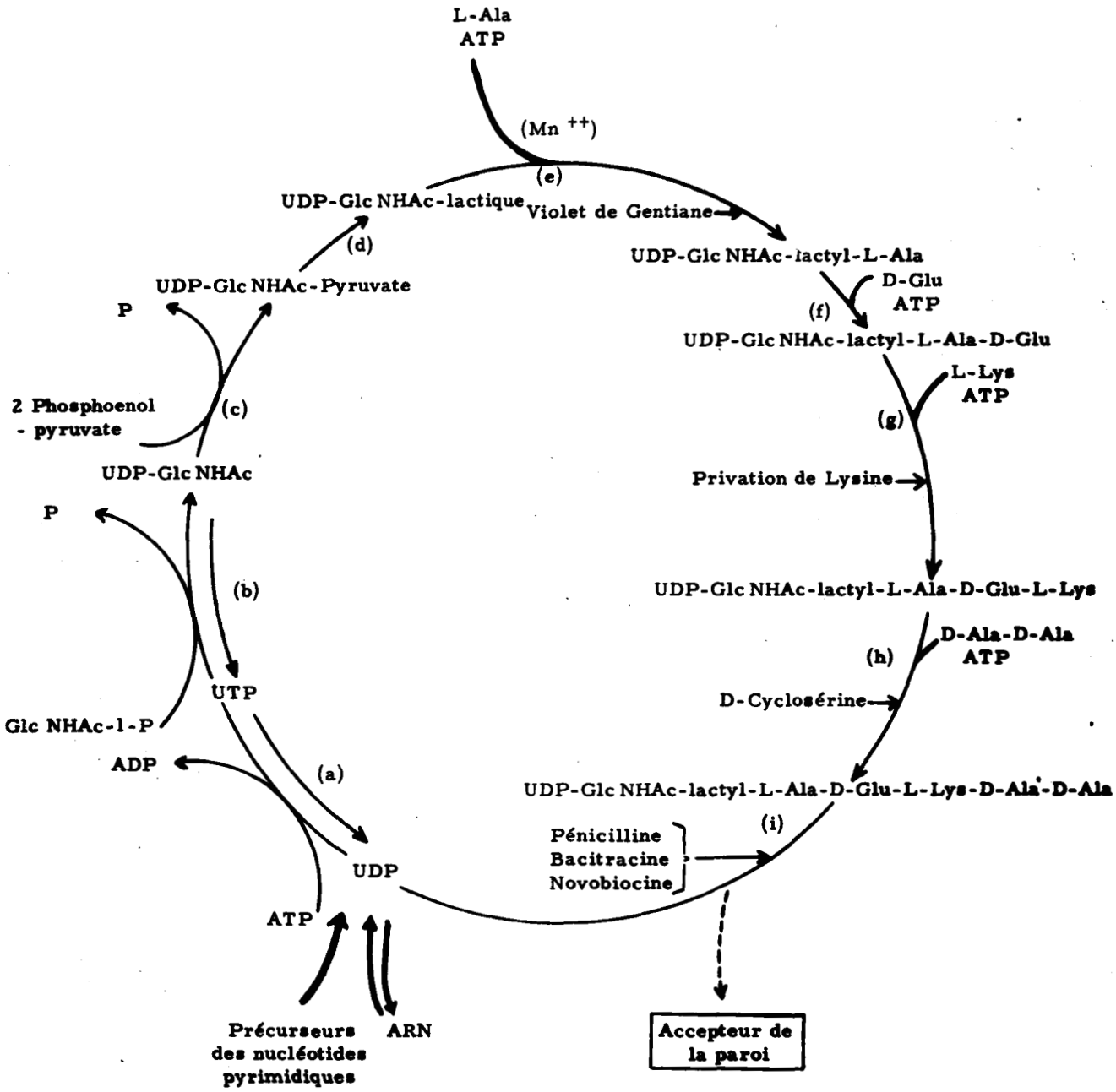


Figure 6 d'après PARK et STROMINGER (165)

B) MECANISME DE LA FORMATION DES SPHEROPLASTES

1) Sphéroplastes obtenus par privation d'un métabolite de la paroi

LEDERBERG (97) a isolé un mutant de la souche d'*Escherichia coli* K 12 exigeant un acide diaminopinelique (DAP). En présence de cet acide aminé le germe se développe normalement, mais s'il est porté dans un milieu contenant tous les éléments indispensables à sa culture, excepté le DAP, il se lyse ; lorsque cette expérience est effectuée en milieu hypertonique (saccharosé à 10 p. cent), on observe au lieu de la lyse, une transformation en sphéroplastes. Cette étude a été reprise par STROMINGER (161), celui-ci constate que le mutant exigeant ainsi que la souche dont il est dérivé, contiennent normalement un nucléotide en assez haute concentration, dont la structure correspond à :

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala-D-Glu-meso DAP-D-Ala-D-Ala. Par culture en absence de DAP, au moment de la lyse du mutant, ce nucléotide disparaît et se trouve remplacé par :

UDP-Glc NHAc → Lactyl-L-Ala-D-Glu.

Il semble donc que le DAP soit l'acide aminé suivant dans la chaine peptidique et que cette accumulation de nucléotide soit superposable à celle observée chez *S. aureus* privé de lysine. SHOCKMAN (151) (152) a constaté un phénomène semblable chez *Streptococcus faecalis* : ce germe se lyse par culture sur milieu contenant les acides aminés indispensables, mais privé de lysine. Par ailleurs, une espèce bacté-

./.

rienne, Lactobacillus bifidus (var. pennsylvanicus) présente naturellement un trouble dans la synthèse de la paroi ; cultivée sur milieux ordinaires, la bactérie présente un aspect ramifié (bifide) ou globuleux. GLICK et coll. (45) ont montré que ce germe prend une forme bacillaire normale seulement en présence de lait humain ou de N-acetyl-D-glucosamine qui est incorporé alors dans l'acide muramique de la paroi (O'BRIEN et coll. (121)).

2) Sphéroplastes induits par des substances inhibitrices de la synthèse de la paroi

a - Analogues structuraux

Le fluorouracileet l'azauracileétudiés respectivement par ROGERS (136) et par TAKAGI (166), induisent des formes anormales chez S. aureus et E. coli et provoquent l'accumulation de nucléotides anormaux dans le milieu.

Nous avons, par ailleurs, décrit le mode d'action de la D cyclosérine qui bloque la synthèse de la paroi en se comportant comme un analogue de la D alanine.

L'action des acides aminés de la série D peut être comparée à celle des analogues structuraux ; LARK et LARK (92), MICHEL et HIJMANS (106) et GUILLAUME, DERIEUX et MARTIN (54) ont décrit la possibilité d'obtenir des sphéroplastes en ajoutant au milieu de culture un acide aminé de la série D respectivement chez Alcaligenes

./.

faecalis, Streptococcus haemolyticus et Escherichia coli. LARK '93) a poursuivi ses recherches en étudiant l'incorporation de la méthionine marquée par le ^{35}S dans la fraction cellulaire insoluble dans le phenol (correspondant au mucopeptide de la paroi et aux polyosides). Il a montré que l'incorporation de l'acide aminé de la série D dans le résidu insoluble augmentait jusqu'au moment de la formation des sphéroplastes ; cette incorporation n'est pas modifiée par addition de chloramphénicol qui a la prop riété de provoquer l'inhibition totale de la synthèse des protéines du protoplaste, sans influencer celle du mucopeptide de la paroi ; par contre, la pénicilline bloque totalement l'introduction de la D méthionine dans la fraction insoluble dans le phénol. Ces arguments permettent de penser que l'acide aminé de la série D prend la place d'un autre acide aminé D ou L, constitutif soit du mucopeptide lui-même, soit des protéines qui lui sont liées.

Contrairement aux acides aminés de la série D, le glycocolle est un inducteur de sphéroplastes connu depuis longtemps (DIENES et ZAMECNIK (32)) mais il n'existe que peu de travaux sur son mode d'action. Seul PARK (127) signale que cet acide aminé provoque l'accumulation de nucléotides chez S. aureus. Nous avons nous-même tenté, sans succès, d'étudier l'incorporation du glycocolle $U^{14}C$ (C.E.A.) dans la paroi d'E. coli ; les mesures précises de radioactivité sont rendues difficiles du fait que l'acide aminé est métabolisé activement et que la concentration inductrice est très élevée (3 p. cent) ; nous n'avons pu, en

./.

aucun cas, mettre en évidence une incorporation nette de glycocolle soit dans un nucléotide, soit dans la paroi elle-même.

b - Inhibiteurs enzymatiques

On a coutume de classer la pénicilline parmi ces inhibiteurs, cependant le mécanisme de l'interférence de l'antibiotique dans le transfert du mucopeptide de l'UDP vers la paroi est inconnu. La grande majorité des auteurs s'accorde pour penser que là se situe le site primaire de l'action de la pénicilline ; cependant, SAUKKONEN (142) a montré que certaines souches de S. aureus accumulaient, sous l'influence de la pénicilline des quantités considérables de cytidine diphospho-ribitol, précurseur présumé du polyribitol phosphate de la paroi. Par ailleurs, TRUCCO et PARDEE (172) estiment que le lieu d'action de la pénicilline est la membrane cytoplasmique ; ceci supposerait une liaison étroite entre membrane et paroi, la synthèse de la seconde se faisant au niveau de la première.

Chez E. coli, l'induction de sphéroplastes par la pénicilline est un fait bien connu depuis les travaux de LEDERBERG (97) mais le mécanisme de leur formation n'a pu être élucidé à cause des difficultés techniques dues à la complexité de la paroi de ce germe ; cependant, si l'on utilise le DAP marqué au ^{14}C comme précurseur de la paroi, on constate que la pénicilline provoque une inhibition intense de son incorporation dans la structure rigide (STROMINGER (185)).

./.

II - ETUDE BIOLOGIQUE ET CARACTERES CULTURAUX DES SPHEROPLASTES D'ESCHERICHIA COLI INDUITS PAR LES ACIDES AMINES

Le mode d'obtention et les propriétés biologiques des protoplastes obtenus par l'action du lysozyme, du phage, de la pénicilline ou d'une déficience métabolique ont été largement étudiés ; par contre, nous n'avons que des renseignements épars sur les formes induites par les acides aminés. GORDON et GORDON (46), les premiers observent des modifications culturales et morphologiques chez les bactéries du genre Vibrio cultivées en présence de glycocolle. MACULA et COWLES (101) signalent le phénomène de lyse provoqué chez E. coli par incubation à 37°C dans un milieu contenant du glycocolle ; le processus de la lyse et l'apparition de la résistance à cette lyse sont étudiés ensuite par GORDON et coll. (47 - 48) et par SALMON (138). DIENES et ZAMECNIK (32) décrivent la formation sous l'influence du glycocolle de colonies L à partir de Salmonella typhi murium et Hemophilus influenzae.

Dans un travail d'ensemble, WELSCH (179) détermine les conditions de formation et les propriétés des sphéroplastes d'E. coli induits au moyen du glycocolle : l'induction est réalisée avec des bactéries en suspensions non proliférantes ou avec des germes en croissance, elle

./.

est favorisée par l'aération ou la présence de bouillon nutritif et défavorablement influencée par diverses substances bactériostatiques ; l'auteur en conclut que les conditions d'activité du glycocolle diffèrent de celles qui permettent la transformation d'E. coli en protoplastes par le lysozyme ou la pénicilline. Les sphéroplastes obtenus se lysent dans l'eau distillée et ils sont relativement stables en solution saccharosée hypertonique. Enfin, il constate que certains acides aminés transforment les cellules d'E. coli aussi bien ou mieux que le glycocolle. JEYNES (76), dans une courte note décrit l'obtention de sphères par cultures sur milieu liquide contenant 3 p. cent de glycocolle ; les bactéries étudiées sont Vibrio cholerae, Salmonella typhi, Salmonella typhi murium et Salmonella paratyphi B ; les propriétés des sphéroplastes sont les suivantes : ils cultivent durant une période prolongée ; la sécrétion de la membrane et la division sont contrôlées par un point granuleux ; la réversion vers la forme bactérienne est constante ; au cours des repiquages successifs, la résistance à l'agent inducteur augmente et la taille des sphères diminue.

Si l'on compare les propriétés des sphéroplastes pénicilline avec celles des sphères obtenues par l'action du glycocolle, on constate certaines similitudes frappantes, mais aussi des différences majeures ; par ailleurs, les descriptions des auteurs ayant étudié ces dernières formes anormales ne concordent pas toujours, il est vrai qu'ils s'adressent à des germes appartenant à des espèces différentes ; enfin, on constate que certains acides aminés peuvent présenter les mêmes propriétés

./.

inductrices que le glycocolle.

Ceci nous a conduit à étudier systématiquement l'induction des sphéroplastes d'E. coli par la pénicilline et les divers acides aminés et à montrer que les acides aminés de la série D se comportaient comme le glycocolle. Après la mise au point d'une technique de repiquage en série des sphéroplastes, l'étude des caractères culturaux nous a amené à penser que certaines cellules capables de se reproduire dans ces conditions, étaient des mutants produisant une substance muqueuse de nature polyosidique. L'existence de ces mutants permet d'envisager un mécanisme très particulier de la résistance cellulaire aux substances antibactériennes agissant au niveau de la paroi.

A) TECHNIQUES UTILISEES

Souches bactériennes

Nous avons utilisé les souches d'E. coli 71.062, 36 Burnet et différents mutants de la souche K 12 (Hfr C et 2.000 x 17 K)

Milieux de culture

Les milieux suivants ont été employés :

1°) Milieu B P G

Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate dipotassique.....	1 g
Extrait de Levure Difco.....	3 g
Extrait de viande Liebig.....	3 g

./.

Protéose peptone Difco	10 g
Glucose	4 g
Eau distillée	1.000 ml

Ajusté à pH 7, 4 - autoclavé 30 minutes à 110°C

2°) Milieu S G

Phosphate dipotassique	18 g
Phosphate monopotassique	2 g
Chlorure de sodium	4 g
Sulfate de magnesium (7 H_2O).....	80 mg
Sulfate ferreux (7 H_2O).....	4 mg
Sulfate de manganèse	16 mg
Chlorure d'ammonium	1 g
Glucose	10 g
Eau distillée	1.000 ml

Les phosphates, les chlorures, les sulfates et le glucose sont stérilisés séparément en solutions concentrées cinq fois, par autoclavage à 105°C durant 30 minutes.

3°) Milieux M S

Solution tampon :

Phosphate monopotassique.....	4 g
Phosphate dipotassique	36 g
Eau distillée	100 ml

ajuster à pH 8 - Stérilisation par autoclavage à 105°C durant 30 minutes.

./.

Solution minérale

Sulfate d'ammonium.....	40 g
Sulfate de magnesium (7 H_2O)	4 g
Sulfate ferreux (solution à 0,5 p. cent)....	2 ml
Chlorure de manganèse (solution à 0,5 p. cent)	4 ml
Cl Na	0,3 g
H_2O bidistillée	1.000 ml

autoclavé à 105°C durant 30 minutes.

Solution de glucose à 10 p. cent stérilisée à 105° durant 30 minutes.

- MS liquide :

solution tampon.....	5 ml
solution minérale.....	5 ml
solution glucosée	10 ml
eau distillée stérile.....	80 ml

- MS gélosé : on remplace l'eau bidistillée par 80 ml d'une solution de gélose à 1,5 p. cent dans l'eau bidistillée, stérilisé à 110°, 30 minutes.

- MS B_1 : à 100 ml de milieu M S, on ajoute 0,40 ml d'une solution de vitamine B_1 à 500 μg par ml, stérilisée par autoclavage à 105° durant 30 minutes.

- M S C : le milieu MS est additionné de solutions des acides aminés et des bases puriques en quantité telle que leurs concentrations soient de 0,003 p. cent et des divers facteurs de croissance à une concentration 10 fois plus faible.

./.

Préparation des sphéroplastes d'E. coli

Une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance en milieu B P G est diluée au $\frac{1}{4}$ avec le même milieu auquel on a ajouté 0,27 p. cent de sulfate de magnésium et 13 p. cent de saccharose. Le mélange est incubé à 37°C durant 45 minutes ; on ajoute alors l'agent inducteur et l'on porte de nouveau à 37°C

B) RECHERCHES DES SUBSTANCES INDUCTRICES

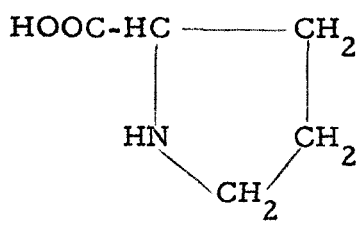
Nous avons montré que l'addition du glycocolle à une suspension d'E. coli en phase de croissance en milieu B P G contenant 10 p. cent de saccharose et 0,2 p. cent de sulfate de magnésium, donne lieu à la formation de sphéroplastes quand la concentration de l'acide aminé dans le milieu est de 3 p. cent (0,4 M) (51). L'essai dans les mêmes conditions de substances métaboliquement proches du glycocolle ne nous a conduit à aucun résultat positif, sauf s'il s'agissait d'un autre acide aminé. Une étude systématique de l'action des différents acides aminés en notre possession met en évidence les points suivants :

- les acides α aminés ayant leurs fonctions acide et basique libres sont actifs ; si l'une ou l'autre de ces fonctions est modifiée ou bloquée on n'observe plus aucun pouvoir inducteur.

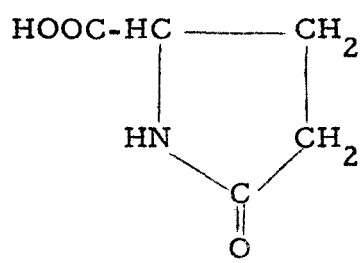
- seuls les isomères D déterminent la formation de sphéroplastes, l'addition de l'acide aminé de la série L ne modifie pas

l'action de son énantiomorphe.

Le tableau I indique l'origine et les concentrations d'acides aminés susceptibles de transformer 90 p. cent de bactéries en sphères à 37°C en milieu B P G. La D proline et le D aspartate de sodium n'ont aucune action tandis que le D glutamate présente un pouvoir inducteur très faible ; il semble que les acides aminés dicarboxyliques de la série D pénètrent difficilement dans la cellule bactérienne, quant à la D proline, on peut penser qu'il lui manque une fonction amine primaire (l'acide pyrrolidone carboxylique préparé à partir de l'acide DL glutamique, est lui aussi totalement inactif).



Proline



ac. pyrrolidone carboxylique

Ces constatations établissent un lien entre les diverses descriptions de cellules anormales obtenues par culture en présence d'acides aminés. Il semble qu'il s'agisse là d'une propriété générale des acides aminés de la série D, dont le glycocolle peut être considéré comme le premier terme.

./.

	Provenance	Concentrations molaires actives
Glycocolle	Hoffman La Roche	0,4
D alanine	"	0,3
D valine	"	0,15
D isoleucine	"	0,20
D serine	N.B.C.	0,25
D thréonine	N.B.C.	0,15
D méthionine	Manci	0,15
Acide D aspartique	N.B.C.	-
Acide D glutamique	N.B.C.	>0,6
D lysine	Fluka	0,2
D phenyl alanine	Hoffman La Roche	0,15
D proline	Fluka	-
D histidine	Hoffman La Roche	0,15

TABLEAU I

C) ETUDE DE LA TRANSFORMATION EN SPHEROPLASTES

Cette étude est rendue difficile par le fait que, au cours de l'induction, un grand nombre de sphéroplastes se lysent spontanément ; l'évaluation de la proportion des cellules transformées est donc entachée d'une erreur par défaut très importante ; de plus une proportion variable (pouvant aller jusqu'à 5 p. cent) des bactéries mises en suspension, sont, sinon mortes, tout au moins incapables de se diviser ; or, nous verrons ultérieurement que, pour se transformer, une cellule doit se développer ; enfin, on observe, en milieu liquide, des ébauches de divisions de sphéroplastes dont nous n'avons pu constater l'aboutissement. Donc, quand on examine, à l'aide du microscope en contraste de phase, une suspension bactérienne en voie de transformation, on voit :

1) des bactéries parmi lesquelles certaines, par nature, sont incapables de donner des sphéroplastes, et d'autres dont l'induction n'est pas commencée.

2) des sphères en formation et des sphéroplastes.

3) les membranes vides ("ghost" des auteurs anglo-saxons).

On ne peut apprécier l'importance de la lyse. C'est pourquoi nous avons souvent préféré suivre la cinétique de la transformation.

Techniques d'examen : une goutte de suspension bactérienne en milieu gélosé à 0,2 p. cent (dans le but d'éviter les mouvements

./.

browniens) est comprimée entre lame et lamelle, puis les bords de cette dernière sont paraffinés ; 5 ou 6 champs sont repérés et examinés à intervalle régulier à l'aide du microscope en contraste de phase avec l'objectif à immersion ; en dehors de ces examens, les préparations sont incubées à l'étuve à 37°C.

Par ailleurs, l'évolution de préparations semblables à été filmée au moyen de la chambre micro-cinématographique C. Zeiss, à la cadence de 30 images à la minute (correspondant à une accélération de 32 lorsque le film est projeté à la vitesse normale). La division des sphéroplastes a été étudiée de la même façon, mais les suspensions bactériennes sont faites en milieu gélosé à 1 p. cent, comprimé entre lame et lamelle, préalablement portées à 60°C.

1) Facteurs favorisants ou inhibiteurs

Les divers produits décrits par LEDERBERG et St CLAIR (27) comme protecteurs des sphéroplastes induits par la pénicilline, ont une action semblable sur les sphères induites par les acides aminés ; mais le saccharose a un effet moins marqué sur ces dernières que sur les sphéroplastes pénicilline ; il nous semble que les acides aminés employés à fortes concentrations, puissent remplacer partiellement le saccharose dans son rôle de substance hypertonique. Le sulfate de magnésium se montre toujours indispensable. Dans tous nos essais, nous avons donc mis en suspension les bactéries dans des milieux additionnés de saccha-

./.

rose et de sulfate de magnesium aux concentrations respectives de 10 et 0,2 p. cent.

Sur le tableau II, nous avons fait figurer la proportion des sphères obtenues dans des milieux différents en présence d'acides aminés ou de pénicilline. On observe seulement une transformation effective dans un milieu apte à assurer la multiplication bactérienne (milieux SG, MS ou B P G) et la vitesse d'induction est d'autant plus grande que le milieu est plus riche. Cependant, en milieu non nutritif, on constate la formation de quelques sphères ; ceci peut s'expliquer de la façon suivante : en apportant la suspension bactérienne, on ajoute des traces d'éléments nutritifs permettant à quelques cellules de se développer et de se transformer ; les sphères en se lysant libèrent des produits assurant la croissance et, par la même, l'induction d'un plus grand nombre de sphéroplastes ; ainsi, on aboutit lentement à une certaine proportion de cellules sphériques.

L'addition d'inhibiteurs de la croissance, à leur concentration bactériostatique, tels que le chloramphénicol ou la chlortétracycline, empêche toute transformation. Comme la pénicilline, les acides aminés transforment donc en sphéroplastes seulement les cellules en phase de croissance ; cela semble exclure toute action directe des acides aminés sur la paroi prééxistante, et plaide en faveur d'un mécanisme d'inhibition de la synthèse de cette paroi.

./.

Substance inductrice	Solution Saccharose 10 p. cent $SO_4Mg,7H_2O$ 0,2 p. cent	Milieu S G + Saccharose 10 p. cent + $SO_4Mg,7H_2O$ 0,2 p. cent	Milieu B P G + Saccharose 10 p. cent + $SO_4Mg,7H_2O$ 0,2 p. cent
Pénicilline (1.000 U/ml)	1	81	97
Glycocolle	1	81	90
D-Alanine	1	5	98
D-Valine	0	0	98
D-Isoleucine	1	5	95
D-Serine	7	15	90
D-Méthionine	1	4	100
D-Lysine	0	0	90
D-Phenylalanine	0	1	99
D-Histidine	6	23	98

TABLEAU II

p. cent de sphéroplastes et de bactéries en transformation après 4 heures d'incubation à 37°C en présence des diverses substances inductrices. Leurs concentrations sont données dans le tableau I (souche bactérienne : E. coli 36 Burnet)

2) Cinétique de la transformation

Les processus de la formation des sphéroplastes par l'action des acides aminés et de la pénicilline sont très semblables ; après addition de l'inducteur aux germes en phase logarithmique de croissance, on n'observe aucune modification morphologique durant un temps de latence variant de 15 à 30 minutes ; puis, généralement au milieu de la bactérie, apparaît une excroissance qui augmente lentement de volume (planche I, fig. 1 à 9) ; la cellule devient sphérique en une heure environ et résorbe peu à peu ses deux extrêmités. Cependant, cette issue heureuse est assez rare ; le plus souvent, on constate la formation brutale d'un bourgeon, celui-ci grossit et en quelques secondes prend une forme sphérique en restant relié au germe par un pédoncule fin. Cette excroissance a une vie éphémère : elle éclate durant les minutes suivantes, le contenu cellulaire se vide et il reste une paroi vide qui, elle-même, se lyse rapidement (planche I, fig. 10 à 12).

Ces faits peuvent être interprétés de la manière suivante : lorsque la formation de l'excroissance est trop brutale, celle-ci rompt la couche superficielle lipopolysaccharidique de la paroi qui serait nécessaire à la stabilité du sphéroplaste. L'absence de limite nette entre la sphère et la bactérie plaide en faveur de la persistance de cette couche dans le cas d'une transformation menée à bien.

L'estimation du nombre de sphéroplastes obtenus à

./.

partir d'une suspension bactérienne est délicate, en effet les dilutions successives en vue de leur numération détruit un nombre important de cellules ; cependant, on peut considérer que 10^{-2} à 10^{-4} bactéries sont capables de se transformer en sphères en milieu hypertonique liquide ou faiblement gélosé.

La propriété de se transformer en sphéroplastes, présentée par une proportion faible de la population bactérienne correspond soit à un état physiologique favorable de certaines cellules au moment de l'induction, soit à un caractère particulier de certains clones leur permettant de survivre sous cette forme anormale. Nous serons amenés à envisager cette dernière hypothèse lors de nos essais de culture des sphéroplastes.

3) Evolution et culture

La culture en phase L, c'est-à-dire le développement en surface de la gélose de microcolonies de *Proteus hauseri*, est connue de longue date. LEDERBERG (97) a montré qu'il est possible de cultiver les sphéroplastes pénicilline d'*E. coli* au sein d'un milieu nutritif, gélosé à 1 p. cent, contenant du saccharose et du sulfate de magnesium. Nous avons étudié le comportement dans ces mêmes conditions, des sphères induites par les acides aminés, mais auparavant, nous avons cherché à déterminer si des divisions avaient lieu en milieu liquide.

Evolution en milieu liquide

En milieu liquide ou faiblement gélosé (0, 2 p. cent), on

voit apparaître, dès la fin de la période d'induction, une vacuole en forme de croissant, située contre la paroi du sphéroplaste (planche I - fig. 7 à 9 et 13 à 15). Souvent, à ce stade, la vacuole envahit presque toute la cellule qui éclate. Mais parfois la sphère émet des protubérances de tailles variables (planche I - fig. 7 à 9) qui s'allongent, s'étranglent et se séparent de la cellule mère ; elles aboutissent à la formation de petites sphères satellites, dont nous n'avons jamais pu suivre l'évolution ultérieure par examen direct. Les essais de repiquage sont tous restés infructueux.

Culture au sein d'un milieu gélosé

Nous avons pu obtenir des cultures en série de sphéroplastes induits au moyen des acides aminés, seulement au sein d'un milieu fortement gélosé, réparti en tube à essai sur une hauteur de 10 cm ; en effet, la croissance de nos formes bactériennes anormales est souvent inhibée par l'oxygène, il n'est donc pas possible de couler les milieux gélosés contenant la suspension bactérienne, en boîte de Pétri, comme le fait LEDERBERG. Notre technique est la suivante : le milieu nutritif, contenant l'acide aminé inducteur, gélosé à 1 p. cent et réparti à raison de 15 ml par tube de 160 x 16 mm est maintenu liquide à 48°C ; environ $2\text{-}10^9$ germes sont soigneusement mis en suspension dans ce milieu, immédiatement refroidi puis incubé à 37°C. Après 24 heures, on constate un dégagement gazeux important et un trouble du milieu, correspondant au métabolisme résiduel de la plupart des cellules avant leur lyse. On prélève alors 1 ml

que l'on triture avec le même volume de milieu neuf et que l'on porte ensuite dans un milieu gélosé à 1 p. cent. Après un temps de latence variant de 3 à 8 jours, on voit apparaître quelques colonies dont le nombre est très faible par rapport à celui des bactéries ensemencées initialement, on peut évaluer leur proportion comme inférieure à 10^{-7}. Ces colonies sont ensuite repiquables en série dans les mêmes conditions. Ces résultats nous conduisent à envisager l'hypothèse suivante : lors de la première culture, on sélectionne, en nombre très faible, des mutants capables de se développer et de se diviser sous forme de sphéroplastes ; ces clones résistants peuvent alors être cultivés sans difficulté.

A l'examen direct des colonies en milieu gélosé, on observe d'abord une augmentation de volume des cellules serrées les unes contre les autres (planche I, fig. 16 à 18) puis des divisions par cloisonnement transversal (planche I, fig. 19 à 21).

Influence de divers facteurs sur la culture

La concentration optima en gélose dans le milieu est de 1 p. cent ; les concentrations de 0,8 et de 1,5 p. cent sont les limites en dessous et en dessus desquelles le développement des sphéroplastes devient très difficile.

La richesse du milieu en éléments nutritifs a une influence variable selon le moment de la culture ; lors du premier passage sur milieu gélosé, il est indispensable que celui-ci soit très riche (milieu

./.

BPG) ; le tableau XXI montre que l'addition de peptone au milieu synthétique est nécessaire pour que l'on obtienne un début de croissance. Sur milieu synthétique (SG ou MS), aucune culture n'est observée. Mais les repiquages ultérieurs peuvent être faits sur milieu pauvre avec autant de succès que sur milieu complexe.

La présence de sulfate de magnesium est indispensable tandis que le saccharose, s'il est indispensable à la croissance des sphères pénicilline, semble moins nécessaire pour la culture de sphéroplastes induits par les acides aminés (Tableau XX).

Souvent l'anaérobiose stricte est exigée par les sphéroplastes, mais ce caractère est variable suivant les souches et les acides aminés mis en jeu. En présence de glycocolle, de D alanine, de D valine, de Dméthionineet de D lysine, les sphères provenant des souches 71.062 et 36 Burnet se développent seulement dans la zone anaérobie tandis que la souche H fr C présente le même caractère avec la D histidine. Pensant que le rôle de la gélose pouvait être d'empêcher la pénétration de l'air dans le milieu, nous avons essayé diverses techniques de culture en absence d'oxygène, cela sans aucun succès.

Enfin la température d'incubation a une influence prépondérante sur la croissance des sphéroplastes. Le nombre de cellules capables de se multiplier sous forme de sphéroplastes augmente considérablement, à mesure que la température d'incubation baisse (Tableau

./.

XVIII). Ce fait sera étudié dans le chapître concernant les mutants muqueux d'E. coli.

Essais de culture en surface et en milieu liquide

En ensemençant des bactéries à la surface de milieux de même composition que ceux utilisés pour les cultures en profondeur, mais contenant des concentrations d'acides aminés inférieures à la concentration inductrice, on constate, après incubation à 37° C, la formation de colonies d'aspect muqueux, très différentes de celles du germe initial. Après plusieurs repiquages en présence de concentrations croissantes d'inducteur, on obtient des colonies qui, examinées immédiatement, se montrent composées exclusivement de sphéroplastes petits et denses ; ensuite, on voit apparaître des formes bactériennes normales qui envahissent la culture. Nous considérons ces sphères comme des formes intermédiaires entre sphéroplastes et bactéries normales rendues résistantes à l'inducteur par repiquages successifs en sa présence. Le même phénomène peut être observé en milieu liquide.

Réversion vers la forme bactérienne

Les sphéroplastes portés sur un milieu nutritif sans inducteur, réversent vers la forme bactérienne. Dès la première division, les deux cellules filles prennent une forme allongée, la division suivante conduit à quatre bactéries normales. Cette réversion a toujours lieu, même

./.

après de nombreuses subcultures des sphéroplastes.

Les souches bactériennes obtenues présentent des caractères morphologiques et biochimiques identiques à ceux de la souche initiale, à une exception près : certaines d'entre elles cultivées sur milieu solide donnent des colonies d'aspect muqueux. Ce caractère acquis au cours du passage de la cellule sous la forme de sphéroplaste est à la base de notre étude ultérieure sur la résistance aux agents inducteurs.

4) Etude de la résistance des sphéroplastes à l'agent inducteur

Au cours de nos essais de culture des formes anormales sphériques, nous avions remarqué à quel point la proportion des bactéries capables de donner naissance à des colonies de sphéroplastes en milieu solide était variable suivant les souches étudiées et souvent faible (de l'ordre de 10^{-7} à 37°C pour la souche H fr C, de 10^{-4} pour la souche 36 Burnet) ; de plus cette culture initiale devait obligatoirement être réalisée en milieu riche. Par contre, après la sélection faite lors du premier repiquage, la croissance devient aisée, le nombre de colonies obtenuesà partir de chaque colonie de sphères est important et le milieu nutritif peut être pauvre. Ceci semble être le résultat de la sélection de mutants ayant la propriété de se développer sous forme de sphéroplastes. Cette propriété correspond, soit à une indifférence de certaines bactéries à la toxicité des substances inductrices, soit à un caractère général de rester viable dans des conditions physiques défavorables.

./.

Dans le premier cas, on doit observer une résistance spécifique vis-à-vis de l'agent inducteur en cause et, selon le produit transformant, des différences importantes dans le nombre de mutants obtenus ; dans le deuxième cas, les sphéroplastes, sélectionnés préalablement par une substance inductrice déterminée, seront capables de se développer aussi bien dans des milieux contenant d'autres inducteurs qu'en présence de cette substance. Or, d'une part, la proportion de mutants isolés en présence des divers inducteurs est la même, aux erreurs d'expérience près, d'autre part une culture de sphéroplastes pénicilline repiquée en présence de pénicilline, de glycocolle ou de D histidine, donne des subcultures identiques ; il en est de même si les sphères ont été induites au moyen du glycocolle ou de la D histidine. La sélection des mutants n'est donc pas spécifique d'un inducteur, mais correspond à la propriété de certains clones de se diviser à l'état de sphéroplaste.

Les souches bactériennes obtenues par réversion des cultures de sphéroplastes présentent parfois un caractère nouveau : celui de former sur milieu solide des colonies d'aspect muqueux, coulant à la surface de la gélose. C'est ce caractère que nous allons étudier, afin de déterminer s'il est lié à la résistance à l'agent inducteur.

III - OBTENTION DE MUTANTS SYNTHETISANT UNE SUBSTANCE MUQUEUSE

A la suite de nombreuses subcultures de sphéroplastes d'*E. coli* H fr C en profondeur sur milieu BPG contenant de la D histidine (concentration 0,15 M), nous avons observé qu'un certain nombre de sphéroplastes, repiqués en surface en l'absence d'inducteur donnaient naissance à des colonies d'aspect muqueux. Alors que les colonies normales sont sèches et ont un diamètre de 2 à 3 mm, les colonies muqueuses atteignent un diamètre de 10 mm, elles sont bombées, opalescentes et coulent si l'on incline le milieu gélosé. Nos expériences sur les sphéroplastes induits au moyen de la D histidine ont été interrompues à cause des difficultés de se procurer cet acide aminé, mais nous les avons reproduites et complétées par l'étude de la réversion des sphéroplastes obtenus à l'aide du glycocolle et de la pénicilline.

L'isolement de souches muqueuses a été réalisé par trois procédés différents : réversion après cultures en profondeur des sphéroplastes, culture en surface en présence de substances inductrices, ou transfert du caractère muqueux par recombinaison génétique.

./.

A) REVERSION APRES SUBCULTURES DE SPHEROPLASTES AU SEIN DE LA GELOSE.

Les essais d'obtention de colonies muqueuses ont été faits avec les souches d'E. coli 36 Burnet, 71.062 et différents mutants dérivés de la souche K 12, en particulier la souche H fr C. L'isolement des bactéries formant une substance muqueuse présente des particularités pour chaque souche étudiée, c'est pourquoi nous envisagerons successivement les résultats obtenus avec E. coli K 12, puis avec les autres souches.

1) Les différents clônes dérivés de la souche K 12, sont ensemencés en profondeur à raison de 2.10^8 germes par ml en milieu BPG gélosé à 1 p. cent, additionné de saccharose (10 p. cent), de sulfate de magnésium (0,2 p. cent), et contenant de la pénicilline (1.000 unités par ml), du glycocolle (concentration 0,4 M) ou de la D histidine (concentration 0,15 M) ; après 3 jours d'incubation à 37°C, les colonies de sphéroplastes sont prélevées, broyées à l'aide d'un agitateur et mises en suspension dans du milieu BPG liquide. Une partie de cette suspension est portée dans le même milieu d'induction solide, pour obtenir des subcultures de sphéroplastes ; une autre partie est étalée à la surface d'un milieu M S B_1, après dilutions telles que les colonies obtenues par incubation de 24 heures à 30°C soient convenablement espacées. La même opération est répétée lors de chaque

./.

repiquage du milieu d'induction. Sur milieu M S B_1 on observe parfois l'apparition de colonies d'aspect muqueux (colonies M) reproduites sur la planche II. Leur nombre par rapport à celui des colonies normales, variable lors de la réversion des premières subcultures de sphéroplastes, devient très important après un certain nombre de repiquages. Sur le tableau III, nous avons résumé l'obtention de souches M à partir de la souche H fr C en fonction du nombre de repiquages sur milieu contenant du glycocolle.

Les variations du pourcentage des colonies M obtenues lors des premières réversions, nous a conduit à étudier systématiquement l'influence de divers facteurs culturaux : la modification de la nature du milieu inducteur (milieu M S B_1) ou de la température d'incubation n'amène pas de changement sensible dans le taux des colonies M obtenu après réversion. On peut noter toutefois une légère diminution de leur nombre lorsque la température d'incubation est inférieure à 37°C. Par contre, le temps d'incubation joue un rôle prédominant : une culture de sphéroplastes H fr C, sur milieu BPG - glycocolle, après 2 jours d'incubation à 37°C, donne, par réversion, 7 p.cent de colonies muqueuses, après 6 jours : 22 p.cent, après 16 jours : 48 p.cent. Ces résultats semblent indiquer que parmi les individus capables de cultiver sous forme de sphéroplastes seuls ceux qui synthétisent la substance muqueuse, peuvent rester viables après contact prolongé avec la pénicilline, le glycocolle ou la D histidine.

./.

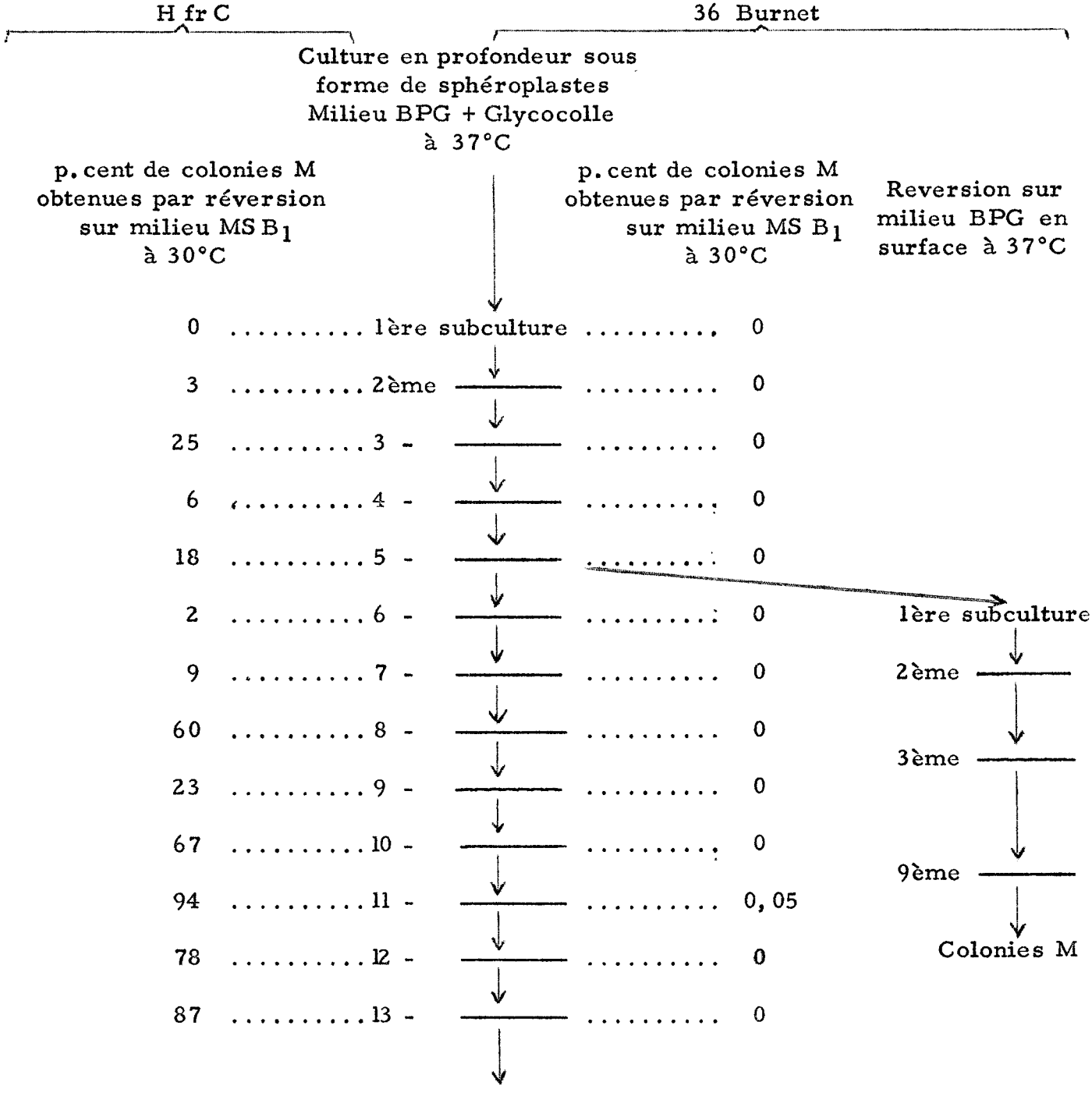


TABLEAU III

Obtention de colonies muqueuses à partir des souches Hfr C et 36 Burnet.

Chaque flèche correspond à un repiquage de la culture

2) L'obtention de bactéries M à partir de la souche d'E. coli 36 Burnet est plus laborieuse et le petit nombre de souches isolées ne nous a pas permis d'en tirer des conclusions générales. Après 30 subcultures sur milieu d'induction incubé 3 à 4 jours à 37°C, nous avons observé une fois seulement la formation d'une colonie muqueuse par réversion sur milieu M S B_1. Mais si la réversion est faite en surface d'un milieu BPG, après 6 à 15 repiquages en masse de colonies d'aspect normal, sur ce même milieu, on voit apparaître quelques colonies M ; il n'a pas été possible de déterminer la cause de cette transformation spontanée (tableau III).

Cependant, par vieillissement de plusieurs mois d'une culture de sphéroplastes, il est possible de sélectionner comme à partir de la souche K 12, des bactéries M.

3) La souche 71.062 a un comportement intermédiaire entre celui des deux souches précédemment décrites. On observe à la fois la formation de colonies M par repiquages successifs des bactéries après réversion, et la sélection de mutants M au cours des subcultures sur milieu d'induction.

B) CULTURES EN SURFACE SUR MILIEU CONTENANT L'INDUCTEUR.

Les différentes souches d'E. coli, cultivées à la surface d'un milieu BPG additionné de saccharose, de sulfate de

./.

magnésium et d'un acide aminé à une concentration inférieure à la concentration inductrice (glycocolle 0,2 M, D histidine 0,1 M) donnent des colonies d'aspect muqueux ; celles-ci sont composées d'un mélange de sphéroplastes et de bactéries normales.

Par repiquage sur milieu sans inducteur, quelques colonies conservent leur caractère muqueux, les autres reprennent leur morphologie normale. Les modalités d'obtention en surface des mutants M sont ici les mêmes quelles que soient les souches bactériennes essayées.

C) TRANSFERT GENETIQUE DU CARACTERE MUQUEUX

La propriété de synthétiser à 30°C une substance muqueuse peut être transmise d'une souche d'E. coli K12 H fr C prototrophe (souche mâle transmettant, à haute fréquence, une partie ou la totalité de son chromosome) à une souche K 12 F^- ; il s'agit de la souche F^- 2.000 X 17 K dont les caractères sont les suivants :

T^- L^- Arg^- B_1^- Lac^- Sm^r.

Nous avons suivi la technique de croisement décrite par JACOB et WOLLMAN (75), consistant à mettre en contact à 37°,

./.

Bactéries T^-, L^-, Arg^-, B_1^- : exigeantes respectivement en threonine, leucine, arginine, vitamine B_1 ; Lac^- : germes incapables d'utiliser le lactose ; Sm^r : résistants à la streptomycine.

les cultures, sur milieu BPG, des deux souches en phase exponentielle de croissance : 1,9 ml de culture de H fr C et 0,1 ml de culture de F^-. Après une heure d'incubation, on effectue des dilutions qui sont étalées sur les milieux permettant de sélectionner les recombinants suivants : T^+ L^+ Sm^r (MSB_1 additionné d'arginine et de streptomycine); Lac^+ Sm^r (MSB_1 dans lequel le glucose est remplacé par du lactose et contenant de la streptomycine, de la threonine, de la leucine et de l'arginine) ;

Arg^+ Sm^r (MSB_1 additionné de threonine, de leucine et de streptomycine).

Le caractère muqueux ne permettant pas d'effectuer une sélection, sa fréquence de transmission peut seulement être mesurée de façon indirecte en analysant les recombinants sélectionnés pour les autres caractères. Sur le tableau IV, nous avons résumé les résultats de deux croisements. On remarque que dans les deux cas, M est plus proche de Lac que de T et d'Arg : en effet, la fréquence d'apparition de M est maximale lorsque les recombinants ont été sélectionnés pour les caractères Lac^+ Sm^r. Par ailleurs, les pourcentages d'apparition des caractères Lac^+ et M chez les recombinants T^+ L^+ Sm^r et Arg^+ Sm^r sont toujours voisins. Il faut cependant noter que la fréquence de conjugaisons est faible, ceci est dû à la présence de substance muqueuse.

./.

Souche H fr C	Caractères de sélection des recombinants	Caractères marqueurs non sélectionnés			
		T^+ L^+	Lac^+	Arg^+	M
MH 21	T^+ L^+ Sm^r	100	30,5	10,3	22,5
	Lac^+ Sm^r	66	100	10	86
	Arg^+ Sm^r	36	14	100	9,2
MG 6	T^+ L^+ Sm^r	100	35	6,2	28
	Lac^+ Sm^r	73	100	4,2	76
	Arg^+ Sm^r	48	15	100	9,2

Tableau IV

Pourcentage de recombinants présentant certains caractères marqueurs par rapport à la totalité des recombinants sélectionnés au moyen de ces mêmes caractères (caractère muqueux excepté)

La souche réceptrice est la souche 2.000 X 17 K

Ces expériences permettent d'obtenir de nouvelles souches M et démontrent que le caractère M est sous la dépendance d'un déterminant génétique, situé près des gènes qui gouvernent l'utilisation du lactose.

D) DISCUSSION

Les modalités d'obtention de mutants M dérivés des diverses souches d'E. coli permettent de faire les remarques suivantes :

1) Les bactéries M sont bien des mutants ; ceci est démontré par les expériences de transfert du caractère muqueux.

2) Ces mutants sont vraisemblablement isolés par sélection en deux étapes : la première est réalisée au moment de la culture initiale en présence d'agent inducteur ; seuls quelques individus parmi la population ensemencée, sont capables de se diviser et de former des colonies, soit en surface, soit en profondeur. Une deuxième sélection s'opère lors du vieillissement du milieu d'induction en profondeur ; elle correspond à la survie des mutants M dans de telles conditions. Dans le cas de cultures en surface sur des milieux contenant des concentrations sous inductrices d'acides aminés, on sélectionne par repiquage sur milieu ordinaire les colonies conservant leur caractère muqueux.

./.

3) Mais on peut aussi formuler l'hypothèse suivante : les acides aminés et la pénicilline ne seraient pas des agents de sélection, mais détermineraient des modifications irréversibles, et héréditaires au niveau de certaines voies de biosynthèse, dont la conséquence serait la production de la substance muqueuse. Cette hypothèse ne peut être retenue, tout au moins si l'on élimine la possibilité d'une action directe des inducteurs au niveau des gènes, puisque le caractère M peut être transmis à une souche réceptrice.

4) Le problème de l'apparition spontanée de colonies M par subcultures sur milieu sans inducteur de la souche 36 Burnet, n'a pas reçu de réponse ; en effet, sur milieux ordinaires, la souche sauvage a une vitesse de croissance plus élevée que le mutant M ; dans ces conditions la sélection joue en faveur du germe sauvage. Certains facteurs de culture pourraient peut être favoriser la croissance de bactéries M, trop peu nombreuses initialement pour être mises en évidence; mais nous n'avons pu en apporter la preuve.

E) NOMENCLATURE ET ENTRETIEN DES MUTANTS M UTILISES

Nous avons étudié seulement les mutants M sélectionnés après cultures en profondeur sous forme de sphéroplastes ou les souches provenant de leur recombinaison.

./.

La nomenclature suivante a été employée : pour les mutants provenant de la souche H fr C, la lettre M indique le caractère muqueux, P, G ou H la substance inductrice qui a opéré la sélection (pénicilline, glycocolle ou D histidine), le numéro correspond au nombre de subcultures sous forme de sphéroplastes, les lettres de l'alphabet grec aux divers clones isolés lors d'une même réversion ; ainsi le mutant MH7α est une souche muqueuse provenant de la colonie α obtenue par réversion après 7 subcultures d'E. coli H fr C sous forme de sphéroplastes en présence de D histidine. Les mutants isolés à partir d'autres souches bactériennes suivent la même nomenclature, mais leur numéro d'ordre est précédé du nom de la souche et le chiffre romain correspond au nombre de repiquages, sur milieu ordinaire, nécessaires pour obtenir la souche muqueuse.

Il n'a pas été possible d'entretenir les mutants M par culture en masse sur gélose ordinaire; en effet, sur ce milieu, la sélection joue en faveur de la mutation reverse, on voit réapparaître à plus ou moins longue échéance la souche sauvage. Le tableau V donne les taux de croissance comparés de la souche sauvage et d'un mutant M ; ce taux est nettement plus bas pour le mutant ; celui-ci aura tendance à disparaître lorsqu'il est mélangé à la souche sauvage dans un milieu de culture. Les mutants M sont donc entretenus par isolements successifs sur milieu MSB_1, incubé à 30°C ; chaque mois une colonie

./.

Milieu de croissance	H fr C	MH 7α	$\frac{\mu H\ fr\ C}{\mu MH\ 7\alpha}$
M S B_1	1,57	1,16	1,35
M S C	2,74	1,94	1,41

TABLEAU V

Taux de croissance ($\mu = \frac{\text{nombre de divisions}}{\text{temps (heure)}}$) de la souche sauvage et d'un mutant muqueux sur deux milieux liquides incubés à 30°C avec agitation constante. La dernière colonne donne le rapport des taux de croissance des deux souches, sensiblement constant pour les deux milieux

muqueuse est repiquée dans les mêmes conditions. Il faut remarquer que ce procédé, nécessaire pour conserver les souches M, comporte le risque de sélectionner à partir de celles-ci des mutants présentant de nouvelles propriétés.

IV - ETUDE DE LA SYNTHESE DE LA SUBSTANCE MUQUEUSE

A) ETUDE PRELIMINAIRE DES CONDITIONS DE FORMATION DU MUCUS PAR CULTURE SUR MILIEU SOLIDE

Dès nos premiers essais, nous avons remarqué que la synthèse de la substance muqueuse dépendait de la nature du milieu et de la température d'incubation. Sur le tableau VI, on constate que les colonies présentent un aspect d'autant plus muqueux que le milieu est plus pauvre et la température d'incubation plus basse. Il faut noter cependant des variations suivant les souches mutantes étudiées, en particulier, la souche 36 B M H 8 VII, dont le mode d'obtention diffère des autres souches, se montre moins sensible aux modifications des conditions culturales. L'étude de l'influence des principaux facteurs différenciant les milieux essayés donne les résultats suivants (tableau VII) : lorsque le rapport entre les glucides et la source d'azote (élevé pour le milieu M S B_1, faible pour le milieu B P G) tend vers zéro, la formation de mucus devient nulle, même si la température d'incubation est convenable. L'addition, au milieu B P G, de sulfate de magnésium, qui entre en proportion importante dans la composition du milieu M S B_1, ne modifie pas sensiblement l'aspect des colonies ; enfin, la production de mucus est peu influencée par le pH du milieu de croissance lorsqu'il varie de 6,5 à 8.

./.

Milieu de culture (gélosé à 1,5 %)	température d'incubation	SOUCHES BACTERIENNES					
		MH 7α	MH 11	MH 12	MH 15	36 BMH8 VII	36 BMH23
M S B_1	37°C	0	0	±	±	+ +	±
	30°C	++	±	++	+	+++	++
	15°C	+++	++	+++	++	+++	+++
M S C	37°C	±	±	++	++	+++	+
	30°C	±	±	+++	+++	+++	+++
	15°C	++	++	+++	+++	+++	+++
B P G	37°C	0	0	0	0	+	0
	30°C	±	0	++	+	+++	++
	15°C	+	±	+++	+++	+++	+++

0 : colonies semblables à celles de la souche sauvage.

± : colonies bombées très légèrement muqueuses.

+ : colonies bombées et transparentes, de même diamètre que celles données par la souche sauvage.

++ : colonies bombées et transparentes, de diamètre nettement supérieur à celles données par la souche sauvage.

+++ : colonies transparentes, confluentes.

TABLEAU VI

Formation de mucus par culture en surface sur divers milieux

et à trois températures différentes

Milieu de culture gélosé à 1,5 p. cent	SOUCHES BACTERIENNES					
	MH 7β	MH 11	MH 12	MH 21	MG 6	36 B MH 8 VII
B P G sans glucose	0	0	0	0	0	0
B P G	+	±	+	+ +	±	+ +
B P G + SO_4Mg 0,05 p. cent	+ +	+	±	+++	±	±
M S B_1	+ +	+ +	+ +	+++	±	+++

TABLEAU VII

Formation de mucus par culture en surface à 30°C sur divers milieux

les symboles ont la même signification que dans le tableau précédent

De cette étude, il ressort que deux facteurs favorisent la synthèse de la substance muqueuse : d'une part, une forte concentration en glucides par rapport à celle des éléments azotés ; d'autre part, une température d'incubation inférieure à 37° C.

Cette influence de la température sur la formation du mucus est connue depuis longtemps chez les Enterobactéries. MORGAN et coll. (110), DUGUID et WILKINSON (35), étudiant l'influence des conditions de culture sur la production des polysaccharides montrent que de nombreuses souches donnent naissance à des colonies muqueuses par culture à des températures proches de 20° C et sur milieu privés en azote. Nous avons répété ces expériences avec nos souches sauvages ; à 15°C, H fr C synthétise de façon inconstante du mucus, mais jamais à température supérieure à 20° C. Par contre, il n'a pas été possible d'obtenir dans les mêmes conditions des colonies muqueuses à partir des souches 36 Burnet et 71.062.

On constate donc que les mutants M diffèrent de la souche sauvage par un décalage de la température maximale requise pour la synthèse du mucus.

B) ETUDE CHIMIQUE DE LA SUBSTANCE MUQUEUSE ET METHODE DE DOSAGE

1) Nos premières expériences ont porté sur l'étude de la substance muqueuse synthétisée par culture sur milieu solide. Les colo-

nies M sont prélevées à l'aide du fil de platine et mises en suspension dans 20 fois leur volume d'eau distillée ; après agitation, on centrifuge 15 minutes à 20.000 g de façon à éliminer le matériel cellulaire. La substance muqueuse est précipitée à 0°C par trois volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium, puis dialysée contre de l'eau distillée jusqu'au moment où, par chromatographie sur papier d'un volume de solution correspondant à 500 µg de mucus, on ne puisse mettre en évidence aucun ose au moyen des révélations habituelles (oxalate d'aniline ou nitrate d'argent ammoniacal).

Après hydrolyse à 100°C durant deux heures par l'acide chlorhydrique 1,5 N et dessication sous azote à froid, l'identification des composants glucidiques est réalisée par chromatographie sur papier à l'aide des solvants suivants : butanol/acide formique/eau (1, 3, 12) et butanol/pyridine/eau (3, 4, 2). L'électrophorèse à pH 3,5 en tampon pyridine-acide acétique durant 18 heures à 280 volts permet de séparer les acides uroniques. Nous avons, de cette façon, mis en évidence le glucose, le galactose, le fucose et l'acide glycuronique, composants identiques à ceux déterminés par BEISER et DAVIS (6) dans le mucus formé par des mutants d'E. coli, d'origines diverses. Le pourcentage d'oses totaux par rapport au poids sec de la substance muqueuse est compris entre 50 et 75 p. cent ; ces variations sont constatées pour le mucus préparé à partir d'une même souche mutante et dans les mêmes conditions. Par hydrolyse du produit par l'acide chlorhydrique 5,6 N durant 12 heures à 100°C, puis chromatographie sur papier, on constate la présence des acides aminés constitutifs des protéines banales. Il

./.

est vraisemblable que le composé protidique résulte de la lyse des bactéries en culture.

2) L'extraction de la substance muqueuse produite par les bactéries en milieu liquide M S B_1 est réalisée selon la technique décrite ci-dessus ; mais des purifications ultérieures sont faites par précipitations par 3 volumes d'alcool en présence de sulfate de magnésium (0,2 p. cent) et dialyses répétées ; le produit final est enfin lyophilisé.

L'analyse effectuée au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences a donné les résultats suivants : composition globale : 61,2 p. cent d'oses et 10,8 p. cent d'acides uroniques. Il n'a pas été trouvé de phosphore et seulement de faibles quantités d'azote correspondant à 10 p. cent environ du poids de la substance muqueuse en acides aminés.

La proportion respective des glucides déterminée après séparation chromatographique est de :

- 1 glucose
- 2 galactoses
- 2 ou 3 fucoses.

Si l'on fait abstraction des 28 p. cent du matériel non identifié, le polysaccharide serait constitué d'une molécule de glucose et d'acide glycuronique, de deux molécules de galactose et de trois de fucose. Il ne contient pas d'osamine, ni d'acides sialique ou muramique.

./.

Il faut signaler la présence d'unetache de nature osidique, paraissant correspondre à un acide uronique, car sa vitesse de migration en électrophorèse est plus grande que celle de l'acide glycuronique.

3) Technique de dosage du polysaccharide. Le principe de la technique est basé sur un dosage spécifique du fucose, après précipitation non sélective de la substance muqueuse. Dans nos premiers essais, nous avions tenté de doser par la méthode àl'orcinol les oses totaux du polysaccharide obtenu par précipitation puis dialyse ; cependant, la lenteur de la méthode et les erreurs auxquelles les manipulations successives nous exposaient, nous ont contraint à chercher un autre procédé. Nous avons donc utilisé la technique suivante d'emploi plus aisé, car elle permet un dosage spécifique des méthyl-pentoses en présence de glucose, ce qui évite la dialyse.

A 5 ml de la solution à doser contenue dans un pot à centrifuger, on ajoute 25 ml d'alcool absolu après avoir ramené, si nécessaire, la concentration du milieu en sulfate de magnésium à 0,2 p. cent. Le mélange est laissé 18 heures à 4°C puis centrifugé à 1.500 g durant 15 minutes ; le culot est repris par 5 ml d'eau distillée et le dosage du méthyl-pentose est effectué sur une partie aliquote par la technique de DISCHE et SHETTLER (33) : à 1 ml de solution contenant 2 à 10 µg de fucose, on ajoute à froid 4,5 ml d'acide sulfurique concentré. Le mélange

./.

est porté au bain-marie bouillant durant 10 minutes exactement, refroidi puis additionné de 0,1 ml d'une solution acqueuse de chlorhydrate de cystéine à 3 p. cent. Après deux heures de repos à l'obscurité et à la température de la pièce, on mesure la densité optique à l'aidedu spectrophotomètre à 397 et 420 mμ (ces longueurs d'onde,légèrement différentes de celles données par DISCHE,ont été déterminées sur notre appareil). A ces deux longueurs d'onde, la réaction donnée par les hexoses présente la même absorption, tandis qu'elle est nettement plus forte pour le fucose à 397 mμ qu'à 420 mμ . La différence D° 397 - D° 420 est proportionnelle à le concentration en fucose entre 2 et 10 μg par ml. Chaque mesure est effectuée en même temps sur l'échantillon à doser et sur une solution de glucose à 100 μg par ml afin de vérifier constamment les longueurs d'onde de l'appareil ; lorsqu'un dosage doit être effectué dans un nouveau milieu, les échantillons sont divisés en deux fractions, dont l'une est additionnée de 5 μg de fucose pour constituer un témoin interne.

C) ETUDE QUANTITATIVE DE LA SYNTHESE DU POLYSACCHARIDE PAR CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

1) Conditions de culture favorables. En milieu liquide, on retrouve les deux facteurs influençant la synthèse du polysaccharide

./.

sur milieu solide : la nature du milieu et la température d'incubation.

En milieu B P G, la quantité de polysaccharide formée est nulle quelle que soit la température d'incubation ; elle est variable mais toujours faible en milieu M S C et maximale en milieu M S B_1.

Sur ce dernier milieu, on peut mettre en évidence l'effet de la température ; sur la figure 7, on constate que les cellules proliférantes ne commencent à synthétiser le polysaccharide qu'à une température inférieure à 38°C ; à mesure que la température d'incubation baisse, la quantité de substance muqueuse augmente, rapidement de 38° à 30° C, plus lentement ensuite. Si l'on considère qu'en dessous de 37°C le taux de croissance des bactéries diminue rapidement, et que les dosages ont été effectués sur des cultures de même densité optique, on constate que l'accroissement de la synthèse du polysaccharide en dessous de 36°C correspond à l'augmentation du temps pendant lequel les cellules sont présentes en grand nombre dans le milieu, et peuvent effectuer cette synthèse. En tenant compte du temps de contact des bactéries dans le milieu, on obtient sensiblement un palier de 36° C, ce qui permet de conclure que le mutant M H 7 β , en culture sur milieu M S B_1 ne forme pratiquement pas de substance muqueuse au dessus de 38°C, la synthèse commence entre 38° et 36°C puis sa vitesse reste constante de 36° à 25°C.

Un troisième facteur, qui n'entre pas en jeu pour les

./.

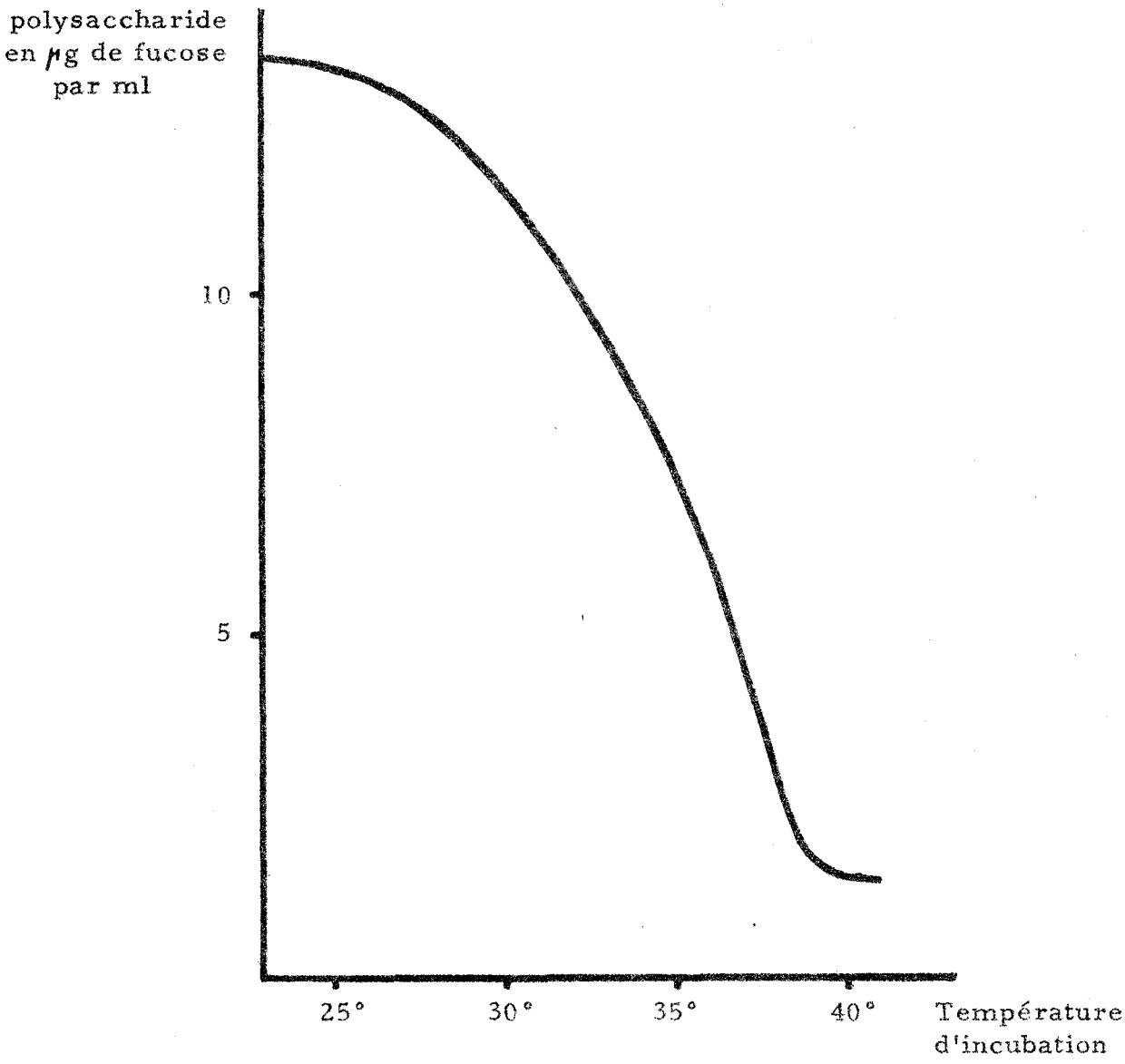


Figure 7

Synthèse du polysaccharide par les bactéries en culture en milieu MSB_1 à différentes températures.

Les dosages de polysaccharide ont été effectués lorsque la population bactérienne a atteint 1.10^8 cellules par ml ; Souche MH 7 β

cultures sur plaque de gélose est l'aération. Nos expériences en milieu liquide sont toujours effectuées sous agitation de façon à obtenir une oxygénation convenable. Si la culture est statique, la production de polysaccharide est le $\frac{1}{10}$ ème de celle obtenue en milieu agité ; il est difficile de déterminer si cela est dû à l'insuffisance de l'oxygénation nécessaire à la synthèse, à la baisse du taux de la croissance bactérienne ou à la diminution de la fréquence des contacts entre bactéries et molécules du milieu. Il faut noter que par culture en anaérobiose stricte on observe la formation de polysaccharide ; la présence d'oxygène n'est donc pas indispensable, mais favorise considérablement sa synthèse.

2) Etude de la synthèse du polysaccharide par les bactéries en culture agitée sur milieu MSB_1, à 30°C.

La courbe exprimant la quantité de polysaccharide synthétisé en fonction du temps a sensiblement la même allure que la courbe exponentielle de la croissance bactérienne (figure 8) et ceci quel que soit le mutant M essayé. L'examen de la figure appelle les commentaires suivants :

Le parallelisme des deux courbes semble indiquer que les bactéries, selon le moment de leur croissance, ne présentent pas le même pouvoir de synthèse du polysaccharide ; en effet, à chaque instant la quantité de polysaccharide trouvé correspond à la

./.

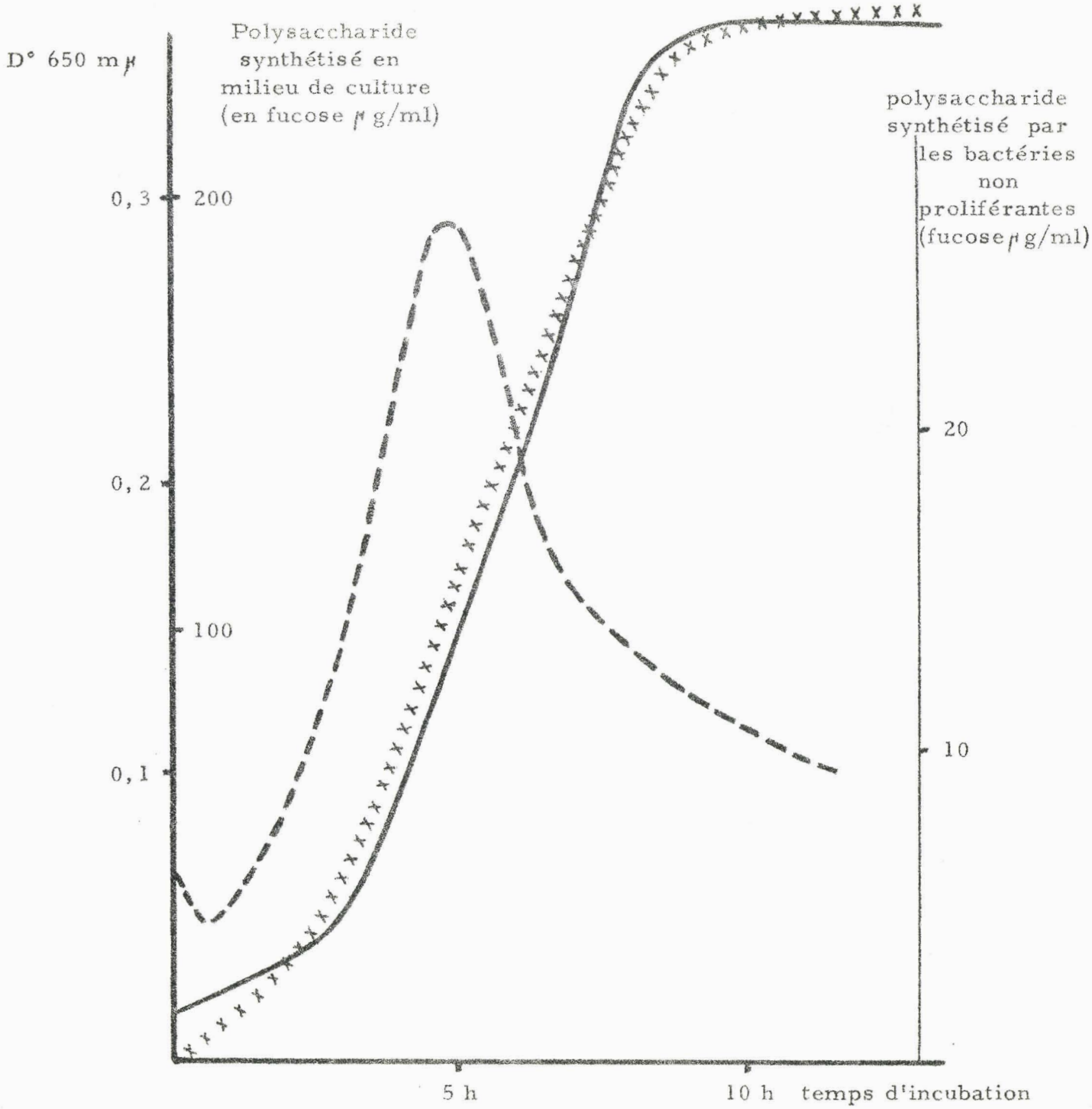


Figure 8

Synthèse du polysaccharide par la souche MH 21
en fonction de la croissance bactérienne
(——) courbe de croissance sur milieu MSB_1 agité à 30° C ;
les résultats sont donnés en densités optiques prises à 650 mμ
(XXX) polysaccharide synthétisé dans le milieu
(- - -) aptitude à synthétiser le polysaccharide en fonction du moment
du prélèvement des bactéries ; les résultats sont exprimés en μg
de fucose synthétisé en 4 h à 30° C par 1.10^8 cellules,
en milieu non proliférant

substance synthétisée par la population bactérienne, additionnée de celle accumulée depuis le début de la culture ; elle devrait donc augmenter plus rapidement que le nombre de cellules, ce qui n'est pas le cas. En particulier vers la fin de la phase exponentielle, la synthèse du polysaccharide cesse, alors que le nombre de cellules viables est considérable ; l'arrêt de la synthèse n'est pas provoqué par l'épuisement du glucose, ni par la baisse du pH, car l'addition de sucre à une culture en fin de croissance, ou sa neutralisation, ne modifie pas la quantité de polysaccharide formé. L'état physiologique de la cellule a donc une grande importance sur la synthèse de la substance muqueuse ; ceci nous a conduit à étudier les deux aspects du problème : en premier lieu les conditions influençant la synthèse chez les cellules capables de former le polysaccharide , ensuite les facteurs physiologiques pouvant modifier leur aptitude à effectuer cette synthèse.

D) FACTEURS INFLUENCANT LA SYNTHESE DU POLYSACCHARIDE PAR LES BACTERIES NON PROLIFERANTES.

1) Technique utilisée

L'étude de la formation du polysaccharide par les bactéries en culture, nous ayant montré que leur pouvoir de synthèse allait en diminuant lorsque le temps d'incubation augmentait, nous avons utilisé des germes en début de phase exponentielle de croissance ; une culture de 14 heures en milieu M S B_1 agité à 30°C,

est diluée dans le même milieu, de telle sorte qu'il contienne 2.10^7 bactéries par ml. Après deux heures d'agitation, les bactéries au nombre de 2.10^8 à 5.10^8 par ml sont centrifugées, lavées deux fois au moyen d'une solution de phosphate de potassium 0,15 M à pH 7,5, puis mises en suspension dans le milieu réactionnel ; celui-ci consiste, sauf mention contraire, en une solution de glucose à 0,5 p.cent dans du phosphate de potassium 0,15 M à pH 7,5, incubé à 30°C sous agitation constante.

Le nombre de bactéries utilisées et la durée d'incubation ont fait l'objet d'une étude préalable. Sur le tableau VIII, on constate que la synthèse du polysaccharide est sensiblement constante si le nombre de bactéries mises en réaction est compris entre $1,6 . 10^8$ et $5,8.10^8$, au dessus de cette valeur, la quantité de glucose du milieu réactionnel devient insuffisante. Pour les concentrations en cellules inférieures à 1.10^8, nous n'avons pu expliquer la diminution de l'activité de synthèse constamment observée.

Le tableau IX montre que la quantité de polysaccharide formé augmente en fonction du temps d'incubation, sans lui être absolument proportionnelle. Ces résultats permettent d'établir les modalités de l'expérimentation ; le nombre de bactéries mises en suspension non proliférantes sera toujours compris entre 2.10^8 et 5.10^8. La durée d'incubation n'a pas une influence capitale.

./.

Nombre de bactéries mises en suspension par ml	Polysaccharide synthétisé par 10^8 bactéries exprimé en µg de fucose
$1. \quad 10^9$	10,5
$5,8 . 10^8$	16,5
$3,8 . 10^8$	14,4
$1,6 . 10^8$	13,1
$9. \quad 10^7$	5,5

TABLEAU VIII

Influence sur la synthèse du polysaccharide, du nombre de bactéries non proliférantes mises en réaction

Souche M H21 cultivée sur M SB_1 à 30°C ; les bactéries sont prélevées au début de la phase exponentielle de croissance, centrifugées et lavées deux fois avec du phosphate de potassium 0,15 M ; elles sont mises en suspension, en nombre variable, dans une solution de glucose à 0,5 p.cent dans du phosphate de potassium 0,15 M à pH 7,5 ; la réaction est poursuivie durant 24 heures à 30° avec agitation constante

Durée de la réaction	Incubation à 30°C		Incubation à 37°C	
	Polysaccharide total synthétisé	Polysaccharide synthétisé en une heure	Polysaccharide total synthétisé	Polysaccharide synthétisé en une heure
1 heure	0	0	0	0
2 heures	2	1	1,2	0,6
4 heures	8,4	2,1	7,6	1,9
8 heures	11,2	1,4	12,8	1,6
19 heures	17,6	0,92		
24 heures	20,8	0,86		
44 heures	40	0,91		

TABLEAU IX

Synthèse du polysaccharide en fonction de la durée de la réaction. La quantité de polysaccharide est exprimée en µg de fucose formé par 10^8 cellules provenant de la souche MH 7 β cultivée sur M SB_1 à 30°C ; même procédé expérimental que celui décrit dans le tableau précédent

2) Facteurs pouvant influencer la synthèse :

Nous avons classé ces facteurs dans cet ordre : sources de carbone, facteurs physiques, facteurs chimiques. Il n'est pas possible d'étudier l'influence de l'addition au milieu réactionnel de substances azotées, cela nous ramenant dans des conditions de croissance.

a) Sources de carbone

Le glucose peut être remplacé par les différents sucres assimilables par E. coli, sans que l'on observe de modification dans la quantité de polysaccharide synthétisé. Le poids de glucose mis en jeu doit être supérieur au double du poids de polysaccharide devant être formé, pour que la source de carbone ne limite pas la synthèse.

b) Facteurs physiques

Nous avons vu que la température d'incubation conditionne la formation de la substance muqueuse par les bactéries en culture. Des essais semblables réalisés avec des bactéries non proliférantes (tableaux IX et X) montrent qu'à 41°C, les suspensions bactériennes synthétisent le polysaccharide à la même vitesse qu'à 30°C alors que les bactéries en culture à 41°C présentent un pouvoir de synthèse nul. Ceci n'est donc pas dû, chez les bactéries en croissance, à l'arrêt de la synthèse par l'élévation de température, mais au fait que, au cours de leur multiplication à 41°C, les cellules perdent le pouvoir de synthétiser la substance muqueuse.

./.

Durée de la réaction	Température d'incubation			
	30° (a)	37° (a)	37° (b)	41° (b)
2 heures	2,3	2,9	2,8	3,4
3 heures	3,7	3,2	3,4	3,5

TABLEAU X

Synthèse du polysaccharide en fonction de la température d'incubation de la réaction. Souche bactérienne : MH 21

Même légende que pour le tableau précédent. Les expériences ont été réalisées en deux séries (a) et (b)

Les variations de pH, dans les limites comprises entre 6,5 et 8,5 n'ont aucune influence sur la formation du polysaccharide par les bactéries non proliférantes. Lorsque la réaction est effectuée en anaérobiose stricte on assiste à l'arrêt total de la production du polysaccharide (tableau XI) par les bactéries non proliférantes, provenant d'une culture en aérobiose. On ne peut cependant attacher beaucoup d'importance à ce résultat, en effet, il peut s'agir d'un défaut d'adaptation aux conditions anaérobies provoquées par la croissance en aérobiose.

c) Facteurs chimiques.

Les sels minéraux en solution équilibrée ne modifient pas les quantités de produit synthétisé ; mais l'addition de sulfate de magnésium à la concentration de 0,2 p.100 a une action nettement inhibitrice ; on observe le même effet si l'on remplace le phosphate du tampon par une solution de trihydroxyméthylaminométhane de même pH.

L'étude de l'influence de la présence du polysaccharide sur sa propre synthèse est plus intéressante ; en effet, on pouvait penser que l'activité de synthèse des bactéries en culture serait inhibée par le produit final accumulé ; il n'en est rien, en présence de polysaccharide, sa synthèse semble plus importante qu'en son absence (voir tableau XIV). Ces résultats concordent avec le fait

./.

Culture en aerobiose		Culture en anaerobiose	
Réaction en :		Réaction en :	
anaerobiose	aerobiose	anaerobiose	aerobiose
0,8	20,4	10,8	14,4

TABLEAU XI

Influence sur la synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes, de l'oxygénation du milieu d'où elles proviennent . La souche MH 21 est cultivée sur milieu MS B_1 à 30°C, soit sous huile de paraffine, soit avec agitation constante. Les bactéries sont mises en suspension dans le milieu réactionnel en tubes scellés sous vide ou en tubes agités à 30°C durant 24 heures. Les résultats sont exprimés en µg de fucose produits par 10^8 bactéries

que le taux de synthèse des bactéries non proliférantes en fonction du temps d'incubation est sensiblement constant (tableau IX). Enfin, nous avons essayé l'action de certains inhibiteurs de la croissance bactérienne sur la synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes. La chlortétracycline et la streptomycine à la concentration de 50 µg par ml du milieu réactionnel diminuent de moitié la quantité de polysaccharide formée. Le chloramphénicol à la concentration de 20 µg par ml, mis en contact avec la suspension bactérienne une heure avant l'addition de la solution réactionnelle, arrête presque totalement la synthèse. Ce fait est intéressant à constater, le chloramphénicol n'étant pas habituellement considéré comme inhibiteur de la synthèse des polyosides.

E) ETUDE DE L'APTITUDE DES CELLULES A SYNTHETISER LE POLYSACCHARIDE.

En milieu de culture, le taux de synthèse de la substance muqueuse diminue à mesure que le nombre de bactéries augmente. Or, les différents facteurs du milieu de culture, que la croissance bactérienne modifie, n'influencent pas la production du polysaccharide par les bactéries non proliférantes. Il semble donc que le fait de se multiplier dans certaines conditions, rende les bactéries inaptes à effectuer la synthèse. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé les mutants M dans des conditions variables ; après

./.

lavage, les cellules sont incubées à 30°C avec agitation constante, dans le milieu réactionnel habituel, composé de glucose en solution dans le tampon phosphate.

En suivant ce protocole expérimental, nous avons d'abord étudié les bactéries prélevées à différents moments de leur croissance en milieu M S B_1 à 30°C avec agitation, puis les cellules obtenues sur ce même milieu incubé dans des conditions diverses, enfin celles cultivées sur des milieux et à des températures différentes.

1) Influence de la phase croissante des bactéries.

Le moment auquel les bactéries sont prélevées du milieu de culture conditionne leur pouvoir de synthèse. Sur le tableau XII, on constate que les bactéries non proliférantes prélevées en début de culture sur milieu M S B_1, forment des quantités importantes de polysaccharide alors que si elles sont prélevées deux générations plus tard, leur aptitude à la synthèse a nettement diminué. La comparaison des nombres de la 3ème colonne (polysaccharide synthétisé par les bactéries non proliférantes) avec ceux de la 2ème (synthèse dans le milieu de culture) suggère que la substance muqueuse pourrait empêcher la formation de sa propre voie de synthèse ; cette hypothèse sera examinée plus loin.

Sur la figure 8 , sont rassemblées les courbes exprimant la croissance exponentielle de la souche MH 21, la

./.

Souches mutantes	Nombre de bactéries par ml du milieu de croissance au moment du prélèvement	Polysaccharide synthétisé en culture par ml de milieu	Polysaccharide synthétisé par 10^8 cellules non proliférantes
MH 11	4,2 10^8	1	12,4
	1,7 10^9	139	0
MH 21	2,8 10^8	6	28
	1,4 10^9	223	6,8
MG 6	3,5 10^8	30	10,4
	1,3 10^9	227	4,8

TABLEAU XII

Synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes, en fonction du moment de prélèvement de ces bactéries. Les résultats concernant le polysaccharide sont exprimés en µg de fucose. Les bactéries sont prélevées à deux moments de leur croissance en milieu MSB_1 à 30°C, le dosage du polysaccharide est fait sur une partie aliquote du milieu (2ème colonne) ; les bactéries sont mises en suspension dans le milieu réactionnel glucose-phosphate et agitées durant 20 heures à 30°C ; la quantité de polysaccharide synthétisé est notée dans la 3ème colonne

cinétique de la formation du polysaccharide en culture, et le pouvoir de synthèse des bactéries non proliférantes en fonction du moment de leur prélèvement. On constate que la capacité de synthèse des cellules augmente considérablement à la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance ; puis elle diminue alors que les bactéries sont encore en phase active de division. Il est vraisemblable que ce changement dans l'état physiologique des cellules, corresponde à des modifications du milieu provoquées par la culture elle-même.

2) Facteurs variables du milieu de culture

a) pH : Le tableau XIII montre l'influence du pH des milieux de croissance sur la synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes en provenant ; cette influence est faible, on note seulement une diminution d'activité des bactéries cultivées à pH inférieur à 6,5 ; ceci n'explique pas les variations du pouvoir de synthèse, au début de la phase exponentielle de croissance durant laquelle le pH passe de 7,4 à 6,8.

b) oxygénation : durant la culture bactérienne, la quantité d'oxygène dont dispose chaque cellule va en diminuant quand leur nombre augmente. Or, même après culture en anaérobiose stricte (tableau XI), les bactéries restent capables de faire la synthèse du polysaccharide ; ce facteur ne parait

./.

pH du milieu de culture	Polysaccharide synthétisé en culture par ml de milieu	Polysaccharide synthétisé par 10^8 cellules non proliférantes
6	9,1	13,2
6,5	10,3	18
7	8,7	16
7,5	10,8	22,2
8	11	20,8

TABLEAU XIII

Synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes en fonction du pH du milieu où elles se sont développées. Les résultats sont exprimés en µg de fucose. La souche bactérienne employée est la souche MH 21. Les bactéries sont prélevées lorsque leur nombre atteint 5. 10^8 par ml dans le milieu MSB_1 ajusté aux différents pH ; elles sont ensuite mises en suspension dans le milieu réactionnel durant 24 heures à 30°C, avec agitation constante

donc pas en cause.

c) Substance muqueuse : Celle-ci est produite dans le milieu dès que les bactéries y sont introduites et il nous semble que c'est le seul facteur chimique subissant une modification importante durant la phase de latence (sa concentration varie de zéro à 100 µg exprimés en fucose par ml).

Les résultats du tableau XIV montrent que les bactéries cultivées en présence du polysaccharide présentent un pouvoir de synthèse fortement diminuée. La substance muqueuse se comporte donc comme un inhibiteur de la formation de ses propres systèmes de synthèse. Cependant, l'activité des cellules n'étant pas totalement abolie, on peut penser que la taille de la molécule polysaccharidique est trop importante pour qu'elle puisse pénétrer convenablement dans la cellule et remplir son rôle de represseur. Il faut remarquer à ce sujet qu'en aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence une destruction ou une utilisation du polysaccharide par nos souches sauvages ou muqueuses d'*E. coli*.

3) Après avoir étudié les facteurs pouvant varier dans le milieu MS B_1 au cours de la croissance bactérienne à 30 °C, nous allons envisager les changements dans la température d'incubation et dans la nature du milieu, facteurs conditionnant la formation du polysaccharide en culture.

Sur le tableau XV, on constate que les bactéries provenant de cultures réalisées dans des conditions telles qu'il n'y a pas

./.

Souches bactériennes	CULTURE : sans polysaccharide		en présence de polysaccharide	
	réaction sans polysaccharide	réaction en présence de polysaccharide	réaction sans polysaccharide	réaction en présence de polysaccharide
MH 7 γ	8	8,6	3,8	5,4
MH 21	5	8,6	2,7	4,2

TABLEAU XIV

Influence sur la synthèse du polysaccharide, par les bactéries non proliférantes, de la présence du polysaccharide dans le milieu où elles ont été cultivées. Culture sur milieu MSB_1 agité à 30°C, en présence de polysaccharide (200 µg par ml exprimés en fucose), puis suspension dans le milieu réactionnel en présence de la même concentration en polysaccharide, durant 2 heures à 30°C. Les résultats sont exprimés en µg de fucose produits par 10^8 cellules

Milieu de culture	Température d'incubation du milieu de croissance			
	40°	37°	30°	25°
BPG	0	0	0	0
MSC	0	0	3,7	5,3
M SB_1	0	5,1	19,3	18,6

TABLEAU XV

Synthèse du polysaccharide par les bactéries non proliférantes en fonction de la nature du milieu de croissance d'où elles proviennent et de la température d'incubation. La souche MH21 a été cultivée à diverses températures et sur différents milieux ; les cellules ont été mises en suspension dans le milieu réactionnel à 30°C durant 20 heures, avec agitation constante ; les résultats sont exprimés en μg de fucose formés par 10^8 cellules

de formation de substance muqueuse, (cf. tableau VI) sont incapables d'en faire ultérieurement la synthèse quand elles sont mises en suspension dans le milieu réactionnel habituel. Les bactéries cultivées à plus de 37°C ou sur des milieux riches n'ont donc pas formé un ou plusieurs des systèmes enzymatiques nécessaires à la synthèse du polysaccharide ; en effet, ces cellules, mises en suspension dans le milieu réactionnel privé de source d'azote, ne peuvent effectuer la réaction même si les conditions sont devenues favorables à la synthèse. Nous avons contrôlé cette hypothèse par l'expérience décrite dans le tableau XVI : des bactéries provenant de milieux différents sont agitées à 30°C dans le milieu habituel, ou dans ce milieu additionné soit de chlorure d'ammonium, soit du mélange d'acides aminés entrant dans la composition du milieu MSC ; les bactéries provenant d'une culture sur milieu BPG à 37°C produisent le polysaccharide seulement en présence de chlorure d'ammonium, qui rend possible la synthèse de protéines enzymatiques ; cependant l'absence d'activité des bactéries en milieu contenant le mélange d'acides aminés (en concentrations faibles) indique que la formation des systèmes enzymatiques responsables de la synthèse du polysaccharide n'est pas immédiate comme c'est le cas pour la synthèse des enzymes adaptatifs en présence de leur inducteur. Les expériences réalisées sur les bactéries cultivées à 30°C, donnent des résultats senblables, mais on observe en présence de la solution d'acides aminés une augmentation importante du pouvoir de synthèse chez les germes possédant déjà un système enzymatique actif.

Cultures sur :	Milieu réactionnel	Polysaccharide formé exprimé en µg de fucose par 10^8 cellules
BPG à 37°C	normal " + acide aminé " + Cl NH_4	0 0 4,4
BPG à 30°C	normal " + acide aminé " + Cl NH_4	2,6 14,3 17,8
M SB_1 à 30°C	normal " + acide aminé " + Cl NH_4	8,6 21,8 37,1

TABLEAU XVI

Synthèse du polysaccharide par les bactéries, en présence de diverses sources d'azote. La souche MG_5 a été cultivée sur les différents milieux décrits dans la 1ère colonne. Les cellules ont été mises en suspension dans le milieu réactionnel habituel, ou additionné soit d'un mélange d'acides aminés (cf. milieu M S C), soit de chlorure d'ammonium à 0,2 p. cent, et incubées à 30°C durant 20 heures avec agitation constante

DISCUSSION

Chez les bactéries en culture, trois facteurs conditionnent la formation de la substance muqueuse : la température d'incubation, la nature du milieu et l'état de croissance de la population bactérienne. On pouvait penser que la réaction de synthèse était inhibée par l'élévation de température, par la richesse du milieu en substances azotées, ou encore par la présence des produits du métabolisme de la bactérie ; en faisant varier chacun de ces facteurs, on constate qu'aucun d'entre eux n'influence la production du polysaccharide par les bactéries non proliférantes. L'absence de substance muqueuse dans les cultures réalisées dans certaines conditions, provient de l'incapacité des cellules cultivées dans ces conditions, d'élaborer les systèmes de synthèse du polysaccharide ; les trois principaux facteurs agissant sur la formation de la voie de synthèse sont les suivants : le rapport des oses du milieu et des éléments azotés, la température d'incubation et la présence du polysaccharide. Les deux premiers facteurs semblent liés et pourraient réagir sur le métabolisme global de la cellule. SENEZ (149) a montré qu'entre 37° et 42°C, le taux de croissance d'Aérobacter aérogènes diminue très rapidement tandis que l'activité catabolique n'est pas modifiée, ce qui correspond à un découplage énergétique ; la formation de la voie de synthèse du

./.

polysaccharide pourrait être provoquée par un déséquilibre entre le catabolisme des glucides et la synthèse protidique, influencé par la température d'incubation et la nature du milieu. Quant à l'action du polysaccharide lui-même, on doit supposer qu'il réprime son propre système de synthèse.

V - RESISTANCE DES MUTANTS MUQUEUX A L'AGENT INDUCTEUR

Nous avons vu que le procédé original d'obtention des mutants M. consiste à cultiver le germe sauvage sous forme de sphéroplastes en présence de pénicilline, de glycocolle ou de D histidine.

Les résultats positifs constants donnés par cette méthode, en ce qui concerne la souche Hfr C, suggèrent l'hypothèse qu'il y a sélection des cellules muqueuses lors de leur croissance sous forme de sphéroplastes. RYAN et coll (137) ont signalé la fréquence des mutations spontanées chez les formes sphériques d'E.coli, mais il est difficile d'admettre qu'il puisse s'agir ici d'un tel phénomène ; ainsi la proportion de mutants, non exigeants pour la vitamine B 1, isolés parmi les colonies réversées est très faible, du même ordre de grandeur que celle obtenue directement à partir du germe sauvage, tandis que celle des mutants M peut être proche de 100 p. cent. Les mutants M, dont l'obtention est peut être favorisée par la transformation en formes sphériques, ou par l'action directe des substances inductrices, sont donc sélectionnés au cours des subcultures sous forme de sphéroplastes. La sélection porte, soit sur les cellules capables de former des colonies, soit sur celles pouvant survivre dans ces conditions. L'étude du comportement des mutants M vis-à-vis des agents inducteurs, comprendra d'abord l'examen de leur aptitude à se multiplier sous forme de sphéroplastes, ensuite la détermination de leur

résistance aux substances inductrices ; enfin, nous discuterons les divers résultats.

A) APTITUDE A CULTIVER SOUS FORME DE SPHEROPLASTES

Les déterminations sont effectuées de la manière suivante: les bactéries provenant d'une culture de 18 heures sur milieu B P G solide incubé à 37°C, sont mises en suspension à des dilutions variables dans 10 ml du milieu d'induction réparti en tube de 16 x 160 mm, maintenu liquide à 48°C (milieu B P G saccharosé à 10 p. cent, additionné de 0,2 p. cent de sulfate de magnésium et de 1.000 unités par ml de pénicilline ou de 3 p. cent de glycocolle). Les milieux sont incubés à différentes températures et les colonies dénombrées après 2, 4 et 6 jours. Quatre concentrations bactériennes, sont généralement réalisées à chaque expérience, correspondant à 5.10^7, 1.10^6, 2.10^4 et 4.10^2 cellules dans les 10 ml du milieu d'induction. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules bactériennes devant être ensemencées pour obtenir une colonie de sphéroplastes, ce que nous appelons $\frac{1}{\tau}$. τ est le taux de cellules cultivables $= \frac{\text{nombre de colonies obtenues}}{\text{nombre de germes ensemencés}}$.

1) Souche sauvage Hfr C

Au cours de déterminations systématiques, nous avons constaté des variations importantes dans le taux des cellules cultivables en présence de pénicilline ou de glycocolle. A partir de bactéries entretenues par repiquage en masse, $\frac{1}{\tau}$ évalué à 37°C varie de 5.10^3 à plus

de $1,10^8$, toutes les conditions de cultures étant identiques, tout au moins celles que nous pouvons apprécier. L'étude de colonies isolées à partir de cultures en masse montre que la population initiale n'est pas homogène vis-à-vis de ce test ; ce fait est mis en évidence sur le tableau XVII où nous avons fait figurer les valeurs de $\frac{1}{\tau}$ de bactéries provenant de colonies différentes de Hfr C. Dans la population initiale, les colonies de type 1 et 3 sont très abondantes, les types 2 et 4 rares. Par repiquages successifs en masse, ces clones conservent quelques temps leurs propriété respectives, puis donnent naissance au mélange primitif. Aucun artifice de culture ne nous a permis de sélectionner l'un ou l'autre de ces types ; cependant tous conduisent à l'isolement des mutants M par subcultures sous forme de sphéroplastes. On remarque l'influence capitale de la température d'incubation sur le taux des cellules cultivables : dans tous les cas $\frac{1}{\tau}$ diminue fortement avec la température.

2) Mutants M

Le tableau XVII indique l'aptitude de divers mutants M à se multiplier sous forme de sphéroplastes ; l'influence de la température d'incubation est plus marquée encore que pour la souche sauvage (tableau XVIII) ; ceci suggère que la production de substance muqueuse à 25°C pourrait permettre à la plupart des cellules de donner naissance à une colonie de sphéroplastes.

La comparaison de ces résultats avec ceux décrits pour la souche sauvage est difficile à établir. En effet, chaque type de la souche sauvage conduisant après repiquages répétés au mélange initial,

Souches bactériennes	BPG pénicilline 1.000 U par ml			BPG glycocolle 3 p. cent		
	25°C	37°C	41°C	25°C	37°C	41°C
H fr C1	$1,6.10^6$	$>5.10^7$	$>5.10^7$	$1,2.10^6$	$>5.10^7$	$>5.10^7$
H fr C2	2.10^5	$1,6.10^6$	$>5.10^7$	1.10^5	4.10^6	$>5.10^7$
H fr C3	4.10^1	1.10^3	2.10^5	6.10^1	$>5.10^7$	$>5.10^7$
H fr C4	$1,6.10^1$	5.10^1	1.10^7	5.10^2	1.10^5	$>5.10^7$
MH 7 β	$2,5.10^1$	1.10^5	$>1.10^7$	1.	2.10^4	5.10^4
MH 21	3.	4.	1.10^6	3.	2.	$>1.10^7$
MP 17	1.	2.10^4	$>1.10^7$	1.	1.10^5	$>1.10^7$
MG 6	2.	2,5	4.10^2	1,3	4.	2.10^4
H fr C reversé(1)	4.10^4	2.10^7	$>5.10^7$	1.10^4	1.10^7	$>5.10^7$
H fr C reversé(2)	5.10^1	1.10^4	$>5.10^7$	1.10^2	5.10^6	$>5.10^7$

TABLEAU XVII

Nombre de cellules devant être ensemencées pour obtenir une colonie de sphéroplastes (1) selon la température d'incubation du milieu d'induction et de l'origine des souches bactériennes

Température d'incubation	Pénicilline 1.000 U par ml	Glycocolle 3 p. cent
40°5 C	$> 10^7$	$> 10^7$
39° C	$> 10^7$	4.10^1
37° C	1.10^2	2.10^1
36° C	2.10^1	2,2
34°5 C	1,6	1,6
32°	2,2	2,2
30°	2,2	1,6

TABLEAU XVIII

Nombre de cellules de la souche MH 70 devant être ensemencées pour obtenir une colonies de sphéroplastes (1) en fonction de la température d'incubation

il est illusoire de comparer le taux de cellules cultivables du clone sauvage avec celui du mutant M qui est isolé après subculture sous forme de sphéroplastes. On peut cependant observer que pour les mutants M, les valeurs $\frac{1}{\tau}$ sont en général très inférieures à celles obtenues pour les divers clones de la souche sauvage.

Nous avons ajouté à la liste des mutants M, deux souches non muqueuses, provenant d'une réversion après 8 subcultures sous forme de sphéroplastes-glycocolle ; ces deux souches présentent un taux de cellules cultivables du même ordre de grandeur que celui des clones sauvages.

La variabilité de l'aptitude à cultiver, sous forme de sphéroplaste, selon les souches bactériennes, nous a amenés à étudier l'action de différents facteurs sur cette culture.

3) Facteurs influençant la culture des sphéroplastes

La température d'incubation conditionne la valeur de τ. Le tableau XVIII montre que $\frac{1}{\tau}$ diminue entre 39 et 36 °C pour rester stable ensuite au-dessous de 36 °C. Il est intéressant de comparer ce changement brutal de propriété avec celui constaté lors de l'étude de la synthèse de la substance muqueuse en fonction de la température (figure 7). Si ces deux propriétés ne sont pas dépendantes, elles sont tout au moins sous l'influence d'un facteur commun, sans doute lié à l'état métabolique de la cellule.

La nature du milieu d'incubation nous a paru intéressante à étudier, car d'une part, LEDERBERG (97) et LANDMAN (91) observent que chaque cellule d'E. coli peut former une colonie de sphéroplastes,

d'autre part, on peut se demander si la plus grande aptitude des mutants muqueux à se multiplier sous forme de sphéroplaste n'est pas due à une composition favorable du milieu.

Sur le tableau XIX, nous avons comparé les taux des bactéries cultivables en présence de pénicilline sur le milieu décrit par LEDERBERG et le milieu BPG. Ce dernier se montre le plus favorable à l'obtention de colonies de sphéroplastes. On doit donc penser que LEDERBERG a utilisé une souche dont le rapport $\frac{1}{\tau}$ est très faible.

L'influence des divers composants du milieu d'induction est résumé dans les tableaux XX et XXI ; le sulfate de magnésium est indispensable à la culture des sphéroplastes des souches Hfr/C et MH7β, mais la souche muqueuse est nettement moins sensible à 25°C en l'absence de saccharose que la souche sauvage ; cela semble correspondre à la propriété que possède la souche M de synthétiser un polysaccharide capable de remplacer le diholoside. Quant aux composants du milieu, seule la peptone a une influence prépondérante sur la culture des sphéroplastes. Si la peptone est remplacée par une solution d'acides aminés, dont la concentration en chaque acide aminé est suffisante pour assurer la croissance d'une souche exigeante pour ces substrats, on n'observe aucune élévation de la valeur de τ . La peptone ne contrebalance donc pas une exigence en source d'azote mais se comporte plutôt comme un détoxifiant du milieu, de la même façon que les protéines sériques.

Cette étude de la faculté de se multiplier sous forme de sphéroplaste en fonction des différents facteurs culturaux, n'a pas

Souches bactériennes	Température d'incubation	Milieu coulé en boîte de Pétri Milieu Lederberg B P G		Milieu en profondeur Milieu Lederberg B P G	
MH 7 β	25° C	$>2\text{-}10^3$	6	$>2\text{-}10^3$	3
	37° C	$>2\text{-}10^3$	$1\text{-}10^2$	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$
Hfr C	25° C	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$	$5\text{-}10^2$
	37° C	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$	$>2\text{-}10^3$

TABLEAU XIX

Valeurs τ obtenues sur milieux de Lederberg (97) et B P G gélosé à 1 p. cent (additionné de 10 p. cent de saccharose et 0,2 p. cent de sulfate de magnésium), en présence de 1.000 unités par ml de pénicilline

Milieu BPG		MH 7β				II fr C			
+	+	25°C		37°C		25°C		37°C	
Saccharose	$SO_4Mg\ 7\ H_2O$	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle
10 p. cent	0,2 p. cent	5	2.10^1	$1,6.10^1$	$1,6.10^3$	6.10^6	$2,5.10^3$	1.10^6	$>1.10^8$
5 p. cent	0,2 p. cent	5.10^1	1.10^1	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>1.10^8$	1.10^4	$>1.10^8$	5.10^7
0	0,2 p. cent	5.10^2	$2,5.10^1$	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$
10 p. cent	0	$2,5.10^2$	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$
0	0	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>5.10^4$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$	$>1.10^8$

TABLEAU XX

Influence du saccharose et du sulfate de magnésium sur la croissance sous forme de sphéroplastes. Les nombres correspondent au rapport $\frac{1}{5}$

Milieux gélosés à 1 p. cent Saccharose 10 p. cent SO_4Mg, 7 H_2O 0,2 p. cent	MH 7 γ				H fr C			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle	péni-cilline	glyco-colle
M S B_1	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$
M S B_1+ acides aminés (MSC)	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$
M S B_1+ peptones 0,5 p. cent	5.10^1	5.10^1	2.10^4	$2,5.10^2$	2.10^4	2.10^6	$>2.10^7$	$>2.10^7$
M S B_1+ extrait levure 0,5 p. cent	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$	$>2.10^7$
M S B_1+ peptones + extrait levure	$2,5.10^1$	1.10^2	5.10^2	6.10^3	$2,5.10^3$	5.10^5	$>2.10^7$	1.10^7
B P G	2.10^1	1.10^1	1.10^2	$2,5.10^3$	5.10^3	1.10^4	2.10^5	1.10^7

TABLEAU XXI

Influence des composants du milieu B P G additionnés au milieu MSB_1 sur la croissance sous forme de sphéroplastes

Les nombres correspondent au rapport $\frac{1}{\tau}$

permis de mettre en évidence de différences sensibles entre le comportement des mutants M et celui des souches sauvages. Seul, l'effet du saccharose est moins marqué sur la croissance des germes muqueux que sur celle de la souche Hfr C, ce qui était prévisible. La valeur généralement peu élevée du rapport $\frac{1}{\tau}$ des mutants M n'est pas due à des exigences nutritionnelles plus faibles que celles de la souche sauvage pour se multiplier sous forme de sphéroplastes, ceci est en faveur d'une influence directe de la synthèse du polysaccharide sur l'aptitude des bactéries à se développer dans le milieu d'induction.

B) RESISTANCE A L'AGENT INDUCTEUR

Nous n'avons pu mettre au point une méthode de détermination de la survie des sphéroplastes en présence de l'agent inducteur dans nos conditions expérimentales. En effet, la transformation en sphéroplastes viables n'est possible qu'en milieu fortement gélosé (1 p. cent), rendant impraticable toute numération par dilution, celle-ci étant faussée, par ailleurs, par la division des sphéroplastes dans ces milieux.

Nous avons tenté de dénombrer les cellules viables contenues dans une colonie après des temps d'incubation variables en milieu d'induction ; la colonie prélevée étant traitée dans l'agitateur de Mikle en présence de 5ml d'une solution de saccharose à 10 p. cent et de 2 g de billes de polystirène durant 2 minutes (un temps d'agitation plus bref laisse des cellules en amas) ; or, les numérations effectuées sur les homogénats de colonies provenant de la même culture donnent des résultats

contradictoires, dûs sans doute à la destruction des sphéroplastes au moment de leur mise en suspension.

Nous avons donc employé une technique permettant d'apprécier, de façon approximative, le degré de résistance à l'agent inducteur dans des conditions différentes de celles de la culture des sphéroplastes. La méthode consiste à mettre des bactéries provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance, en suspension dans 1 ml de milieu M S B_1 gélosé à 0,2 p. cent, privé de source d'azote et contenant la substance inductrice ; l'absence de chlorure d'ammonium empêche la division des bactéries et la faible concentration en gélose permet d'effectuer les dilutions nécessaires aux numérations. Après différents temps d'incubation, on ajoute 4ml de solution de saccharose à 10 p. cent et on agite 1 minute sur agitateur mécanique ; les cellules viables de la suspension sont ensuite dénombrées par étalement sur milieu gélosé. Le tableau XXII donne des résultats d'une telle expérience ; on constate qu'une proportion importante des cellules M survivent à 25°C en présence d'inducteur, alors qu'il n'y a pratiquement plus d'éléments viables dans la suspension de la souche sauvage, après 6 heures d'incubation ; à l'examen microscopique, on constate qu'une proportion faible de cellules est en voie de transformation. Ces résultats permettent d'affirmer que les mutants M présentent une résistance nette aux agents inducteurs à basse température, mais il s'agit de bactéries en début de transformation et non de sphéroplastes.

./.

Temps d'incubation	M H7β				Hfr C			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	pénicilline	glycocolle	pénicilline	glycocolle	pénicilline	glycocolle	pénicilline	glycocolle
0	1.10^6	$9,2.10^5$	1.10^6	$8,6.10^5$	3.10^5	$3,4.10^5$	3.10^5	$3,2.10^5$
3 heures	1.10^4	$8\ .10^4$	$< 1.10^3$	$1\ .10^4$	$< 1.10^3$	$1\ .10^4$	$< 1.10^3$	$< 1\ .10^3$
6 heures	5.10^3	$4,5.10^4$	$< 1.10^3$	$< 1\ .10^3$	$< 1.10^3$	$< 1\ .10^3$	$< 1.10^3$	$< 1\ .10^3$
22 heures	$2,6.10^2$	$4,3.10^2$	$< 1.10^1$	$< 1\ .10^1$	$< 1.10^1$	$< 1\ .10^1$	$< 1.10^1$	$< 1\ .10^1$

TABLEAU XXII

Temps de survie des cellules bactériennes en milieu M SB_1 privé d'azote, gélosé à 0,2 p.cent, additionné de saccharose (10 p.cent) de sulfate de magnésium (0,2 p.cent) et de l'agent inducteur (pénicilline 1.000 unités par ml ou glycocolle 3 p.cent). Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries survivantes

C) DISCUSSION

Il nous faut reprendre maintenant les résultats de notre expérimentation sur la résistance aux agents inducteurs ; en effet au terme de cette étude, un certain nombre de faits apparemment discordants rendent nécessaires la discussion de deux problèmes :

Les mutants muqueux présentent-ils une résistance plus grande que la souche sauvage, à l'agent inducteur ? Par ailleurs, quel est le rôle de la synthèse du polysaccharide dans la résistance ?

A la première question, il est possible de répondre par toute une série d'arguments positifs : la sélection réalisée au moyen des substances inductrices doit logiquement conduire à des clones moins sensibles que la souche sauvage à l'action toxique de ces substances. On constate expérimentalement que tous les mutants M isolés de cette façon présentent un taux élevé de cellules capables de se multiplier sous forme de sphéroplastes ; par contre, les bactéries non muqueuses, provenant de la réversion d'un milieu d'induction, et dont la proportion diminue au cours des subcultures (tableau III), gardent un taux de culture faible. De plus, il ne fait aucun doute que les mutants M restent viables, en présence des substances antibactériennes, durant une période de temps nettement plus longue que les souches sauvages. Cependant, il faut remarquer que quelques clones de la souche HfrC présentent un rapport $\frac{1}{T}$ plus faible que celui de certains mutants M (tableau XVII) et ceci à 37°C, température à laquelle est réalisée la sélection de ces mutants. Par ailleurs, nous

./.

avons comparé les valeurs de τ données par des recombinants muqueux obtenus par conjugaison d'une souche muqueuse Hfr et d'une souche sauvage F^- (tableau XXIII) on constate que le taux de culture des recombinants est intermédiaire de celui des souches parentales. Alors que tous les mutants M isolés après réversion présentent une résistance certaine à l'agent inducteur, la transmission du caractère muqueux par conjugaison n'est pas accompagnée du transfert du même degré de résistance que celui de la souche donatrice muqueuse ; il est vrai que les recombinants muqueux étudiés présentent des exigences nutritionnelles que ne possède pas la souche Hfr, cela peut expliquer leur aptitude moins grande à se multiplier en milieu d'induction.

On peut se demander alors si la résistance est directement liée à la synthèse du polysaccharide. Les variations, en fonction de la température d'incubation, du taux de culture τ des mutants M, plaident en faveur de cette hypothèse. Dans le tableau XXIV, nous avons comparé les valeurs de τ obtenues à différentes températures avec les quantités de polysaccharide synthétisé en milieu de culture ; on note un remarquable parallélisme entre les résultats trouvés pour chaque température ; les propriétés de se multiplier dans le milieu d'induction et de synthétiser le polysaccharide, si elles ne sont pas liées, correspondent sans doute à une modification de métabolisme provoquée par l'abaissement de la température d'incubation. Quant à la survie des mutants M en milieu gélosé non nutritif, elle semble être la conséquence directe de la synthèse à 25°C de substance

Souches bactériennes	Caractères des recombinants	25°C		37°C	
		Péni-cilline	Glyco-colle	Péni-cilline	Glyco-colle
MH 21		2	9.10^1	5	1.10^2
2.000 X 17 K		1.10^3	$>2.10^7$	1.10^5	$>2.10^7$
MH 21 2.000 X 17 K	M Lac⁻	4.10^2	$>2.10^7$	1.10^4	$>2.10^7$
MH 21 2.000 X 17 K	M T-L⁻	2.10^1	$>2.10^7$	2.10^7	$>2.10^7$
MH 21 2.000 X 17 K	M Arg⁻	$3{,}3.10^1$	2.10^1	2.10^2	$>2.10^7$

TABLEAU XXIII

Comparaison des valeurs $\frac{1}{\tau}$ en milieu d'induction trouvées pour différents recombinants muqueux. Souche donatrice : MH 21 (muqueuse)

Souche réceptrice 2.000 X 17 K

(non muqueuse)

1 b

température d'incubation	$\mathcal{T}$ x 100 (pénicilline 1.000 U/ml)	Polysaccharide synthétisé en µg de fucose par 10^8 bactéries
25° C	50	13,5
30° C	43	11,6
37° C	12,5	4,4
38° C	4	2,1
39° C	2	1,6
42° C	2	1,7

TABLEAU XXIV

Comparaison en fonction de la température d'incubation du taux des bactéries cultivables sous forme de sphéroplastes ($\mathcal{T}$) en milieu BPG additionné de pénicilline, et de la synthèse du polysaccharide en milieu liquide MSB1, durant un temps d'incubation tel que la culture contienne 10^8 cellules par ml

Souche M G6

muqueuse, celle-ci ayant un effet protecteur considérable sur les sphéroplastes. On peut objecter que la sélection des mutants M et la mesure du taux de culture $\mathcal{T}$ sont faites en milieu B P G et à 37°C, conditions dans lesquelles les mutants M ne synthétisent pas de polysaccharide. Or, une souche sauvage ensemencée à la surface d'un milieu B P G gélosé renfermant un acide aminé à une concentration sous inductrice, donne après incubation à 37°C, des colonies muqueuses, dont la plupart retrouvent leur aspect normal après repiquage sur milieu ordinaire (cf. mode d'obtention des mutants M) ; la substance muqueuse synthétisée par ces colonies est de même nature que celle produite par les mutants M. Il est évidemment impossible de déterminer si les colonies de sphéroplastes, cultivées au sein du milieu d'induction gélosé produisent elles aussi le polysaccharide. Mais nous avons pu mettre en évidence la synthèse de cette substance par les sphéroplastes de la souche Hfr C, mis en suspension en milieu nutritif liquide contenant 3 p. cent de glycocolle ou 1.000 unités par ml de pénicilline ; la quantité de polysaccharide formé est faible, de l'ordre du dixième de celle produite dans les mêmes conditions par le mutant M (une étude systématique du phénomène n'a pu être réalisée, à cause des difficultés de dosage précis du polysaccharide dans ce milieu). On est en droit de penser, par analogie, que la souche sauvage Hfr C synthétise la substance muqueuse par culture en milieu d'induction même à 37°C ; il n'existerait alors entre les sphéroplastes de la souche sauvage et des mutants M, que des différences quantitatives dans leur propriété de synthétiser le mucus. Cela permet de comprendre

l'effet, semblable pour toutes les souches, de l'abaissement de la température sur la valeur de τ. Par ailleurs, nous avons vu que l'état initial de la cellule conditionne son aptitude à synthétiser le polysaccharide ; les mutants M, dès leur introduction dans le milieu d'induction, sont donc capables de produire des quantités importantes de substance muqueuse, leur permettant de survivre ; par contre, la souche sauvage doit élaborer son système de synthèse dans des conditions de croissance défavorables.

En conclusion, les mutants muqueux isolés après réversion de cultures sous forme de sphéroplastes, présentent une résistance certaine aux substances antibactériennes agissant au niveau de la paroi et il semble établi que cette résistance est liée à la synthèse du polysaccharide.

CHAPITRE II

MODE D'ACTION DES HISTONES SUR LES BACTERIES A GRAM NEGATIF. COMPARAISON AVEC CELUI D'AUTRES COMPOSES ANTIMICROBIENS BASIQUES.

METCHNIKOFF (105) avait pensé dès 1892 à l'influence de composés présentant un caractère basique dans les processus de défense de l'organisme. Ces substances ont, par la suite, éveillé l'intérêt des bactériologistes par ce qu'elles ont de commun avec les antibiotiques, c'est-à-dire leur action antibactérienne générale à très faible concentration ; par ailleurs, si certaines d'entre elles comme le lysozyme possèdent une activité enzymatique particulière pouvant expliquer leur pouvoir bactéricide, la plupart sont des molécules protidiques banales dont le seul caractère particulier est leur basicité. Ceci nous a conduit à vouloir préciser leur mode d'action sur les bactéries ; il fallait pour cela choisir parmi les différents peptides antibactériens d'origine animale, une fraction suffisamment bien définie pour que nos expériences soient reproductibles ; la fraction riche en arginine des histones extraitesde thymus de veau répond à cette condition ; en effet SAUTIERE (143) a fait une étude précise du fractionnement des histones dont nous avons pu profiter, et un travail de BISERTE, TACQUET, LECLERC et SAUTIERE (8) était consacré à l'activité bactéricide des diverses fractions.

Les nombreuses recherches traitant de l'action des histones sur les bactéries, si elles conduisent à certains résultats indiscutables quant au pouvoir bactéricide et agglutinant du peptide et à ses inhibiteurs, sont par contre nettement discordantes lorsqu'il s'agit de l'étude du mode de cette action bactéricide.

./.

POUVOIR BACTERICIDE

Après KOSSEL (87) en 1898, l'étude des composés basiques présentant une activité antibactérienne est reprise par Mac CLEAN (99) ; celui-ci cite l'action inhibitrice de ces corps sur la croissance de Salmonella typhi. En 1942, NUTINI et coll. (120) isolent des protéines actives "in vitro" et la même année MILLER et coll. (107) montrent que les protamines et les histones possèdent une activité bactéricide sur Salmonella typhi, Escherichia coli, Streptococcus A et Pneumococcus I, mais ne constatent aucune action même bactériostatique sur Proteus vulgaris. Dans une étude très complète, HIRSCH (66) dissocie les histones en une fraction riche en lysine, inactive quelle que soit l'espèce bactérienne, et une autre fraction riche en arginine, active sur Klebsiella pneumoniae et Staphylococcus albus, mais inactive sur Proteus morganii et Staphylococcus aureus. Pour FISCHER et BRANDIS (39), l'histone des myéloblastes humains n'exerce aucune influence sur la croissance de Salmonella typhimurium à l'inverse de la protamine, mais possède une action antiphagique nette sur le phage T 1.

FIXATION SUR LES BACTERIES ET POUVOIR AGGLUTINANT

En 1948, BLOOM et BLAKE (10) signalent l'agglutination suivie de précipitation d'une suspension de Staphylococcus aureus par un polypeptide extrait de la thyroïde de porc ; ils constatent que le polypeptide

./.

utilisé forme avec la bactérie une combinaison qui ne peut être détruite par des lavages successifs. HIRSCH (66) confirme ce fait en montrant que le surnageant d'une suspension d'Escherichia coli après contact avec les histones a perdu tout pouvoir bactéricide. DELAUNAY et coll. (29) mettent en évidence l'agglutination d'hématies par des polypeptides et confirment les résultats de HIRSCH en étudiant ce phénomène chez les bactéries (28) (63) : l'agglutination est d'autant plus rapide que la concentration en germes est plus importante ; elle est cependant, dans tous les cas, totale après une heure de contact ; à ce moment, et si l'on a employé une forte concentration en bactéries, celles-ci ont épuisé la solution de polypeptide car le surnageant ne possède plus de propriétés agglutinantes ; on obtient avec différents germes (Micrococcus lysodeickticus, Escherichia coli Star, Salmonella typhimurium) les mêmes résultats avec les histones ou les protamines (128).

INHIBITEUR DE L'ACTION BACTERICIDE ET EFFET DU pH

L'activité des protéines basiques est inhibée par de nombreux corps, en particulier les ions bivalents et les substances à caractère acide. Le sérum, le sang, le bouillon nutritif provoquent selon MILLER et coll. (107) une réduction considérable des effets antibactériens des histones et des protamines ; l'addition de macromolécules acides (SKARNES et coll.) (153), d'hydrolysat de caséine ou d'infusion de coeur de boeuf (HIRSCH) (64) ont le même effet sur l'activité d'un peptide extrait du thymus de veau ; dans un travail ultérieur ce dernier auteur (66) montre que le chlorure, l'acétate ou le lactate

de sodium, la fraction V d'albumine bovine, l'héparine, les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques et la protamine inhibent l'activité des histones ; le lysozyme, l'hémoglobine et l'arginine sont sans action. GRETCHMAN et coll. (49) confirment l'antagonisme entre histones et protamine vis-à-vis du bactériophage tandis que WEISSMAN et GRAF (170) étudient plus particulièrement l'inactivation des histones par les acides désoxyribonucléiques ; d'un travail de DELAUNAY et coll. (30), il ressort que l'addition de chlorure de calcium ou de magnésium, de sulfate de chondroitine ou d'acides nucléiques, à une suspension bactérienne, protège les germes contre l'action bactéricide d'un polypeptide extrait de thymus de veau ajouté ultérieurement. Quant à l'effet du pH, SKARNES et coll. (153) trouvent que le pouvoir bactéricide est optimum à pH 8 tandis que pour HIRSCH (66) les histones sont plus actives à pH 5 qu'à pH 7.

MODE DE L'ACTION ANTIBACTERIENNE

Pour certains auteurs, le caractère essentiel de l'action des peptides sur les bactéries est leur fixation sur la cellule ; ainsi BLOOM et coll. (11) attribuent l'activité des histones à leur combinaison avec les complexes protéines-ribonucléate de magnésium se trouvant à la surface de la bactérie ; cette combinaison provoquerait l'inhibition de la respiration cellulaire. SPITZNAGEL (155) montre la possibilité de colorer les bactéries, après traitement par les histones, au moyen de colorants anioniques : les polypeptides cationiques, en se fixant, apporteraient à la surface du germe les groupements

./.

basiques leur permettant de prendre les colorants acides ou bien en bloquant les fonctions acides, modifieraient la charge de la surface ou encore la coloration serait due à une augmentation de la perméabilité cellulaire. Par contre, FISCHEI et BRANDIS (39) et GRETCHMAN et coll. (49) dissocient l'action agglutinante des histones et des protamines de leur pouvoir léthal, puisque le phage T 1 très altéré par les polypeptides n'est pas agglutiné tandis que le phage T 2 garde, après agglutination, son pouvoir infectant.

L'inhibition de la respiration cellulaire par les histones a été particulièrement étudiée par MILLER (107) sur de nombreuses espèces bactériennes ; ces observations concordent avec les résultats obtenus par DELAUNAY et coll. (30). Le polypeptide extrait du thymus de veau, étudié par ces auteurs, inhibe immédiatement en fiole de Warburg la consommation d'oxygène de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi et Staphylococcus Tin.

HIRSCH (64) émet une hypothèse personnelle pour expliquer l'action inhibitrice "in vitro" dans certaines conditions des peptides basiques sur les Mycobactéries : les ions sulfate sont nécessaires à la croissance de ces germes or les peptides basiques bloquant ces ions sulfate interféreraient avec le métabolisme normal du soufre chez ces microorganismes.

Devant des résultats aussi divers, notre travail a consisté à mettre en évidence l'action sur les bactéries d'une fraction bien déterminée d'histones, en étudiant au préalable, comme l'ont fait les auteurs précités, son pouvoir bactéricide et ses inhibiteurs, puis en essayant de préciser son mode d'action.

TECHNIQUES UTILISEES

1) Préparation de la fraction d'histones riche en arginine

Cette préparation a été effectuée selon la méthode de DALY et MIRSKY (25) en suivant le protocole expérimentale de SAUTIERE (143); elle consiste à effectuer à froid par l'acide chlorhydrique 0,25 N, la dissociation des nucléohistones des noyaux cellulaires de thymus de veau ; la solution d'histones obtenue est dialysée, puis additionnée de soude jusqu'à pH 10,6 ; dans ces conditions seule la fraction riche en arginine précipite ; après plusieurs dialyses et reprécipitations, la préparation est lyophilisée et conservée en chambre froide à 4° C.

2) Cultures bactériennes

Nous avons employé dans ce travail principalement les souches d'Escherichia coli 36 Burnet, 71.062 et 57.501 et de Pseudomonas fluorescens 721. Les cultures sur milieu liquide sont réalisées par incubation de 18 heures à 37° C sur milieu complexe (B P G) ou synthétique (S G) décrits dans le chapître précédent.

3) Détermination de l'activité bactéricide

Les cultures de 18 heures sont centrifugées. Le culot est lavé deux fois au moyen d'une solution isotonique de chlorure de potassium

contenant 80 mg par litre de phosphate dipotassique et ajusté à pH 7,2, puis une fois avec de l'eau distillée.

Sauf mention contraire, nous utilisons dans nos expériences des suspensions bactériennes contenant approximativement 1,6 10^8 germes par millilitre, correspondant à une densité optique de 0,2 à 650 mμ sous une épaisseur de 1 cm, prise à l'aide de notre photomètre. Pour la détermination de l'activité bactéricide, 1 ml de cette suspension diluée au $\frac{1}{10.000}$ est ajouté à un même volume de la solution de l'agent antibactérien en solution dans de l'eau stérile faiblement tamponnée à pH 7,2 par 20 μg de phosphate disodique par ml. Après un temps de contact habituellement d'une heure à 37°C, on prélève 0,05 ml qui sont ensemencés par étalement sur un secteur de gélose nutritive coulée en boite de Petri ; les colonies sont dénombrées après 18heures d'incubation à 37°. Parallèlement on effectue un témoin en milieu exempt d'inhibiteur.

4) Etude de la respiration cellulaire

Les échanges gazeux sont mesurés en appareil de Warburg à 37°C sous l'atmosphère d'air, en tampon phosphate 0,14 M de pH 7,2 ; les 5 micromoles de substrat sont placés dans la fiole tandis que la suspension bactérienne contenant 4.10^{10} bactéries se trouve dans le diverticule latéral et est versée au temps zéro.

5) Détermination de l'activité β-galactosidasique (96) et préparations enzymatiques acellulaires (89).

Les bactéries sont cultivées 18 heures sur milieu SG lactosé à 0,5 p. cent ; après centrifugation et lavage, le culot est mis en suspension dans l'eau de façon à obtenir une densité optique de 0,06 ; 1 ml de cette suspension additionné ou non de 0,05 ml de toluéne, est portée 30 minutes à 37° ; on ramène la température à 28°C et l'on ajoute 0,2 ml d'une solution 0,013 M d'orthonitrophenyl β D galactoside en milieu phosphate disodique 0,25 M à pH 7,2.

Après 20 minutes de contact, la réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml d'une solution de carbonate de sodium molaire et la densité optique est prise à 420 m μ sous une épaisseur de 1 cm par rapport à un témoin. L'unité d'activité correspond à la coloration donnée par hydrolyse d'une micromolécule d'orthonitro phenyl β D galactoside à pH 7,2 en 1 minute, sous un volume de 1 ml.

L'extraction de la β galactosidase d'E. coli est effectuée sur les bactéries induites par culture sur milieu lactosé, et séchées sous vide après centrifugation et lavages ; l'enzyme est extrait au moyen d'une solution de phosphate disodique 0,001 M par congélations et décongélations successives. Après centrifugation à 15.000 tours minutes, durant 30 minutes, le surnageant contenant la β galactosidase est recueilli.

./.

6) Détermination de l'activité phosphatasique

A 1 ml de la suspension bactérienne portée préalablement 10 minutes à 37°C, on ajoute 0,5 ml d'une solution d'orthonitrophenyl phosphate à 8 mg par ml en tampon citrique à pH 5,8 ; après 2 heures de contact à 37°C, on centrifuge et on ajoute 0,5 ml d'une solution molaire de carbonate de sodium. La lecture de la coloration jaune est effectuée au photomètre à 420 mμ. Les résultats sont exprimés en densités optiques obtenues dans nos conditions expérimentales.

7) Détermination de l'activité deshydrogénasique

Nous avons utilisé la technique de QUASTEL et WHETHAM (131) en tube de Thunberg, consistant à déterminer le temps de décoloration d'une solution 0,005 M de bleu de methylène, en anaérobiose, par une suspension bactérienne en présence d'un substrat.

8) Mesure de radioactivité

Ces mesures sont effectuées à chaque niveau de l'expérimentation ; la solution ou les suspensions sont déposées en couche mince sur plaque d'aluminium, l'étalement ayant un diamètre de 22 mm. Les comptages sont effectués à l'aide d'un compteur de Geiger à fenêtre mince durant un temps tel que le nombre d'impulsions compté soit toujours supérieur à 1.000

I - ACTIVITE BACTERICIDE, FIXATION DES HISTONES SUR E. COLI ET FACTEURS INHIBITEURS

Dès nos premiers essais, il est apparu que s'il existait une concentration d'histones minima active, relativement constante lorsque l'on s'adressait à un petit nombre de germes, on devait augmenter considérablement cette concentration pour qu'elle demeure bactéricide vis-à-vis de suspensions bactériennes denses.

1) Concentrations bactéricides

L'étude de la concentration bactéricide en histones est faite en mettant en contact pendant une heure à 37° C diverses concentrations d'histones en solution très légèrement tamponnée à pH 7,2, avec une suspension diluée de bactéries. Sur le Tableau I, nous avons indiqué la sensibilité de différentes souches d'*Escherichia coli*. On observe quelques variations dans les concentrations bactéricides à 100 p. cent pour une souche donnée ; par exemple, pour la souche *E. coli* 36 B, 5 µg d'histones ont été totalement bactéricide lors de 12 essais, dans 11 autres, 1 à 5 p. cent des bactéries sont restées survivantes ; par contre à la dose de 7,5 µg d'histones par ml, l'activité bactéricide a toujours été totale. Donc l'erreur faite sur l'évaluation de la sensibilité est assez grande et l'étude des divers facteurs en jeu ne nous a pas permis de

./.

Souches	Concentrations d'histones en µg par ml
E. coli 36 B	5 à 7,5
E. coli K 12	10 à 15
E. coli 71.062	10 à 15
E. coli 57.707	20 à 30
E. coli 57.501	40 à 60
E. coli 57.705	40 à 60

TABLEAU I

Concentrations d'Histones minimales bactéricides

à 100 p. cent vis-à-vis de différentes souches d'E.coli

la diminuer. Il faut noter que les quelques colonies provenant de germes ayant résisté à 5 µg donnent par subculture une population de même sensibilité aux histones que la souche initiale ; il ne s'agit donc certainement pas d'une sélection de variants résistants, mais de la survivance par hasard de quelques individus.

2) Fixation sur les bactéries

Nous avons voulu déterminer s'il existait une relation quantitative entre histones et bactéries ; pour cela, nous avons mis en présence de différentes concentrations d'histones, des quantités diverses, mais toujours importantes de bactéries dont les survivantes étaient dénombrées après dilution convenable. La quantité d'histones fixée par les bactéries est considérable et proportionnelle au nombre de germes (Tableau II) ; les résultats d'un grand nombre d'expériences sont schématisés dans la figure 1 ; sur celle-ci la droite en trait plein délimite la zone dans laquelle il y a excès d'histones, c'est-à-dire où la population bactérienne est entièrement tuée (région inférieure) de la zone où les bactéries sont en excès sur les histones ; dans cette région, au dessus de la droite, une certaine proportion des germes survit ; enfin, dans la zone correspondant à une concentration en histones inférieure à 5 µg par ml ; il n'y a aucun pouvoir bactéricide quel que soit le nombre de bactéries mises en jeu. Si nous estimons le poids moléculaire moyen des histones à 10.000, 6.10^7 molécules réelles d'histones doivent se fixer sur une bactérie pour provoquer sa mort dans nos conditions expérimentales avec la souche 36 B.

./.

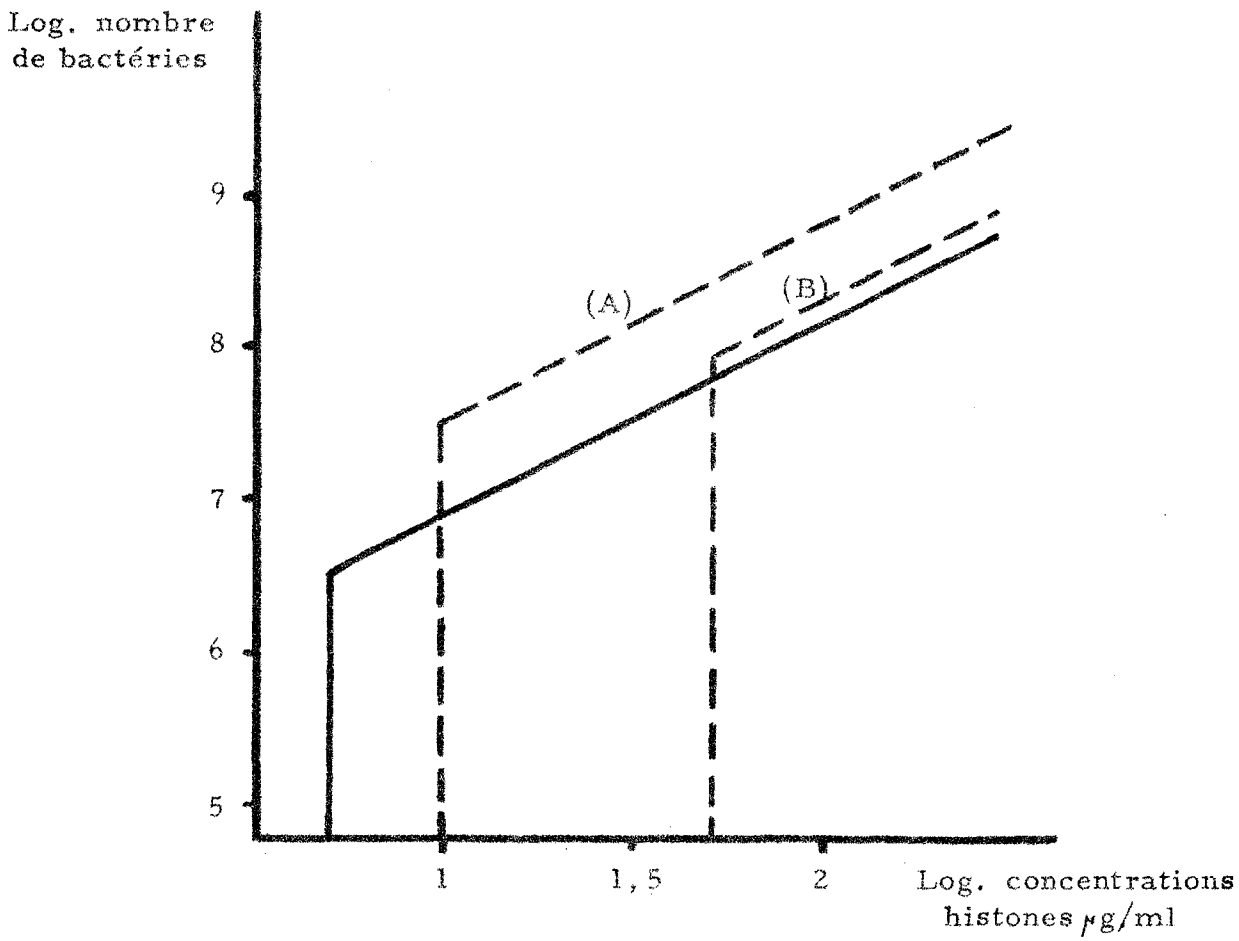


Figure I

Fixation des histones sur les bactéries ;
résultats de numérations des cellules survivantes
après une heure de contact de suspensions bactériennes
contenant un nombre variable de germes, avec diverses
concentrations d'histones. Au dessus de la droite en trait
plein, présence de bactéries survivantes (souche E. coli 36 B),
en dessous, toute la population bactérienne est tuée.
Même légende pour les droites en pointillés :
(A) souche 71.062, (B) souche 57.501

Concentrations en histones en µg par ml :	0	50			100		
Densité optique de la suspension bactérienne :	0,2	0,02	0,1	0,2	0,04	0,2	0,4
Pourcentage de bactéries survivantes (en p. cent) :	100	0	6,8	100	0	20,8	97

TABLEAU II

Pourcentage de bactéries survivantes en fonction du nombre de bactéries mises en contact avec les histones (E. coli 36 B)

La même expérience réalisée avec deux autres souches d'E. coli de sensibilités différentes aux histones, conduit aux droites en pointillés de la figure 1 de mêmes allures générales ; le nombre de molécules d'histones fixées sur chaque bactérie est différent suivant les souches et ne présente aucun rapport avec la concentration minima bactéricide.

3) Facteurs physiques influençant l'action des histones

Temps de contact : le Tableau III exprime le nombre de germes survivants après des temps de contact variables avec les histones. Celles-ci se comportent comme les antiseptiques, c'est-à-dire que le logarithme du nombre de bactéries survivantes est une fonction linéaire du temps de contact (figure 2). Par définition, nous considérons la pente de cette droite, comme mesurant l'activité bactéricide lorsque les conditions expérimentales diffèrent, par exemple s'il s'agit de comparer le pouvoir antibactérien des histones à diverses températures.

Température : sur la figure 2, nous avons tracé les droites exprimant le logarithme du nombre de germes survivants en fonction du temps de contact avec les histones aux différentes températures pour E. coli 71.062. L'activité bactéricide semble être proportionnelle à la température ; elle est presque nulle à 4°C alors qu'elle devient maximale à 43°.

pH : Dans les limites compatibles avec la vie cellulaire l'alcalinité ne semble pas gêner l'action antibactérienne des histones ; par contre, dès que le pH se trouve dans la zone acide, on constate un écroulement

./.

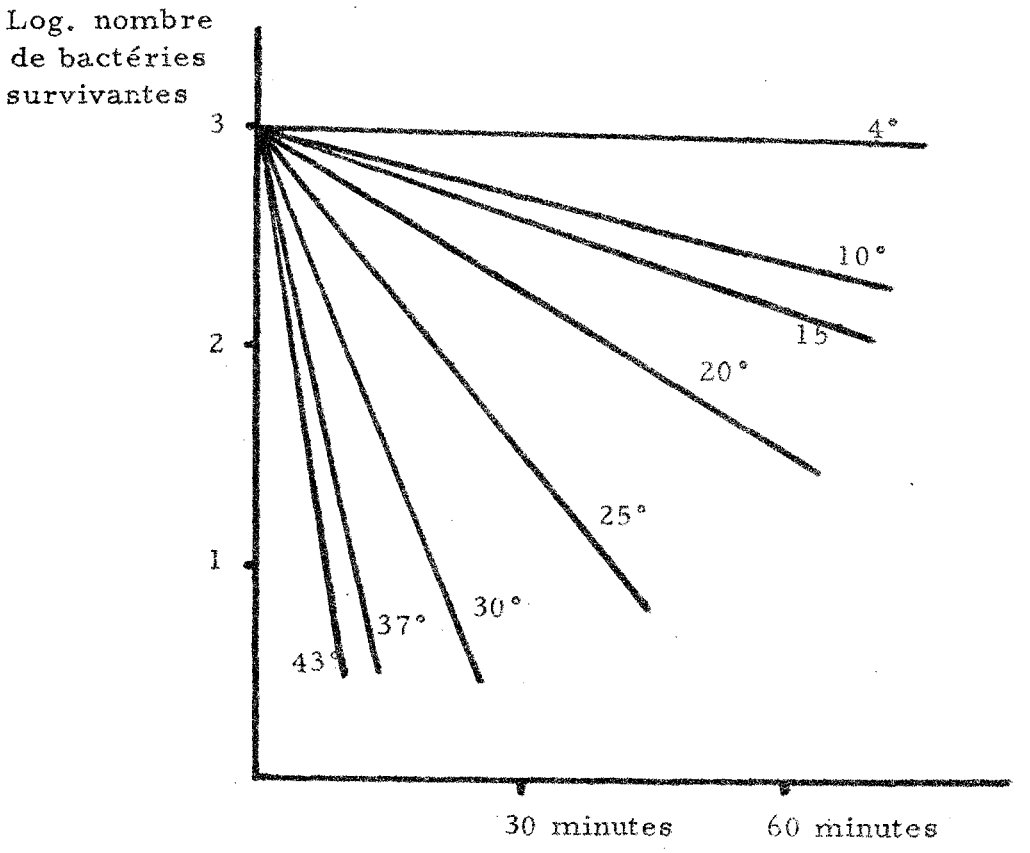


Figure 2

Influence de la température sur l'activité bactéricide de 20 μg d'histones par ml ; les résultats sont exprimés en Log. du nombre de bactéries survivantes en fonction du temps de contact avec les histones

Temps de contact en minutes	Bactéries survivantes exprimées en p. mille	Log du nombre de bactéries survivantes
0	1,000	3,000
2	802	2,903
5	211	2,322
10	12	1,079
15	4	0,602
20	0	0

TABLEAU III

Nombre de bactéries survivantes en fonction du temps de contact avec les histones (E. coli 71.062 en présence de 20 µg d'histones par ml à 37° C)

de l'activité bactéricide.

4) Facteurs chimiques influençant l'action des histones

Composés minéraux

Notre étude s'est bornée à déterminer l'influence des deux anions les plus abondants dans les milieux nutritifs ; les chlorures et les phosphates. L'action des chlorures de sodium ou de potassium est très réduite, même aux concentrations isotoniques. Par contre, les phosphates ont un effet plus marqué ; le tableau IV montre que pour des concentrations de l'ordre de 1 p. cent, en phosphate dipotassique, l' activité des histones est totalement inhibée ; c'est pourquoi dans les expériences faisant intervenir le pH, nous avons utilisé la concentration de 0,05 p. cent qui est sans effet. Il n'a pas été possible de déterminer si l'activité des sels est due à l'anion ou au cation.

Par contre le pouvoir inhibiteur des cations bivalents est incontestable ; sur le Tableau IV nous voyons que l'action d'une forte concentration d'histones (10 fois bactéricide) est partiellement bloquée dès la plus petite addition d'un sel de calcium, mais le pourcentage de germes survivants augmente peu lorsque l'on fait croitre d'une façon importante la concentration en ions calcium. Ceci semble indiquer que le Cl_2 Ca présente un rôle protecteur plutôt par effet de masse que par combinaison avec l'un ou l'autre des deux éléments en présence. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes efforcés de retirer de la réaction les ions calcium ajoutés auparavant, afin de voir si le pouvoir bactéricide des histones réapparaissait. L'ensemble de l'expérimentation

./.

Concentration en sels minéraux en µg par ml	p. cent de survivants après contact avec 20 µg/ml d'histones + PO_4K_2H	p. cent de survivants après contact avec 100 µg/ml d'histones + Cl_2Ca
0	0	0
100	0	41
200	0	41
500	0	56
1.000	0	61
2.500	1	68
10.000	90	-

TABLEAU IV

Comparaison de l'effet inhibiteur du phosphate de potassium avec celui du chlorure de calcium sur l'action bactéricide des histones vis-à-vis d'E. coli 71.062. Les sels minéraux sont mélangés à la solution d'histones avant addition de la suspension bactérienne

° ° °

est décrite dans le Tableau V ; les solutions ou leurs mélanges indiqués dans la première colonne sont laissés une heure à 37°C, puis, selon l'essai, soumis à la dialyse pendant 18 heures à 4°C, afin d'éliminer les ions calcium du milieu ; enfin l'adialysable est ramené à 37°C pendant une heure après addition si nécessaire d'une nouvelle solution. Dans tous les cas, la dialyse élimine totalement le calcium que celui-ci ait été ajouté aux histones ou à la suspension bactérienne ; on retrouve alors le pouvoir bactéricide intact ; l'expérience relatée à la dernière ligne du tableau rassemble ces différentes constatations : le mélange bactéries, calcium, histones, repiqué après une heure de contact donne une culture abondante ; après dialyse durant 18 heures à 4°C, il y a encore de nombreux germes vivants dans l'adialysable ; mais quand la suspension est ramenée à 37°C, on retrouve l'activité totale des histones. Ceci semble bien prouver que le calcium agit par effet de masse, en mobilisant peut être les récepteurs acides des histones à la surface de la bactérie. Nous avons obtenu des résultats semblables avec le magnésium.

Substances organiques

Dès nos premiers essais, nous avions tenté de mesurer l'activité bactériostatique des histones, par culture des germes en eau peptonée additionnée du peptide à différentes concentrations. Dans ces conditions les cultures en présence d'histones sont identiques à celles des témoins. Il semblait donc que la peptone trypsique exerçait une inhibition intense sur l'activité des histones. Pour la mettre en évidence, nous avons réalisé deux types d'expérience

./.

Solutions	Numération après contact durant 1 heure à 37° C	Numération après dialyse durant 18 heures à 4° C	Solutions ajoutées	Numération après contact durant 1 heure à 37° C
B	500	240	-	250
B + H	0	0	-	0
B + Ca	500	220	+ H	0
Ca	-	-	+ B	460
H + Ca	-	-	+ B	0
B + Ca + H	380	300	-	0

TABLEAU V

Inhibition par les ions Calcium de l'activité antibactérienne des histones et réapparition de cette activité après dialyse

B = Suspension d'E. coli 71.062 telle que le nombre final de bactéries soit de 10^4 par ml.
H = Solution d'histones telle que la concentration finale soit de 100 µg par ml.
Ca = Solution de Cl_2Ca telle que la concentration finale soit de 400 µg par ml.

Les différentes étapes de l'expérience vont de gauche à droite : d'abord mélange des solutions, puis numération après 1 heure de contact à 37°C, ensuite dialyse suivie d'une numération, puis addition de nouvelles solutions, enfin numération après 1 heure à 37°.

décrites sur le Tableau VI : en premier lieu, différentes concentrations d'histones sont additionnées de quantités constantes de peptones ; on ajoute la suspension bactérienne et après une heure de contact à 37°C, on dénombre les germes vivants ; alors qu'en absence de peptone 5 µg d'histones sont bactéricides à 100 p. cent, en sa présence il faut atteindre la concentration de 80 µg par ml pour observer le même effet. D'autre part, à une solution d'histones, nous avons ajouté des doses croissantes de peptone et procédé ensuite comme précédemment ; la peptone exerce ici encore un effet protecteur indiscutable. D'expériences semblables réalisées avec des doses diverses de peptones et d'histones, il ressort qu'il existe un rapport constant entre la quantité de peptone minimale inhibitrice et la quantité d'histones inactivées ; ce rapport est voisin de 2. Contrairement à ce qui se passe avec le calcium, il y a combinaison entre les histones et les peptones ; ceci est mis en évidence par la précipitation que l'on observe par mélange de quantités convenables des deux substances. La courbe de précipitation obtenue en ajoutant des concentrations variables d'histones à une solution déterminée de peptone est une courbe "en cloche" : l'addition de doses croissantes d'histones provoque une combinaison insoluble dont la densité optique est sensiblement proportionnelle à la concentration en histones jusqu'à une dose limite ; à cette concentration, la totalité précipitable de la peptone est vraisemblablement engagée dans un complexe histones-peptone insoluble ; puis des concentrations plus importantes en histones amènent une dissolution du précipité. Il faut noter que le rapport entre les quantités de

Concentrations en histones µg/ml	p. cent de bactéries survivantes		Concentrations en peptones µg/ml	p. cent de bactéries survivantes	
	sans peptone	+ peptones 100 µg/ml		sans histone	+ histones 50 µg/ml
0	100	100	0	100	0
5	0	100	15	100	0
10	0	100	50	100	0
20	0	100	100	100	5
40	0	14	200	100	57
60	0	2	500	100	100
80	0	0	1.000	100	100

TABLEAU VI

Inhibition de l'activité des histones sur E. coli 36 B

par la peptone trypsique

peptone et d'histones (environ deux poids de peptone pour un d'histones) donnant une combinaison optimale correspondant au sommet de la courbe, est le même que celui provoquant une inhibition maximale de l'activité bactéricide des histones.

LILLE

La fraction V de l'albumine sérique de COHN ou la lactalbumine donnent des résultats identiques à ceux obtenus avec la peptone.

II - MODIFICATIONS DE LA PERMEABILITE CELLULAIRE ET TROUBLES DU METABOLISME

Pour exercer leur pouvoir bactéricide, les histones doivent se fixer en grande quantité sur la cellule bactérienne (60 millions de molécules réelles par cellule d'E. coli 36 B) ; simultanément elles entraînent une inhibition totale de la respiration bactérienne. Ces constatations nous ont amenés à penser que les histones pouvaient agir en formant un manchon protéique imperméable autour de la bactérie ; il était donc nécessaire d'étudier avant toute chose l'action des histones sur la perméabilité cellulaire (56).

ETUDE DE LA PERMEABILITE CELLULAIRE

Dès que les bactéries ont été traitées par les histones, leur pouvoir d'intégration des substrats marqués par les radioisotopes devient nul ; nous avons donc marqué les bactéries, puis nous avons comparé le passage des composés endocellulaires, en présence ou en absence d'histones, à travers la membrane bactérienne, vers le milieu extérieur.

1) Technique

Les bactéries uniformément marquées ont été obtenues par culture sur milieu B P G additionné de phosphate ^{32}P (C. E. A.) ou sur milieu

./.

S G dont la seule source de carbone ou de soufre était enrichie soit en glucose U ^{14}C (C E A) soit en sulfate de sodium ^{35}S (C E A). Nous avons toujours obtenu de bons rendements d'incorporation avec le ^{32}P ou le ^{35}S, par contre le très faible pourcentage de ^{14}C intégré dans les bactéries (2 à 10 p. cent) nous a contraint à limiter les essais effectués avec ce radioisotope.

Après culture en présence de l'élément marqué, les bactéries sont lavées 5 à 8 fois au moyen d'une solution isotonique de chlorure de potassium jusqu'à ce que la radioactivité des eaux de lavage soit constante. Après contact de la suspension bactérienne marquée avec les histones, on centrifuge à 20.000 g ; le surnageant est dialysé à froid 2 fois contre de l'eau distillée, puis est traité suivant le schéma du tableau VII. La radioactivité est mesurée à chaque stade. La détermination qualitative des composants à fonctions acide ou neutre de la fraction dialysable est effectuée par électrochromatographie (125), l'étude plus précise des dérivés contenant du phosphore par chromatographie (109); la fraction dialysable correspondant aux acides aminés est étudiée par chromatographie bidimentionnelle : la première migration, s'effectuant en solvant phenol-ammoniaque, la seconde en solvant acide formique-butanol-eau. Enfin, la fraction adialysable est soumise à l'électrophorèse à différents pH. Les révélations sont effectuées par autoradiographie puis imprégnation par les révélateurs habituels : vert de bromocrésol pour les acides (95), phosphomolybdate pour les dérivés phosphorés (61), ninhydrine pour les acides aminés, amido schwartz pour les protéines.

./.

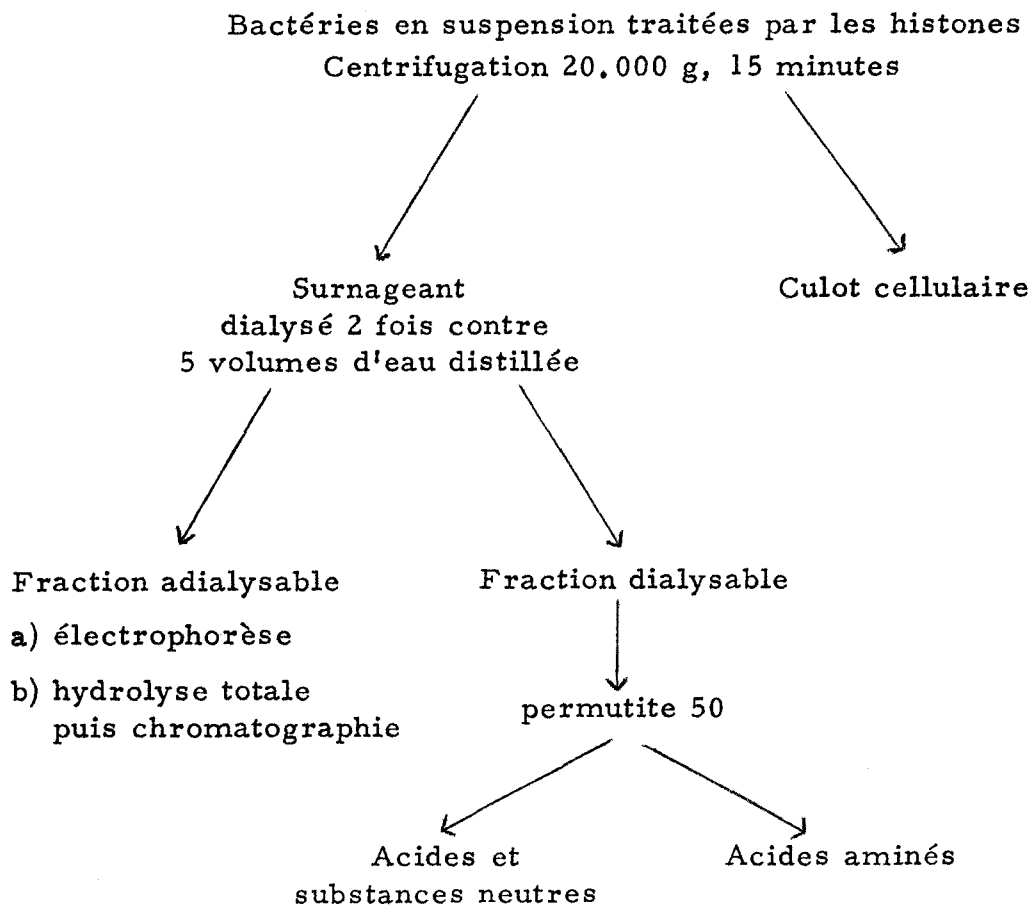

Bactéries en suspension traitées par les histones
Centrifugation 20.000 g, 15 minutes
Surnageant
dialysé 2 fois contre
5 volumes d'eau distillée
Culot cellulaire
Fraction adialysable
a) électrophorèse
b) hydrolyse totale
puis chromatographie
Fraction dialysable
permutite 50
Acides et
substances neutres
Acides aminés

TABLEAU VII

2) Perméabilité aux substances marquées avec le ^{32}P

Les résultats d'une série d'expériences sont résumés dans le tableau XVIII; la première colonne du tableau concerne la radioactivité éliminée dans le milieu extérieur sous l'action des histones par rapport à la radioactivité totale incorporée initialement dans la bactérie ; on constate que la radioactivité du milieu extérieur augmente avec la concentration en histones et qu'elle atteint son maximum pour la concentration bactéricide qui est, dans ces conditions expérimentales (suspension bactérienne dense), comprise entre 200 et 400 µg par ml. Les nombres de la deuxième colonne représentent la fraction dialysable des substances marquées sorties de la cellule, ceux de la dernière montrent l'importance de la fraction dialysable. Contrairement à ce que nous avions pu penser, le traitement par les histones entraîne une augmentation considérable de la sortie des produits intracellulaires vers le milieu extérieur ; cependant en présence ou non d'histones, la proportion de substances dialysables reste sensiblement la même ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'une simple augmentation de la perméabilité plutôt que de modifications qualitatives des produits excrétés. L'importance de la fraction dialysable montre que ce sont les petites molécules marquées au ^{32}P qui ont franchi la membrane bactérienne; l'étude par chromatographie met en évidence la présence d'une quantité importante d'acide orthophosphorique, de traces de nucléotides et de divers esters phosphoriques du métabolisme intermédiaire ; la courbe des densités optiques de l'adialysable dans l'ultra-violet ne présente aucun pic caractéristique ; ceci

./.

Concentrations en histones (µg/ml)	p. cent de radioactivité sortie dans le milieu extérieur par rapport à la radioactivité totale incorporée par les bactéries		p. cent de la fraction dialysable par rapport à la radioactivité sortie dans le milieu extérieur
	Total	fraction dialysable	
0	9,5	7,7	81
100	21,3	16,6	77,9
200	25,7	20,7	80,4
400	50,9	44	86,4
600	47,4	42,6	89,8

TABLEAU VIII

Passage dans le milieu extérieur des substances intra-cellulaires marquées au ^{32}P chez E. coli 71.062 après une heure de contact à 37° avec diverses concentrations d'histones

permet d'éliminer la présence d'acides nucléiques dans le milieu extérieur.

3) Perméabilité aux substances marquées avec le ^{35}S

Les résultats d'expériences semblables à celles réalisées avec le phosphate mais effectuées avec des bactéries ayant intégré du ^{35}S sont résumés dans le tableau IX ; la radioactivité sortie à l'extérieur des bactéries est multipliée par deux sous sur l'influence d'une concentration bactéricide d'histones ; cependant cette augmentation est environ 7 fois plus faible que celle observée pour les dérivés marqués au ^{32}P ; quoique la fraction dialysable éliminée passe de 12 p. cent à 26 p. cent en présence d'histones, il y a élimination accrue de substances de poids moléculaire élevé ; par comparaison des électrophorèses réalisées sur l'adialysable et révélées d'une part par l'amido schwartz, d'autre part par autoradiographie, on constate que la tâche radioactive se superpose à celle révélée par le colorant ; cette tâche radioactive éluée et hydrolysée 12 heures à 100°C par l'acide chlorhydrique 5,6 N, est ensuite additionnée d'une solution de baryte en milieu légèrement acide, ce qui amène la précipitation du sulfate libre ; ce précipité contient 26,5 p. cent de la radioactivité de l'adialysable ; quant au surnageant, nous avons déterminé par électrophorèse et chromatographie après oxydation que sa radioactivité se trouvait dans l'acide cystéique et les methionine sulfone et sulfoxyde. La présence dans l'hydrolysat de ces acides aminés soufrés démontre que sous l'influence des histones, la cellule laisse exsuder une ou plusieurs protéines, mais toujours en quantité faible. Par ailleurs, la fraction non négligeable précipitée par la baryte

./.

	Concentrations en histones (µg/ml)	p. cent de radioactivité sortie dans le milieu extérieur par rapport à la radioactivité totale incorporée par les bactéries		p. cent de la fraction dialysable par rapport à la radioactivité sortie dans le milieu extérieur
		Total	fraction dialysable	
^{35}S	0	3,8	0,45	11,8
	500	7,5	1,97	26,3
^{14}C	0	19,7	4,92	25
	500	75,9	22,77	30

TABLEAU IX

Passage dans le milieu extérieur des substances intracellulaires marquées au ^{35}S ou au ^{14}C chez E. coli 71.062 après une heure de contact à 37° C avec diverses concentrations d'histones

° °

°

indique que l'élimination de protéines est accompagnée de celle de substances de poids moléculaire élevé, porteurs de groupements ester sulfurique.

4) Perméabilité aux substances marquées avec le ^{14}C

Sur le tableau IX, nous voyons que l'importance de la fraction dialysable obtenue avec le ^{14}C est intermédiaire entre celle trouvée pour les bactéries marquées au ^{32}P et au ^{35}S ; en effet les protéines non dialysables sont marquées au ^{14}C, de même que les divers substrats du métabolisme intermédiaire ; nous avons identifié les composés les plus abondants se trouvant dans la fraction dialysable : il s'agit des acides aspartique, glutamique et fumarique et des acides aminés neutres. La recherche des acides volatils ne nous a donné aucun résultat (50).

5) Discussion

Le nombre de petites molécules libérées dans le milieu extérieur sous l'influence des histones suggère que celles-ci provoquent une lésion de la perméabilité cellulaire ; cependant l'absence constante d'acides nucléiques fait penser qu'il s'agit plutôt d'une augmentation de la perméabilité plutôt que d'une lésion anatomique des enveloppes cellulaires. La présence de protéines pourrait peut-être s'expliquer par une action directe des histones au niveau de la paroi bactérienne.

./.

ETUDE DU METABOLISME

Nous avons voulu compléter les renseignements donnés par l'étude de la sortie des substances endocellulaires sous l'influence des histones, par celle de quelques systèmes enzymatiques. En effet, on pouvait se demander si l'excrétion de certains substrats du métabolisme intermédiaire ne correspondait pas à un trouble de ce métabolisme amenant par exemple la synthèse accrue de ces substrats. Nous avons déterminé l'influence des histones, successivement, sur quelques systèmes d'oxydo réduction, sur l'activité phosphatasique et enfin sur la respiration des bactéries.

Pour l'étude de la vitesse d'oxydation des divers substrats, nous avons utilisé la technique simple de Thumberg ; ses résultats nous ont amenés à classer les substrats en trois groupes : un premier groupe dont la présence ne modifie pas le temps de décoloration du bleu de méthylène ; à fortiori, l'addition d'histones est sans effet ; parmi ceux-ci, on peut citer le glucose-6-phosphate, le phosphoglycérate, l'acétate, l'acétyl-phosphate, le citrate, l'α-cétoglutarate, le glutamate, le fumarate, le malate, l'oxalacétate et l'alanine. Un deuxième groupe est représenté uniquement par le glucose : le bleu de méthylène, très rapidement décoloré en sa présence, ne l'est pas lorsque dans le milieu se trouvent les histones. Enfin un troisième groupe dans lequel nous avons classé les substrats qui provoquent avec ou sans histones, la décoloration du bleu de méthylène ; deux d'entre eux sont presque totalement insensibles à l'action des histones, ce sont le lactate et le succinate ; pour trois

./.

autres, en présence de l'agent bactéricide, il y a formation de leucodérivé, mais moins rapidement qu'en son absence : pour le pyruvate, 14 fois moins, pour le fructose 1-6 diphosphate, 19 fois et pour le glucose 1-phosphate, 33 fois. On constate donc en général un ralentissement de la vitesse d'oxydation des différents substrats, particulièrement net pour le glucose ; seules les activités lactocideshydrogénasiques et succinodeshydrogénasiques ne sont pas inhibées.

L'activité phosphatasique acide est ralentie lorsque les germes ont été traités par les histones ; après 45 minutes de contact avec une concentration bactéricide du peptide, on n'observe plus que la moitié de l'activité enzymatique initiale.

L'étude de la respiration en fiole de Warburg conduit à des résultats semblables : en présence d'une concentration bactéricide d'histones, la consommation d'oxygène endogène (en absence de tout substrat) ou en présence de glucose devient nulle. Il faut noter que l'action des histones sur la respiration est très rapide, en effet, si la solution du peptide est placée dans le diverticule latéral, on voit la consommation d'oxygène s'arrêter au moment où elle est versée dans la suspension bactérienne. Sur la figure 3 nous avons tracé les courbes des consommations d'oxygène endogène et en présence de glucose, en fonction des concentrations en histones ajoutées ; on constate une augmentation considérable de la respiration endogène qui double lorsque la concentration en histones atteint 200 μg par ml, puis diminue au-delà de cette dose ; nous avions pensé rapprocher ce phénomène de celui que nous avions déjà mis en évidence, en particulier avec l'auréomycine (52), c'est-à-dire l'augmentation de consom-

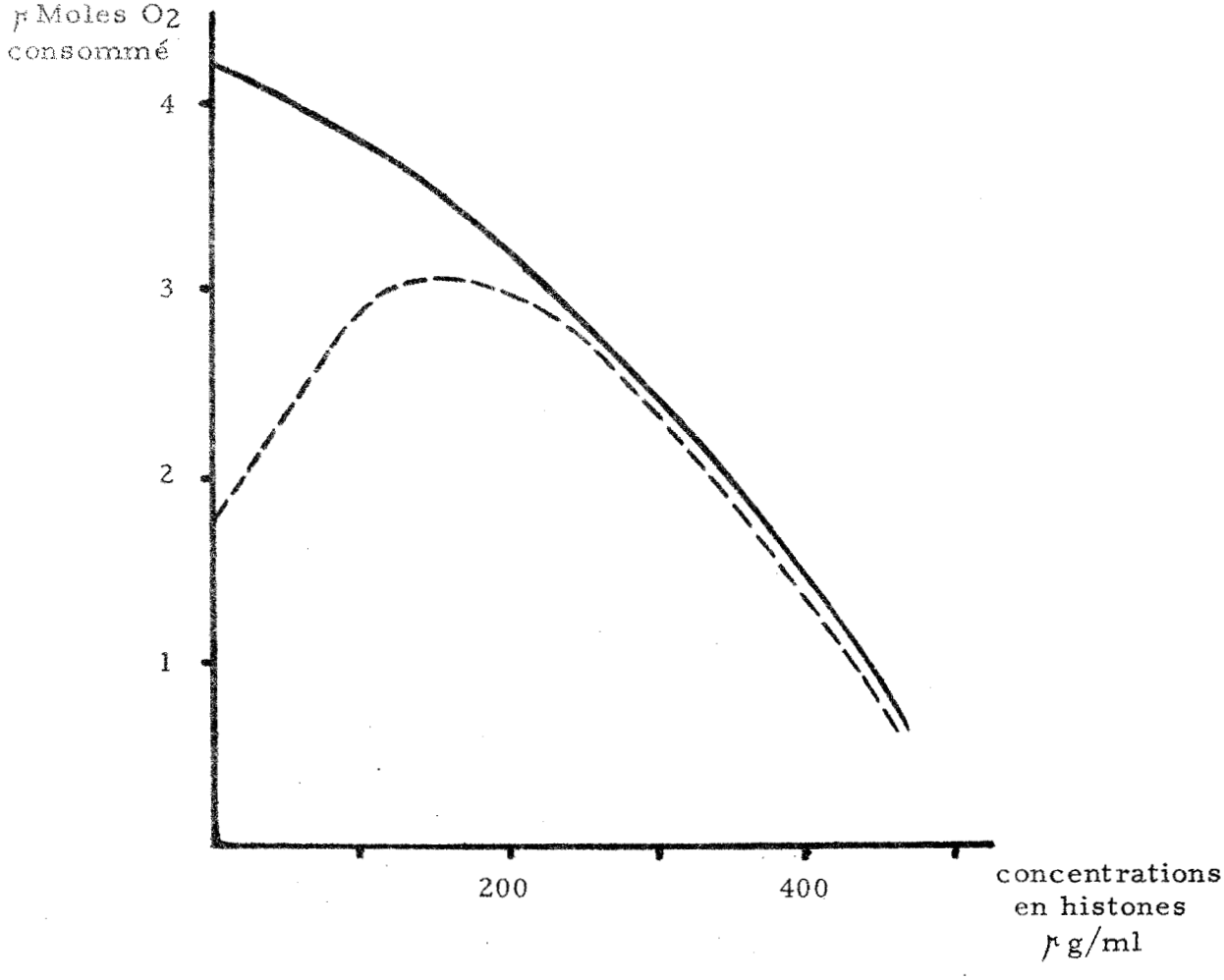


Figure 3

Oxygène consommé en fiolès de Warburg par E. coli 36 B
en fonction de la concentration en histones
(en 1 heure par 5.10^9 bactéries) ;
en pointillés : respiration endogène ;
en trait plein : respiration en présence de 5 µM de glucose par fiole

mation d'oxygène endogène causée par un antibactérien employé à sa concentration active. Mais ici, la concentration de 200 µg d'histones ne correspond qu'à moins de la moitié de la concentration bactéricide dans les conditions d'expérience ; il nous a semblé possible d'expliquer ce fait de la façon suivante : les histones, en concentration insuffisante pour exercer leur action léthale sur toute la population bactérienne, provoquent la sortie de métabolites intermédiaires hors des cellules qu'elles ont tuées ; ceux-ci sont métabolisés par les cellules intactes, phénomène se traduisant par une augmentation de la respiration endogène ; ensuite lorsque les doses du peptide sont plus importantes, les bactéries survivantes sont de moins en moins nombreuses et, bien que la concentration en substrats augmente, la respiration diminue. Nous avons pu vérifier ceci en ajoutant à une suspension de bactéries intactes le surnageant de germes traités par des concentrations non bactéricides d'histones ; on observe alors la même augmentation de la respiration, en absence d'histones, puisque celles-ci sont restées fixées dans le culot microbien. Enfin en ajoutant du glucose à la préparation histones-bactéries, on assiste à une diminution progressive de la consommation d'oxygène (courbe en trait plein de la figure 3) et l'on voit, à partir d'une certaine concentration en histones, les deux courbes se confondre ; à ce moment, il nous semble que la quantité de glucose surajoutée devient insignifiante par rapport aux métabolites présents dans le milieu et n'intervient plus dans le volume d'oxygène consommé.

Cette étude des activités métaboliques en présence d'histone nous a donc apporté des résultats variables ; d'une part les différences d'activité

enzymatique, se traduisant généralement par une diminution d'activité, sont difficilement interprétables à moins de penser que les histones peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule et bloquer les protéines enzymatiques ; d'autre part l'augmentation de la respiration endogène nous a conduit aux mêmes constatations que celles faites grâce aux études sur la perméabilité : la fixation des histones sur les bactéries modifie la perméabilité cellulaire et amène une fuite de constituants indispensables.

III - ESSAI D'ETUDE DU PROCESSUS INTIME DE L'ACTION BACTERICIDE DES HISTONES

Nous avons vu que les histones se fixent en quantité importante sur les bactéries et que cette fixation amène des troubles de la perméabilité et la disparition de certaines activités métaboliques. Nous avons tenté d'approfondir quelques points précis de leur mode d'action : en premier lieu, l'action primitive des histones correspond-t-elle au délabrement des enveloppes cellulaires ou à l'inhibition de système enzymatique ? Nous avons approché ce problème par l'étude de l'activité β galactosidasique gouvernée à la fois par la présence d'un enzyme et d'un système de perméation. Ensuite il nous a semblé intéressant de chercher comment une molécule protidique banale, dépourvue à première vue de propriétés "dynamiques" pouvait présenter une telle activité sur les cellules vivantes ; le seul caractère particulier des histones étant leur aptitude à précipiter avec les protéines, nous avons comparé l'activité bactéricide du peptide basique avec son pouvoir de floculer certaines protéines (53), ce qui nous a amené à étudier plus particulièrement l'influence de la température sur les deux phénomènes (58). Enfin l'examen en microscopie électronique des cellules traitées par les histones nous a permis de discuter les résultats obtenus.

./.

INFLUENCE DES HISTONES SUR L'ACTIVITE GALACTOSIDASIQUE

Le tableau X résume une série d'expériences dans lesquelles nous avons mis en contact durant 45 ou 90 minutes à 37° une suspension d'E. coli avec des concentrations variables d'histones ; après centrifugation à froid, le culot bactérien est ajouté à l'o. nitrophényl β-galactoside, avec ou sans addition préalable de toluène. Après 45 minutes de contact avec la concentration bactéricide du peptide (40 μg par ml dans nos conditions expérimentales), on constate une augmentation considérable de l'activité enzymatique, du même ordre de grandeur que celle observée avec le toluène et en absence d'histones.

Ce fait correspond aux résultats déjà obtenus : les histones comme le toluène ou le thymol (27), en augmentant la perméabilité cellulaire au substrat permettraient son contact avec l'enzyme, d'où l'activité enzymatique accrue. Cependant cette hypothèse n'est en accord ni avec les autres résultats du tableau X (écroulement de l'activité β-galactosidasique après 90 minutes de contact avec les histones ou 45 minutes de traitement par le peptide puis addition de toluène), ni avec les constatations faites lors de l'étude des systèmes enzymatiques faite au chapître précédent, ou alors il faut penser que les histones, outre leur action directe sur les enveloppes bactériennes pénètreraient dans la cellule et inhiberaient l'enzyme lui-même. Nous avons donc étudié l'action directe des histones sur la β-galactosidase isolée d'E. coli ; l'enzyme débarrassé seulement du matériel sédimentable à 20.000 g est inactivé par addition d'une quantité de peptide plus faible que celle nécessaire

Concentrations en histones µg/ml	Contact durant 45 minutes		Contact durant 90 minutes	
	sans toluène	avec toluène	sans toluène	avec toluène
0	18	101	16	82
20	72	18	18	20
40	108	11	9	12
60	72	13	7	7
80	85	13	23	30

TABLEAU X

Action des histones sur l'activité β galactosidasique d'E. coli 36 B : la concentration bactéricide en 45 minutes de contact avec les histones est de 40 µg par ml

pour inhiber l'activité de la cellule intacte ; en effet, 50 μg d'histones sont capables de bloquer l'enzyme fourni par environ 2.10^8 bactéries, alors qu'ils ne présentent une action léthale à 100 p. cent que vis-à-vis de 5.10^7 germes. Par contre la concentration nécessaire pour bloquer l'activité β galactosidasique est plus élevée que la concentration bactéricide si l'on s'adresse à la même préparation enzymatique, mais brute ; ceci s'explique par le grand nombre de molécules diverses pouvant retenir, dans ce cas, les histones.

Il apparaît donc que, dans un premier temps, les histones se fixent au niveau de la membrane bactérienne, augmentant sa perméabilité, sans cependant pénétrer dans la cellule elle-même ; ceci correspond à la phase d'accroissement de l'activité β-galactosidasique ; puis avec le temps ou à la faveur de lésions créées par une autre substance comme le toluène, les histones viennent inhiber à l'intérieur de la cellule les systèmes enzymatiques.

Ceci a pu être suivi "in vivo" de la manière suivante : les bactéries sont traitées par les histones durant un temps variable, refroidies, puis centrifugées à froid ; le culot repris par du tampon phosphaté est alors désintégré au moyen du "Raytheon sonic oscillator 10 K cycles" ; l'activité galactosidasique des extraits acellulaires est essayée ; on constate une diminution constante de l'activité en fonction du temps de contact, celle-ci devenant nulle par traitement durant deux heures. Il s'agit donc bien d'une pénétration lente intra-cellulaire, se poursuivant même en l'absence d'histones dans la solution extérieure.

COMPARAISON DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DES HISTONES AVEC LEUR POUVOIR DE FLOCULER CERTAINES PROTEINES

Nous avons montré précédemment que le blocage par certaines protéines (peptones, albumine sérique, lactalbumine) de l'activité bactéricide des histones pouvait s'expliquer par la précipitation de ces protéines. Nous avons voulu étudier l'interférence histones-protéines d'une manière quantitative et voir si les inhibiteurs de l'activité bactéricide empêchaient aussi la floculation.

Lorsque l'on ajoute à une concentration déterminée de peptones des doses croissantes d'histones, on obtient une courbe de précipitation en cloche ; après centrifugation des précipités, l'activité bactéricide des surnageants est essayée sur une suspension dense de bactéries ; les résultats schématisés sur la figure 4 montrent que les précipités histones-protéines entraînent la totalité du facteur bactéricide ; pratiquement, dès que l'on atteint le sommet de la courbe de floculation, donc d'épuisement des protéines, le pouvoir bactéricide réapparaît dans toute son ampleur et il ne reste aucun germe survivant ; on doit noter que lorsque l'on a ajouté 100 µg d'histones le précipité protéines-histones est presque totalement redissout (figure 4) ; si l'on mesure alors la concentration en histones actives de ce mélange, par dosage microbiologique, on constate que plus de la moitié de la quantité initiale d'histones a disparu ; la redissolution du précipité n'a donc pas impliqué la libération des molécules d'histones. Par ailleurs si on ajoute directement les bactéries aux mélanges histones-peptone sans les débarrasser au préalable du précipité par

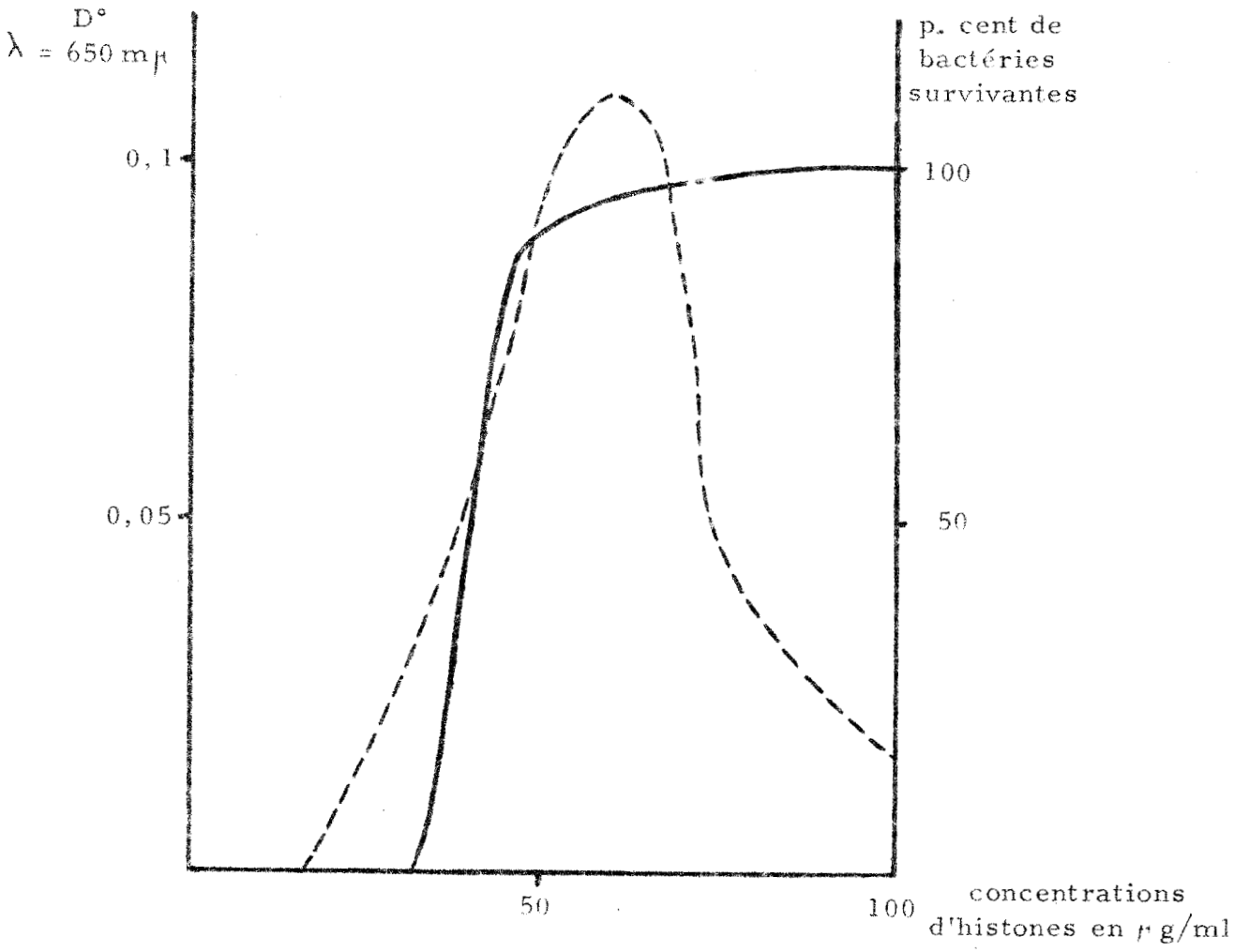


Figure 4

Comparaison des courbes représentant la densité optique du précipité histones-protéines en fonction de la concentration d'histones, et l'activité bactéricide de ces mélanges ; en pointillés : courbe de précipitation, exprimée en densités optiques, de 100 μg de peptones par ml ; en trait plein : pourcentage de bactéries survivantes après contact d'une heure avec les différents mélanges histones-peptone

centrifugation, on obtient la même courbe que ci-dessus ; les bactéries sont donc incapables de déplacer les histones de leur combinaison avec les protéines.

L'expérience inverse donne des résultats semblables ; les surnageants des divers mélanges bactéries-histones étudiés sur la figure 1, sont additionnés d'une solution de peptone ; pour tous les points situés au dessus de la droite, où il y a excès de bactéries par rapport aux histones, on n'observe aucune floculation ; par contre pour les rapports de concentration situés en dessous de la droite, l'addition de peptone provoque la précipitation. De ces deux types d'expériences, il ressort que c'est la même fraction des histones qui précipite avec les protéines et qui possède une activité bactéricide, accompagnée d'ailleurs de l'agglutination des germes.

Nous avons étudié l'influence sur la précipitation histones-protéines de deux inhibiteurs de l'activité antibactérienne du peptide. Lorsque l'on ajoute à 250 µg d'histones 500 µg de p eptones dans des solutions de pH différents, on constate que nulle à pH 4, la densité optique augmente avec le pH pour devenir maximale aux environs de la neutralité ; l'acidité a donc la même influence sur la précipitation et l'activité bactéricide. De même, le tableau XI comparé au tableau IV montre que l'inhibition exercée sur les deux phénomènes par les ions calcium, ajoutés préalablement au milieu, est très semblable. Mais si le chlorure de calcium est additionné en dernier lieu aux deux premiers termes de la réaction, il est capable de dissoudre partiellement le précipité histones-protéines alors qu'il ne peut éluer les histones fixées sur les bactéries ; ceci est démontré dans l'expérience suivante : une suspension bactérienne est centri-

./.

Concentrations en Cl_2 Ca µg/ml	0	100	200	500	1.000	2.000
Densités optiques à 650 mµ	0,20	0,19	0,18	0,12	0,8	0,2

TABLEAU XI

Influence de la concentration en ions calcium sur la précipitation de 100 µg d'histones par ml par 250 µg de peptone

fugée après contact avec une concentration bactéricide d'histones ; le culot est additionné de chlorure de calcium, agité, centrifugé, et le surnageant est dialysé pour éliminer le calcium ; après essai, on constate que la fraction adialysable est dépourvue de toute activité antibactérienne, donc il n'y a pas eu élution d'histones actives.

Nous avons montré précédemment (cf. figure 2), l'influence de la température sur l'action bactéricide des histones sur E. coli ; en particulier à 4° C, cette action devient pratiquement nulle. Par contre la précipitation des protéines par les histones n'est nullement affectée par la température ; la densité optique du précipité, sa composition en azote total, sa vitesse d'apparition sont identiques à 37° et à 4° C ; nous allons examiner plus particulièrement cette différence fondamentale entre les deux réactions.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA FIXATION DES HISTONES ET LEUR ACTIVITE BACTERICIDE

Nous avons d'abord étudié la fixation des histones sur les protéines et les cellules en fonction de la température. La précipitation des protéines à 4° C est accompagnée de la fixation des histones en mêmes quantités qu'à 37° C ; nous l'avons démontré en épuisant à basse température une solution d'histones par des protéines, le surnageant est privé de toute activité bactéricide. La fixation des histones sur E. coli aux deux températures est schématisée sur les deux premières colonnes du tableau XII : nous avons mis en contact durant une heure une suspension bactérienne non proliférante avec 400 µg d'his-

Température	5.10^8 cellules vivantes lavées		5.10^8 cellules tuées par rayonnement ultra-violet
	bactéries survivantes	µg histones fixées	µg histones fixées
37° C	0	320	152
4° C	$4,6.\ 10^8$	148	152

TABLEAU XII

Action de la température sur la quantité d'histones fixées par E. coli 71.062

tones, à 37° ou à 4°C ; après centrifugation aux mêmes températures, les germes vivants contenus dans le culot sont dénombrés, tandis que l'on effectue sur le surnageant des dosages d'histones libres par mesure de leur activité bactéricide après dilutions convenables ; on constate une fixation deux fois plus importante à 37°C, qu'à 4°C.

Cette fixation à 4° est loin d'être négligeable mais ne semble avoir aucun effet léthal ; nous avons voulu voir si elle correspondait à la quantité d'histones retenue par les cellules en absence de tout métabolisme ; les résultats de la 3ème colonne du tableau XII le prouvent : les bactéries tuées par exposition aux rayonnements ultraviolets fixent à 4° comme à 37°C la même quantité de peptide que les germes vivants à 4°C. Enfin, comme on pouvait s'y attendre, les parois, préparées par double digestion trypsique selon la technique de WEIDEL (175), et les membranes cytoplasmiques, obtenues par lyse des sphéroplastes-pénicilline induits suivant la méthode de CHARGAFF (21), retiennent les histones aussi bien à froid qu'à 37°C. Il ressort de ces expériences que les protéines, les parois, les membranes bactériennes et les bactéries tuées fixent les histones quelle que soit la température de la réaction, et se comportent comme les bactéries vivantes à 4°C ; par contre à 37°, les histones se fixent en quantités plus grandes sur les germes et exercent alors leur pouvoir léthal ; cette dernière fixation paraît spécifique de la cellule vivante dont les systèmes enzymatiques sont actifs.

Pour préciser ce point, il fallait déterminer si l'activation des histones à 37°C, vis-à-vis d'E. coli, était uniquement le fait de l'élévation

./.

de la température ou si elle était liée à la température optimale du métabolisme cellulaire. En effet l'augmentation d'activité d'un antiseptique avec la température est un phénomène banal ; ainsi pour obtenir le même effet léthal sur E. coli, on doit employer une concentration près de 10 fois plus forte en phénol ou en chlorure mercurique à 4°C qu'à 37°C. Mais les histones, même en solution saturée (concentration 1.000 fois bactéricide), mise en contact durant un temps très long (48 heures) avec E. coli n'exercent qu'une action bactéricide négligeable à la condition que la température soit constamment en dessous de 4°C. Le taux de croissance nous a semblé être un témoin convenable de l'activité métabolique globale d'une bactérie à une température déterminée, ceci pour les températures inférieures à celles correspondant au taux de croissance maximum (pour les températures supérieures, on ne sait si l'arrêt de la division est dû à un facteur métabolique). Nous avons étudié comparativement les taux de croissance en fonction de la température chez deux espèces bactériennes, l'une Escherichia coli, mésophile ; l'autre, Pseudomonas fluorescens, psychrophile ; les courbes de la figure 5 montrent les variations de ces taux de croissance, rapportées au taux de croissance maximum. Nous avons superposé sur le même graphique les droites correspondant à l'activité bactéricide des histones aux différentes températures vis-à-vis des deux espèces microbiennes ; ces droites sont proportionnelles aux angles de pente des droites exprimant le logarithme du pourcentage de bactéries survivantes en fonctions du temps de contact avec les histones (cf. figure 2). On observe une concordance remarquable entre taux de croissance et activité

./.

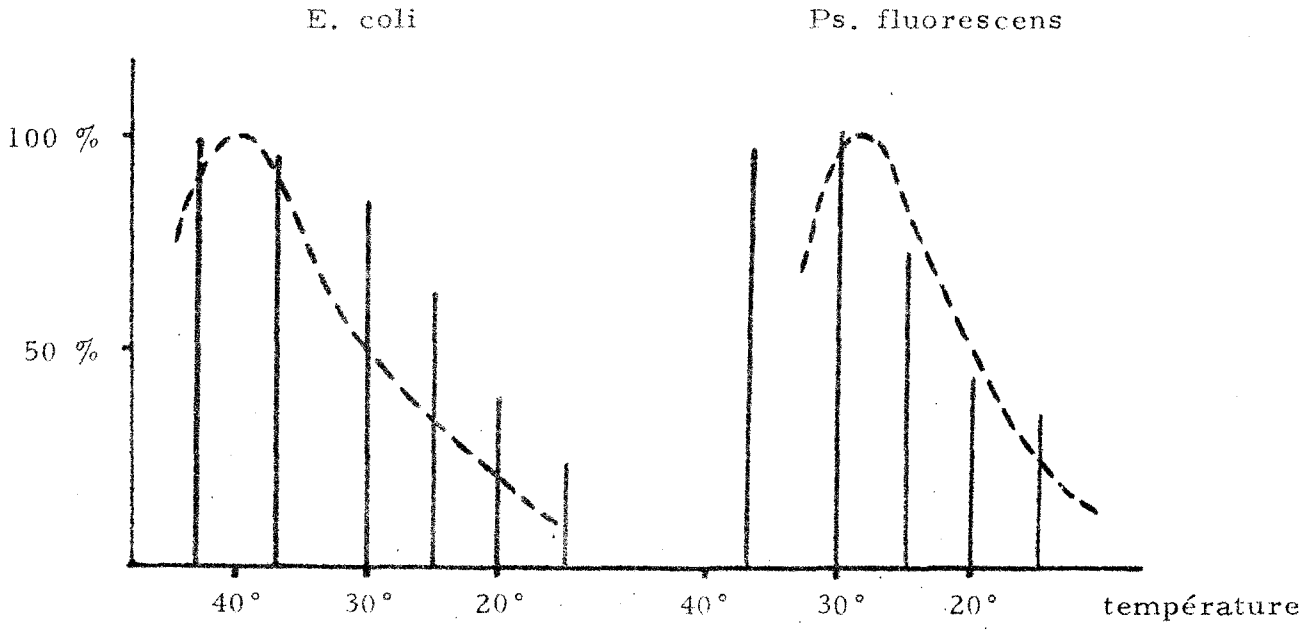


Figure 5

Comparaison du taux de croissance et de l'activité bactéricide des histones en fonction de la température. Courbes en pointillés : taux de croissance à différentes températures (nombre de divisions par unité de temps) exprimés en p. cent du taux de croissance maximum.
Les droites sont proportionnelles aux angles de pente des droites exprimant le logarithme du pourcentage de bactéries survivantes en fonction du temps de contact avec les histones (cf. figure 2).

bactéricide à une température déterminée ; en particulier l'effet léthal est maximum à 30°C pour la souche psychrophyle tandis qu'il ne l'est qu'à 40°C pour la souche mésophile. L'action des histones provoquant la mort cellulaire semble donc étroitement liée à l'activité métabolique des bactéries. De l'ensemble de ces résultats, il est permis de tirer l'hypothèse suivante : les histones se fixeraient sur la paroi bactérienne quelle que soit la température, puis, si le métabolisme est actif, une nouvelle fraction d'histones viendrait désorganiser la perméabilité cellulaire au niveau de la membrane. Nous avons tenté de montrer la réalité de ces différentes phases par l'examen en microscopie électronique.

ETUDE DE L'ACTION DES HISTONES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Afin d'obtenir des renseignements concernant le site d'action des histones, nous avons entrepris l'étude morphologique en contraste de phase et en microscopie électronique de cellules d'*E. coli* 71.062 mises en contact avec la substance antibactérienne. Pour essayer de dissocier son action sur la paroi et la membrane, nous avons utilisé la propriété que possède le lysozyme de dépolymériser les mucopolysaccharides de la paroi, transformant les bactéries en sphéroplastes.

Nous avons pu ainsi étudier les modifications morphologiques des germes soumis à :

1°) l'action des histones à 37°C

2°) l'action des histones à 37°C suivie de celle du lysozyme

3°) l'action du lysozyme puis de celle des histones à 37°C.

Préparations bactériennes

Les bactéries lavées sont mises en contact avec les histones dans les conditions précisées précédemment. Le traitement par le lysozyme est effectué selon la méthode de REPASKE (133) dans les conditions suivantes :

0,25 ml de suspension bactérienne contenant 1.10^9 germes par ml sont additionnés successivement de

0,10 ml de solution de tris (hydroxymethyl) aminomethane à 0,484 p. cent ajustée à pH 7,6 par l'acide chlorhydrique

0,10 ml de solution de lysozyme à 200 µg par ml

0,50 ml de solution de saccharose à 20 p. cent

on laisse 20 minutes à 28°C ; puis on refroidit à température de la pièce

on ajoute alors

0,30 ml de solution de tris à 3,687 p. cent ajustée à pH 8

0,30 ml de solution de complexon III à 0,754 p. cent

on laisse 15 minutes à température du laboratoire

Les différentes préparations sont centrifugées, lavées et remises en suspension dans de l'eau bidistillée stérile de façon à obtenir la densité optique désirée.

Ces suspensions sont :

- d'une part examinées, entre lame et lamelle paraffinées, au microscope en contraste de phase

./.

- d'autre part déposées sur membrane au formvar, desséchées par lyophilisation ombrées à l'or, puis examinées au microscope électronique Philips.

Les observations que nous avons effectuées en microscopie en contraste de phase et l'étude des photographies prises en microscopie électronique (Planche II) nous ont permis de faire les remarques suivantes :

1°) les bactéries soumises uniquement à l'action des histones à 37°C conservent leur forme bacillaire, mais présentent des modifications de surface (fig. 2, 3 et 4 - Pl. II) : disparition de la limite nette de la paroi, présence d'amas peu dense aux électrons, collés à la bactérie, qui permettent de supposer que l'on se trouve en présence d'histones précipitées à la surface des germes. On peut penser aussi que ces amas correspondent soit aux substances intracellulaires sortis sous l'influence du peptide, soit aux complexes histones-composés de la paroi, précipités à la surface des germes. Cette dernière hypothèse est étayée par le fait que les ponts qui relient les bactéries sont constituées de la même matière de densité optique variable à limites imprécises ; or un phénomène d'agglutination étant provoqué par le peptide basique, il est vraisemblable que la substance intercellulaire est constituée de molécules d'histones ou de leurs complexes avec des constituants de la paroi bactérienne.

Le cytoplasme est aussi le siège de modifications ; on peut, en effet, observer des irrégularités, d'une part dans ses limites, d'autre part dans sa densité aux élections ; ces différences de densité peuvent s'expliquer par la fuite de substances cytoplasmiques.

2°) Les bactéries traitées par les histones à 37°C, puis par le lysozyme sont représentées sur les figures 5 et 6 à comparer avec une cellule transformée par le lysozyme seulement (figure 7). Les altérations sont extrêmement marquées :on observe une déliquescence de la paroi vraisemblablement sous l'effet du lysozyme mais la cellule a conservé la forme bacillaire orignelle. Le cytoplasme présente des plages de faible densité électronique beaucoup plus étendues que celles observées sur les germes traités uniquement par les histones. Il est possible que la destruction enzymatique de la majorité de la paroi puisse permettre une sortie plus rapide et plus marquée des constituants intracellulaires, mais le fait important est que la bactérie traitée par le peptide conserve sa forme après avoir été soumise à l'action du lysozyme ; la pression osmotique intracellulaire est donc en équilibre avec celle du milieu ambiant. Il semble que l'on puisse éliminer l'hypothèse selon laquelle les histones pourraient protéger la paroi contre le lysozyme car on ne pourrait pas expliquer la génèse des altérations très importantes qu'elle présente.

3°) Les photographies 8 et 9 (Pl. II) montrent les germes traités par le lysozyme puis par les histones à 37°. Au cours de cette expérience, nous avons, dans un premier temps, fait agir le lysozyme, transformant ainsi les bactéries en sphéroplastes ; une partie de ceux-ci ont été mis en suspension dans un milieu hypotonique pour servir de témoin (fig. 7 - Pl. II), l'autre partie a été traitée par les histones, puis mise en suspension dans le même milieu. Lorsqu'on compare les figures 7, 8 et 9, on constate qu'il ne reste du sphéroplaste témoin que la

./.

membrane cellulaire vide, alors que ceux ayant subi l'action des histones, paraissent avoir conservé une partie de leur substance cytoplasmique. Ceci confirme à nouveau, que les histones provoquent un trouble important de la perméabilité, entraînant une égalisation des pressions osmotiques interne et externe, empêchant ainsi le lyse des protoplastes en milieu hypotonique. La protection des protoplastes par les protamines composés très voisins des histones a, par ailleurs été mise en évidence par COLOBERT (24).

Cette étude morphologique nous a, d'autre part, permis de confirmer les résultats précédents quant au mode d'action des histones, en effectuant l'examen comparatif de cellules traitées par les histones à 37° et à 0°C.

a) E. coli soumis à l'action des histones à 0°C (fig. 10 - Pl. II) présente des modifications morphologiques différentes de celles observées précédemment ; on note, en effet, que la paroi a un aspect granuleux ; il est possible que cette modification soit due à une fixation des histones au niveau de la paroi, sans précipitation avec les substances cytoplasmiques. On remarque, en outre, qu'il n'existe aucun pont intercellulaire, ce qui est conforme à l'absence d'agglutination des germes à 0°C par les histones.

b) Quand les bactéries traitées de cette manière à 0°C sont soumises à l'action du lysozyme, elles sont transformées en sphéroplastes qui se lysent en milieu hypotonique. A 0°C, les histones sont donc incapables d'entraîner l'altération de la perméabilité de la membrane qui stabilise les sphéroplastes.

IV - DISCUSSION SUR LE MODE D'ACTION DES HISTONES

A la lumière des diverses expérimentations que nous avons décrites, nous allons examiner successivement ce que nous pouvons en tirer quant au lieu de fixation des histones et au mode de leur action bactéricide.

A quel niveau de la cellule les histones se fixent-elles ?

Nous avons vu que les histones sont retenues par un grand nombre de molécules protidiques, par les acides nucléiques, mais aussi par les parois et les membranes bactériennes isolées. La fixation est donc possible in vitro sur les deux enveloppes cellulaires ; nous allons voir s'il en est de même sur les bactéries vivantes.

Fixation sur la paroi : la paroi bactérienne semble n'avoir qu'un rôle de support mécanique, à l'exclusion de toute autre activité cellulaire ; or les études quantitatives de la fixation des histones par les bactéries à 37°C ou à 4°C montrent qu'une certaine quantité du peptide est retenue à 4° par la cellule sans altérer sa vitalité ; il semble logique de penser que les histones se fixent dans ces conditions sur la paroi puisqu'on n'observe pas de lésion cellulaire ; mais les bactéries tuées par exposition au rayonnement ultra-violet inactivent cette même quantité d'histone, quelle que soit la température, donc suivant une réaction semblable à celle des histones avec les protéines ; il faut donc admettre que la fixation, non léthale, au niveau de la paroi n'est pas spécifique et est indépendant

de la température ou de l'activité métabolique de la cellule.

A l'examen en microscopie électronique, les bactéries soumises à l'action des histones à 37°C présentent des modifications de leur surface ; celle-ci est recouverte de substances peu denses qui pourraient être constituées soit par les histones elles-mêmes, soit par les complexes histones-substances cytoplasmiques, les cellules agglutinées étant réunies par des ponts de même nature. Par contre, on n'observe plus ces amas autour des bactéries ni l'agglutination des cellules soumises à l'action des histones à 4°C, alors qu'il y a floculation avec les protéines à cette même température.

Si l'on considère que les masses accolées aux bactéries à 37°C correspondent aux histones seules, l'hypothèse de leur fixation indépendante de la température au niveau de la membrane n'est pas valable, l'aspect des cellules traitées devant être le même quelle que soit la température. Mais on peut penser que la précipitation au niveau des bactéries et leur agglutination sont dues à la fixation des histones sur le matériel cytoplasmique sorti des cellules sous l'action des histones elles-mêmes, cette libération de substances endocellulaires provoquée par lésion de la membrane n'a pas lieu à température basse.

Fixation au niveau de la membrane : nous avons groupé sous cette rubrique les arguments concernant la fixation des histones au niveau de la membrane et du cytoplasme sous jacent ; en effet, les expériences concernant l'action des histones sur le cytoplasme portent essentiellement sur l'inhibition de l'activité d'enzymes or notre connaissance de la topographie enzymatique est insuffisante pour pou-

voir localiser avec certitude tel enzyme dans la membrane ou les parties profondes du cytoplasme. La fixation d'histones, plus importante à 37°C qu'à 4°C accompagnée de troubles de la perméabilité est certainement due à une combinaison des histones au niveau de la membrane. La sortie de pratiquement toutes les substances intracellulaires de faible poids moléculaire est en faveur d'une perméabilisation non spécifique ; il faut noter cependant l'importance des molécules non dialysables de nature protidique qui se trouvent dans le milieu extérieur : les histones, sans créer de déchirures de la membranes, la percent de pores de diamètre suffisant pour permettre le passage de peptides. Ce point de vue est confirmé par l'examen en microscopie électronique des germes traités par les histones à 37°C puis débarassés de leur paroi par le lysozyme ; la pression interne de ces cellules a disparu et on constate une diminution de densité du cytoplasme. Par ailleurs, l'action des histones sur les protoplastes ne provoque pas leur destruction ; les lésions anatomiques causées à la membrane sont donc minimes. Enfin, les mesures de l'activité β-galactosidasique en fonction du temps de traitement par les histones donne une idée des niveaux de fixation successifs du peptide ; l'augmentation de l'activité enzymatique correspondant à la perméabilisation de la membrane au substrat est suivie d'une inhibition due à l'atteinte ultérieure de la protéine enzymatique elle-même par les histones.

Il ne peut donc y avoir aucun doute sur l'attaque directe de la membrane cytoplasmique par les histones. Quant à leur fixation à 37°C liée à l'action bactéricide, elle correspond sans doute à une combinaison au niveau de

./.

la membrane, mais aussi à la précipitation avec des peptides d'origine cytoplasmiques. Le lieu de la réaction de ces peptides avec les histones n'a pu être déterminé, en effet, l'inhibition tardive de l'activité β -galactosidasique peut aussi bien s'expliquer par le cheminement lent des histones à l'intérieur de la cellule, à travers les pores qu'elles ont créés, que par la sortie de la molécule enzymatique et sa destruction par l'antibactérien dans le milieu externe.

Le pouvoir bactéricide des histones est donc dû à des altérations de la membrane cytoplasmique suivies de l'inhibition des systèmes enzymatiques. La suppression de l'activité bactéricide à basse température mérite discussion ; il nous semble que deux hypothèses soient possibles : ou bien les histones ne pourraient se fixer au niveau de la membrane qu'à la faveur du métabolisme actif de la cellule, par exemple, en prenant la place d'un acide aminé basique lors de son renouvellement dans les molécules de surface ; ou encore, la paroi, soumise à des conditions extérieures défavorables, ne laisse plus passer les molécules de poids moléculaires important.

Quant au mode d'action intime des histones, c'es-à-dire la raison pour laquelle une molécule protidique banale est douée d'une telle activité vis-à-vis de la cellule vivante, il nous a semblé qu'il ne puisse être approché que par l'étude comparative de la structure et du mode d'action des divers antibactériens présentant des propriétés semblables vis-à-vis de la cellule bactérienne.

V - COMPARAISON DE L'ACTION DES HISTONES AVEC CELLE D'AUTRES SUBSTANCES BASIQUES ANTIBACTERIENNES

Nous avons voulu comparer le mode d'action des histones avec celui de protéines basiques bactéricides d'origine tissulaire ou de diverses autres substances antibactériennes dont l'activité au niveau de la membrane bactérienne a été déterminée.

PEPTIDES BASIQUES D'ORIGINE ANIMALE

Les propriétés bactéricides de la phagocytine sont étudiées par HIRSCH (65) tandis que MILLER et coll. (107), FISHER et coll. (39) et GRETCHMAN et coll. (49) montrent que la protamine exerce une activité bactéricide et antiphagique accompagnée de l'agglutination des germes (128). Après les travaux de COLOBERT (24) sur le pouvoir protecteur de la protamine sur les protoplastes, MOUSTARDIER et coll. décrivent les modifications morphologiques provoquées par le peptide ajouté à des bactéries en culture (111), puis la formation de sphéroplastes (112). L'activité de la phagocytine est inhibée par la présence des ions magnesium, calcium ou de l'albumine bovine (65), tandis que les substances protidiques les plus diverses empêchent l'action de la protamine (107). Selon MILLER (107), le sulfate de protamine possède un pouvoir bactéricide

./.

maximum à pH 8 et 9 alors qu'il est inactif à pH 5 ; ces constatations sont confirmées par celles de BRANDIS et THOFERN(13)qui montrent que la consommation d'oxygène de Staphylococcus aureus en présence de protamine n'est pas perturbée en milieu acide alors qu'elle devient nulle à pH alcalin ; par contre, GRETCHMAN et coll. (49) estiment que l'action de ce peptide sur le phage ne dépend ni de la température, ni du pH. L'action bactéricide de la protamine, comme celle des histones, serait due à l'inhibition de la respiration et du métabolisme microbien(107), mais THOFERN et coll.(167) pensent que l'activité de la protamine est liée à un processus actif de métabolisme puisqu'elle est sans action sur l'oxydation de substrats par des germes non adaptés à ces substrats.

Donc quoique ces corps n'aient pas été étudiés sous l'angle de leur action au niveau de la membrane cellulaire, on constate cependant une grande similitude dans les propriétés biologiques de la phagocytine, de la protamine et des histones.

MOLECULES BASIQUES ACTIVES SUR LA MEMBRANE BACTERIENNE

Il s'agit principalement de la polymyxine, des polyamines comme la spermine et des ammoniums quaternaires.

Tous ces composés présentent une activité bactéricide intense et sont fixés sur la cellule ; ainsi BLISS et coll. (9) constatent

./.

l'adsorption de la polymyxine par les bactéries sensibles ; les germes résistants fixent des quantités quatre à cinq fois plus faibles d'antibiotique selon NEWTON (116) et FEW et SCHULMAN (36) (37) ; ceux-ci estiment que la quantité de polymyxine fixée est égale à celle nécessaire pour former une couche monomuléculaire autour de la paroi bactérienne. La fixation de la spermidine décrite par RAZIN et ROZANSKY (132) est discutée par BACHRACH et COHEN (3) : le récepteur pourrait être le film lipoprotéique plastique de MITCHELL (108) ou les particules semblables aux lipoprotéines et responsables de l'absorption du bactériophage (2) ; par ailleurs, MAGER (102) montre que les polyamines possèdent une action stabilisante sur les sphéroplastes. Les ammoniums quaternaires sont retenus eux-aussi par les bactéries (139), la quantité fixée est fonction de la concentration du produit.

L'activité bactéricide de la polymyxine est inhibée par le ribonucléate de magnésium (118), les phosphatides du type lécithine (5) (9) (94) et les cations bivalents qui sont dans l'ordre d'activité croissante : le baryum, le calcium, le strontium, le magnésium et l'ion uranyle (116). La température influence l'activité de la polymyxine ; celle-ci est nettement plus bactéricide à 37°C qu'à 10°C (9) ; tandis qu'une quantité importante de substances intracellulaires est libérée à 37°C dans le milieu extérieur par l'antibiotique et rien à 2°C, l'activité des ammoniums

./.

quaternaires ne semble pas influencée par la température (115) ; ceci est confirmé par STEDMAN et coll. (156) qui montrent que les détergents cationiques provoquent la lyse même à 0°C.

L'action directe de ces produits sur la membrane était supposée depuis longtemps (4) ; ces lésions provoquent la sortie de composés bactériens dans le milieu extérieur aussi bien sous l'action de la polymyxine que des détergents cationiques ; seules les méthodes de mise en évidence des produits intracellulaires excrétés diffèrent ; il s'agit soit de la détermination de l'azote et du phosphore minéral (67) (139), des acides aminés (41) (42), du matériel absorbant à 260 mμ (37) (118), soit de l'évaluation de la radioactivité sortie des bactéries ayant intégré préalablement du ^{14}C (156). Les molécules qui ont franchi la membrane sont cependant de tailles réduites puisque les plus grosses correspondant au cytochrome C_3 (129). L'examen morphologique des protoplastes traités antérieurement par les ammoniums quaternaires, indique que ceux-ci ne sont pas sensibles aux chocs osmotiques (117) (169). Le bloquage des systèmes enzymatiques et de la respiration est particulièrement souligné par KNOX (84) et STEDMAN et coll. (156) ; ces auteurs montrent que des concentrations faibles en détergent cationique inhibent la division bactérienne et la respiration alors que la perméabilité cellulaire n'est pratiquement pas lésée. Au contraire la mort cellulaire serait due, selon

./.

NEWTON (115),à une désorganisation physique de la barrière osmotique par les ammoniums quaternaires tandis que la polymyxine agirait par bloquage des systèmes enzymatiques ; les détergents, passant à travers les pores de la paroi, désorganiseraient la membrane ou bien dénatureraient la paroi, dont la structure altérée ne pourrait plus contenir la pression interne (119).

Ces divers travaux permettent de faire les constatations suivantes : les activités biologiques de la phagocytine et de la protamine sont très proches de celles des histones mais leur action sur la membrane bactérienne n'a pas été abordée ; par contre la polymyxine, la spermine ou les ammoniums quaternaires désorganisent les enveloppes cellulaires de façon tout à fait semblable aux histones. Nous avons repris un certain nombre d'expériences qui nous avaient paru particulièrement probantes pour les histones, avec quelques produits antibactériens basiques afin de pouvoir comparer valablement leur mode d'action et nous avons en même temps étudié l'action de la protamine.

SUBSTANCES BASIQUES ETUDIEES

Ce sont le sulfate de protamine (Hoffman - La Roche), le sulfate de polymyxine B (Pfizer - Clin), le chlorure de (dodecanoyl-N'-methylaminoethyl)-(phenyl-carbamylmethyl) dimethyl-ammonium

./.

(G. 22.715 des Laboratoires Geigy) que nous appelons D P D A et un polymère d'ammonium quaternaire, le bromure d'hexadimethrine* (spécialisé par les Laboratoires Abbot sous le nom de polybrène) noté H D dans ce travail. Les techniques utilisées sont les mêmes que celles ayant servi à l'étude des histones, excepté lorsqu'il s'agit de mesurer l'activité bactéricide à froid d'un produit indifférent à l'action des protéines ; l'antibactérien est alors mis en contact avec une suspension bactérienne dense, puis dilué avant numération de telle sorte que sa concentration finale soit nettement inférieure à la concentration bactéricide.

RESULTATS

La comparaison des concentrations minima bactéricides à 100 p. cent des cinq antibactériens en solution dans l'eau, à pH 7,2, mis en contact avec 16 souches microbiennes montre que le H D est le produit le plus actif (moyenne des concentrations minima bactéricides : 5,3 µg par ml) suivi de la polymyxine (9,7 µg par ml), de l'ammonium quaternaire (12,4 µg par ml), du sulfate de protamine (24,8 µg par ml) et enfin de la fraction riche en arginine des histones (25,9 µg par ml).

En présence de suspensions bactériennes denses, on doit augmenter les concentrations des antibactériens pour obtenir un effet bactéricide total ; les courbes de saturation obtenues avec les quatre

* vraisemblablement : poly (bis bromométhylate de diméthyl - 1,5 diaza - 1,5 undécaméthylène)

./.

produits sont identiques à celles données par les histones (cf. figure 1).

On constate sur le Tableau XIII que l'action inhibitrice des ions calcium sur les substances basiques étudiées est semblable, si l'on excepte le H D qui est moins sensible à l'action des ions bivalents ; cependant si la concentration en chlorure de calcium atteint 5.000 µg par ml, on observe en présence de 20 µg de H D par ml, 26 p. cent de bactéries survivantes. Par contre l'inactivation des différents produits par les protéines est variable ; le Tableau XIV montre que l'activité des histones, de la protamine et du H D est bloquée par la peptone, celle du D P D A est faiblement inhibée tandis que la polymyxine ne l'est pas du tout ; seule de cinq produits, la polymyxine ne donne pas de précipitation par mélange avec une solution de protéines banales (peptones ou fraction V d'albumine sérique). Si l'on postule que les différents antibactériens étudiés ont le même effet sur la membrane cellulaire, il ne peut s'agir d'une réaction purement chimique avec les protéines de surface puisque l'un des plus actifs d'entre eux ne précipite pas avec les protéines.

Cependant tous provoquent la sortie de substances intracellulaires dans le milieu extérieur ; ceci est résumé pour les cellules marquées au ^{32}P dans le Tableau XV ; on y constate l'activité plus grande du détergent cationique et la constance de la fraction dialysable des produits marqués retrouvés dans la solution. Les expériences effectuées sur les bactéries marquées au préalable par le ^{14}C donnent des

./.

Concentrations en chlorure de calcium µg/ml	0	100	1.000
Histones	0	58	77
Protamine	0	37	87
Polymyxine	0	5	40
H D	0	0	5
D P D A	0	20	62

TABLEAU XIII

Effet inhibiteur des ions calcium sur l'activité bactéricide des diverses substances basiques employées à la concentration de 20 µg par ml sur E. coli 71.062 ; les résultats sont exprimés en p. cent de bactéries survivantes

	Histones		Protamine		Polymyxine		H D		D P D A	
	concent µg/ml	pouvoir bact.	concent µg/ml	pouvoir bact.	concent µg/ml	pouvoir bact.	concent µg/ml	pouvoir bact.	concent µg/ml	pouvoir bact.
E. coli 36 B	5	0	12,5	0	2	+	5	0	10	0
	10	0	25	0	4	+	10	0	20	0
	25	0	62,5	0	10	+	25	0	50	+
E. coli 57.501	50	0	150	0	10	+	2,5	0	12,5	0
	100	0	300	0	20	+	5	0	25	0
	250	0	750	0	50	+	12,5	0	62,5	+
Ps. aeruginosa 6352	25	0	25	0	2,5	+	5	0	10	0
	50	0	50	0	5	+	10	0	20	0
	125	0	125	0	12,5	+	25	0	50	+

TABLEAU XIV

Effet inhibiteur des protéines sur l'activité bactéricide des diverses substances basiques sur 3 souches bactériennes. Chaque solution d'antibactérien est additionnée d'une solution de peptones à 10.000 µg par ml avant contact avec les germes ; les concentrations soulignées sont les concentrations minimales bactéricides à 100 p. cent en absence de protéines ; 0 signifie l'absence de pouvoir bactéricide ; + correspond à un pouvoir bactéricide total

Substances basiques mises en contact avec les bactéries	radioactivité sortie dans le milieu extérieur par rapport à celle du témoin	p. cent de la fraction dialysable par rapport à la radioactivité sortie dans le milieu extérieur
0	1	78,2
histones	6,9	83,4
protamine	3,5	81,2
polymyxine	5,0	77,2
H D	4,8	86,5
D P D A	9,6	66,3

TABLEAU XV

Passage dans le milieu extérieur des substances intracellulaires marquées au ^{32}P chez E. coli 71.062 après contact avec les divers antibactériens à leur concentration bactéricide ; les résultats de la première colonne correspondent à l'augmentation de la radioactivité sortie sous l'influence des différents produits, par rapport à celle du témoin

résultats semblables pour tous les produits basiques.

Les lésions de la membrane bactérienne sont confirmées par l'étude de l'activité β-galactosidasique en fonction du temps de contact avec les divers antibactériens ; les résultats sont résumés sur le Tableau XVI ; après une augmentation considérable, mais transitoire de l'activité enzymatique, du même ordre de grandeur que celle provoquée par le toluène, l'activité diminue après une heure de contact pour devenir partout nulle après trois heures. Par ailleurs, les cinq produits inhibent l'activité de l'enzyme isolé ; on peut donc faire la même hypothèse que pour les histones : après une augmentation d'activité due à la plus grande perméabilité de la membrane pour le substrat, il y a inhibition due à la pénétration des produits basiques jusqu'à l'enzyme lui-même ; il faut noter que la disparition de l'activité enzymatique est plus rapide en présence de l'ammonium quaternaire ; ceci est sans doute dû à la diffusion plus facile de cette molécule à l'intérieur de la cellule.

L'étude de l'influence de la température sur l'activité bactéricide permet de classer à part le D P D A ; en effet les histones, la protamine, la polymyxine et le H D ne présentent pratiquement plus aucune activité à 4°C, même aux concentrations 100 fois bactéricides ; par contre le détergent cationique garde des propriétés bactéricides à froid, puisqu'il faut seulement doubler les concentrations pour obtenir le même

./.

Substances mises en contact avec les bactéries avant la détermination de l'activité galactosidasique	Temps de contact avec les antibactériens			
	10 minutes	30 minutes	1 heure	3 heures
0	19	19	17	13
Toluène	107	107	104	62
Histones	95	101	33	0
Protamine	68	67	42	0
Polymyxine	103	112	93	0
H D	80	84	31	0
D P D A	107	75	18	0

TABLEAU XVI

Effet des différentes substances basiques sur l'activité β galactosidasique d'E. coli 36 B en fonction du temps de contact

effet à 4°C qu'à 37°C.

Enfin nous avons comparé les sensibilités de 16 souches bactériennes vis-à-vis des cinq produits ; on ne constate aucune sensibilité croisée ; même les histones et la protamine qui sont pourtant de nature chimique très proche, se comportent différemment.

Nous avons donc retrouvé avec nos propres expériences les mêmes résultats que les auteurs précédemment cités, et montré la relation étroite existant entre le mode d'action des histones et celui des quatre autres molécules basiques.

DISCUSSION

Les divers antibactériens basiques présentent avec certitude certains caractères communs dans leur mode d'action vis-à-vis des bactéries à Gram négatif : pour exercer leur pouvoir bactéricide, tous ces composés doivent se fixer en quantités importantes sur la cellule ; cette fixation est inhibée par les ions calcium qui semblent agir par action de masse et ne modifient ni la bactérie, ni les antibactériens. C'est la membrane cytoplasmique qui retient les substances basiques puisque l'on constate des troubles de la perméabilité cellulaire ; la membrane laisse alors passer, sans contrôle, les molécules de poids moléculaires relativement faibles ; il semble que les ammoniums quaternaires provoquent plus rapidement ces lésions que les

./.

autres produits. La mort cellulaire est due soit à la sortie de composés intracellulaires indispensables au métabolisme ou au fonctionnement des enzymes, soit encore à la pénétration des antibactériens qui inhibent alors eux-mêmes l'activité enzymatique.

Par contre, les réactions des différents produits avec les protéines banales sont variables ; alors que les histones, la protamine, le H D précipitent avec les protéines, la polymyxine ne réagit pas,; il semble donc que la fixation sur les protéines des produits basiques soit un phénomènes secondaire n'intervenant pas dans leur activité bactéricide ; or, contrairement aux histones, la polymyxine à 4°C n'est pas retenue par les bactéries à Gram négatif, ceci confirme qu'à cette température il y a fixation non spécifique et non léthale d'une certaine quantité d'histones ou de protamine au niveau des enveloppes cellulaires les plus externes, vraisemblablement, de la paroi, tandis qu'à 37°C une nouvelle quantité d'antibactérien va se fixer sur la membrane et la léser ; seule cette dernière réaction a lieu pour la polymyxine.

Lorsque l'on étudie l'influence de la température sur le pouvoir bactéricide, les ammoniums quaternaires se classent à part ; en effet, ils conservent leur activité à 4°C. On peut penser comme NEWTON (115) que des détergents cationiques désorganisent la membrane par simple action physique tandis que les autres produits basiques bloquent les systèmes enzymatiques puisqu'ils ne touchent que les cellules dont le métabolisme est actif ; mais on peut supposer aussi que la paroi présente la propriété de ne pas laisser passer certaines grosses molécules organiques à 4°C, tandis que la molécule d'ammonium quaternaire, soit du fait de sa petite taille, soit à cause de sa solubilité

dans les lipides, peut encore pénétrer. Cette hypothèse nous paraît fondée ; en effet, nous avons montré par ailleurs (59) que les bactéries à Gram positif présentaient la même sensibilité aux histones et à la polymyxine, quelle que soit la température de contact avec l'agent bactéricide, alors que chez les différents types de bactéries, ces peptides basiques ont une action identique sur la perméabilité cellulaire ; en outre, la quantité d'histones fixées sur le staphylocoque à 4°C ou à 37°C est la même. Il semble donc que la paroi lipidique complexe des bactéries à Gram négatif forme une barrière à la pénétration des peptides basiques, à basse température.

En conclusion, nous avons démontré que les cinq substances étudiées avaient une action semblable sur la cellule bactérienne. Le fait que ces cinq composés soient de poids moléculaire relativement important et de caractère nettement basique permet de dire avec MASSART (104) que les substances basiques présentent un pouvoir bactéricide direct quant elles possèdent un poids moléculaire élevé ou qu'elles l'acquièrent par combinaison. Les différences observées, soit dans leur aptitude à prénétrer dans la cellule, soit dans leur propriété de se combiner avec les protéines, seraient liées à la structure même de la molécule.

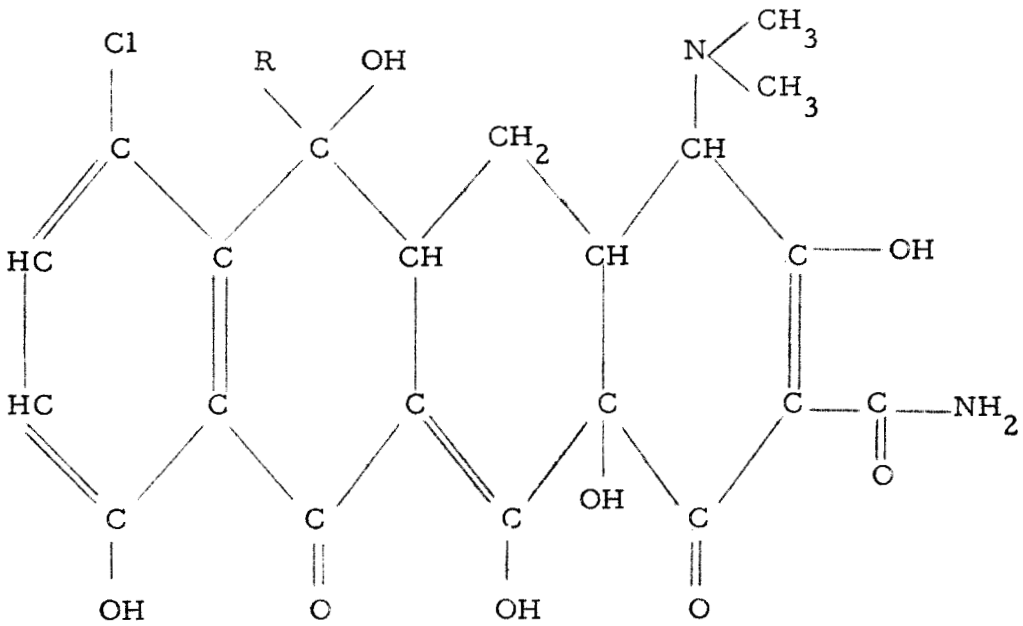
CHAPITRE III

ACTIONS DE LA CHLORTETRACYCLINE * ET DE LA DEMETHYL CHLORTETRACYCLINE ** SUR L'OXYDATION DU GLUCOSE PAR PROTEUS MIRABILIS

ETUDE DE LA RESISTANCE

* Chlortetracycline déposée sous le nom d'Auréomycine (Fig. 1)

** Demethychlortetracycline déposée sous le nom de Mexocine (Fig. 1)



Chlotetracycline R = CH_3

Demethylchlortetracycline R = H

Figure 1

Au cours de travaux antérieurs, OSTEUX, LATURAZE, BURCK et BOULANGER (122) (123) avaient montré que la chlortétracycline inhibait l'oxydation de divers acides organiques par les bactéries. Nous avons repris cette étude en utilisant une souche de Proteus mirabilis ; nos premiers résultats (53) nous avaient indiqué que l'auréomycine à la concentration relativement faible de 75 µg par ml bloquait l'oxydation par ce germe, du glucose et des acides du cycle de Krebs. Nos constatations rejoignaient ainsi celles des auteurs qui avaient montré que l'auréomycine créait des lésions métaboliques situées au niveau de l'oxydation des petites molécules carbonées. En particulier, YEE et coll. (186) (187), YOSHIRO YABE et coll. (188) (189) avaient déterminé que l'auréomycine inhibait l'oxydation du glutamate par Shigella flexnerii et Staphylococcus aureus ; YUWANG et coll. (190), IZUMIHARA (73) étudièrent l'oxydation du glucose et du pyruvate par Escherichia coli et Shigella flexnerii sensibles et résistants à l'auréomycine ; enfin, KRASHIN et STERN (88) avaient montré, chez Escherichia coli, l'inhibition de l'oxydation du gluconate par la terramycine (oxytétracycline).

Cependant, de nombreux auteurs expliquaient de façon toute différente l'action de l'antibiotique. Ainsi, GALE et coll. (43), CASCIO (20) suggéraient que les tétracyclines, aux concentrations bactériostatiques, inhibaient la synthèse des protéines sans entraver celle des acides nucléiques. Le mécanisme exact de cette inhibition restait inconnu (MANDELSTAM et ROGERS - 103).

./.

D'autre part, JOHNSON et COLMER (77) avaient montré que la chlortétracycline inhibait divers systèmes enzymatiques d'oxydation ou de phosphorylation oxydative qui exigent l'ion Mg^{2+}, action empêchée par un excès de Mg. C'est ainsi qu'une nitroréductase bactérienne étudiée par SAZ et coll. (144, 145, 146, 147, 148) était inhibée par l'auréomycine, un excès d'ion Mn^{2+} bloquant la réaction ; le même système enzymatique, extrait de bactéries résistantes était beaucoup moins sensible à l'auréomycine, mais était également inhibé par divers produits de dégradation de l'antibiotique qui sont dépourvus de tout effet antimicrobien.

C'est pourquoi notre intention, dans ce travail n'est pas d'essayer de définir le mode d'action de l'auréomycine ; la détermination du mécanisme de l'action d'un antibiotique bactériostatique est en effet pratiquement irréalisable, ces substances agissant en bloquant toute une série de réactions enzymatiques, or il n'est pas possible de déterminer actuellement la réaction inhibée qui provoque l'arrêt de la division du germe.

Nous nous sommes limités à l'étude d'une chaîne de réactions enzymatiques sensible à l'auréomycine, chez Proteus mirabilis, nous attachant à démontrer comment l'antibiotique inhibe ce système et de quelle manière les germes résistants peuvent se développer grâce à une déviation de leurs voies métaboliques habituelles.

./.

TECHNIQUES UTILISEES

1) Cultures bactériennes

Nous avons employé au cours de notre travail un Proteus de l'espèce mirabilis, souche Ahmed. Les cultures stock sont entretenues sur gélose nutritive. Avant d'être ensemencées sur milieux liquides, elles sont repiquées sur ces mêmes milieux. Nous avons utilisé le milieu complexe B.P.C. liquide, précédemment décrit, ajusté à pH 7,4, réparti à raison de 250 ml par fiole stérile de 550 ml, autoclavé à 115°C pendant 20 minutes.

Le glucose peut être remplacé par les divers substrats en quantité telle que les concentrations en carbone soient équivalentes; nous avons, pour des raisons matérielles, utilisé un mélange de pyruvate et d'aspartate au lieu d'oxaloacétate, et un mélange de pyruvate et de glutamate au lieu d'α-cétoglutarate. Nous avons d'autre part employé un milieu synthétique liquide, dont la seule source de carbone est un des substrats du cycle citrique. Dans ce milieu, décrit ci-dessous, la nicotinamide , seul facteur de croissance indispensable à Proteus mirabilis, a été complétée par de l'extrait de levure. En effet, de nombreux essais nous ont montré que notre souche de Proteus en présence de nictotinamide seule, se développait très lentement et seulement dans le cas d'un inoculum important. Nous avons vérifié que la faible dose d'extrait de levure ajoutée pour permettre à la culture de commencer à se développer, ne pouvait interférer en aucune façon avec la source de carbone. Lorsque celle-ci manque,

./.

la croissance bactérienne en présence de l'extrait de levure correspond au maximum au 1/200 de celle observée en présence de glucose. Ce milieu synthétique est composé d'une solution de base (50 p. cent en volume) additionnée stérilement de la solution du substrat carboné (10 p. cent). La solution de base contient :

$PO_4 K_2 H$	4,5 g
$PO_4 KH_2$	0,5 g
$Cl NH_4, 7 H_2 O$	1 g
$SO_4 Na_2$	0,2 g
Ext. de levure Difco	0,1 g
Nicotinamide	1 mg
Eau distillée	500 ml

ajusté à pH 7,4, autoclavé à 115°C pendant 20 minutes.

Les différentes sources de carbone utilisées sont les acides du cycle citrique neutralisés, ou du glucose en solutions à 10 p. cent.

Les cultures sur citrate et surtout acétate sont longues à obtenir, et la durée de culture influe sur le pH qui tend alors vers l'alcalinité. Cependant, après une durée moyenne d'incubation de 30 heures, le pH reste dans une zone comprise entre 6,5 et 7,5. Ces limites devront être respectées si l'on veut éviter la destruction de l'auréomycine lors de la culture des germes résistants. Les cultures sur glucose provoquent une acidification du milieu (pH final situé entre 6,1 et 5,4). Pour isoler des germes résistants en présence de glucose, nous avons donc dû tamponner plus fortement en augmentant la teneur en phosphate de notre milieu de culture. Pour un volume final de 5 ml, le milieu

est alors composé de la façon suivante :

Eau distillée.....	3,5 ml
Sol. glucose 10 %.....	0,25 ml
Sol. phosphate dipotassique à 25 p. cent à pH 8	0,40 ml

Dans ces conditions, nous avons obtenu des cultures de Proteus mirabilis, en présence de glucose, sur milieu liquide, dont le pH demeure aux environs de 7 en fin de culture. Ces précautions de culture de Proteus mirabilis sur milieu synthétique, en présence de chacun des substrats du cycle citrique, prennent toute leur importance dans l'étude des souches résistantes à l'auréomycine.

Pour étudier les caractères culturaux des souches résistantes à l'auréomycine, nous avons utilisé des milieux solides obtenus en ajoutant de la gélose Difco (1,2 p. cent) aux milieux synthétiques décrits ci-dessus, et un indicateur de pH, la phénol-sulfone-phtaleine à la concentration de 18 µg par ml ; les solutions d'auréomycine et de substrat carboné ne sont ajoutées qu'au moment de couler la gélose en boîte de Pétri, les milieux étant maintenus à 48°C.

2) Techniques biochimiques

a- Préparation des bactéries

Les cultures sont centrifugées à 5.000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C. Le culot de centrifugation est lavé 2 fois avec une solution isotonique de Cl K à pH 7,2 et repris par la solution de Cl K de façon à ce qu'une dilution au 1/40 de la suspension obtenue ait une densité optique de

l'ordre de 0,60 mesurée à 650 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur à l'aide de notre photomètre. Cette suspension comprend $2,4 \times 10^{10}$ germes vivants par ml, correspondant à 3,3 mg d'azote bactérien mesuré par la méthode de Kjeldahl.

b- Etude de la respiration cellulaire

Les échanges gazeux sont mesurés en appareil de Warburg à 37°C sous 'atmosphère d'air, en tampon phosphate 0,14 M à pH 7,2 ; chaque fiole contient selon les expériences 1 à 1,5 mg d'azote bactérien ; les divers inhibiteurs sont ajoutés au temps zéro ; le substrat (5 micromoles) contenu dans le diverticule latéral est versé après 2h 30 d'agitation dans les conditions décrites

c- Détermination des produits de métabolisme

Les acides cétoniques sont isolés sous forme de leur 2-4 dinitrophénylhydrazone, dosés selon la méthode de FRIEDEMANN et HAUGEN (40)et séparés suivant la technique d'ISHERWOOD (68) ; les dosages et chromatographies d'acides volatils sont effectués selon notre technique(50) sur des fioles contenant 500 μM de substrat, les conditions expérimentales, toutes proportions gardées, étant identiques à celles réalisées en fiole de Warburg. Pour la détermination des acides organiques fixes, le contenu de chaque fiole est additionné d'éthanol de telle sorte que la concentration finale soit de 75 %, et maintenu 1 heure à 45°C. Après centrifugation, le surnageant est passé sur colonne d'amberlite IR 4 B; puis soumis à la chromatographie bidimentionnelle selon la technique de OSTEUX et LATURAZE (124); mais l'identification des acides orga-

./.

niques fixes au moyen de la chromatographie bidimentionnelle sur papier présentait l'inconvénient majeur de devoir être précédée de l'élimination des ions minéraux. C'est pourquoi nous avons ensuite utilisé une technique décrite récemment par OSTEUX et coll. (125), en couplant la séparation électrophorétique à voltage moyen et la chromatographie sur papier.

Ces techniques ont été complétées par l'emploi des isotopes radioactifs ; nous avons utilisé :

le glucose ^{14}C, uniformément marqué (C.E.A.)
le glucose 1 ^{14}C (Amersham)
le glucose 6 ^{14}C (Amersham)
le succinate ^{14}C-1 (C.E.A.)
le pyruvate ^{14}C-2 (Amersham)
l'acétate ^{14}C-1 (C.E.A.)
le carbonate ^{14}C (C.E.A.)

Pour préciser les résultats de l'étude de la respiration cellulaire, les radioisotopes ont été employés en fiole de Warburg, en dilution telle que l'on a utilisé par fiole 2 μC pour 5 μM de substrat ; la radioactivité du gaz carbonique, capté par la potasse centrale, a été mesurée sous forme de carbonate de barium après étalement en couche mince par filtration sur papier Wathman N°1. Les produits de dégradation ont été déterminés par électrochromatographie et évalués après élution puis étalement en couche mince sur plaques d'aluminium.

Afin de tenter de déterminer les produits intermédiaires du métabolisme, nous avons utilisé les radio-éléments avec leur activité spécifique maxima, en présence d'une suspension bactérienne épaisse : 0,2 ml d'une sus-

pension de Proteus mirabilis, correspondant à 5×10^{11} germes par ml sont ajoutés à 0,2 ml d'une solution contenant 2 µC du corps radioactif en tampon phosphate 0,15 M pH 7,2. Suivant les cas, l'auréomycine est ajoutée aux bactéries à la dose de 8.000 µg/ml. Après un temps de contact variable suivant les expériences, avec agitation constante, la réaction est arrêtée par addition de 1,6 ml d'alcool absolu. La suspension est alors portée une heure à 45°C et centrifugée. Le surnageant est évaporé à sec sous courant d'azote et déposé en une seule tache de départ. On pratique alors une électrochromatographie suivie d'une autoradiographie.

I - PREUVES DE L'EXISTENCE D'UN CYCLE TRICARBOXYLIQUE CHEZ PROTEUS MIRABILIS

EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Les résultats des études des échanges gazeux en appareil de Warburg sont rapportés dans le tableau I où la deuxième colonne exprime la consommation totale d'oxygène pour 5 micromoles de substrat, les germes ayant été cultivés sur glucose ; ces résultats sont exprimés en micromoles d'oxygène consommé après avoir défalqué les chiffres de respiration endogène donnés par un témoin. Ils ne sont établis que lorsque la consommation d'oxygène devient nulle, autrement dit quand le substrat a été entièrement épuisé, ce qui a été contrôlé par chromatographie. Sauf pour le citrate, les consommations d'oxygène notées (colonne 2) ne sont que légèrement inférieures aux quantités théoriques d'oxygène nécessaires pour l'oxydation totale des substrats (colonne 1). Cette différence pourrait rendre compte des processus de synthèse qui peuvent consommer une partie du substrat. La comparaison entre les 2 colonnes de chiffres montre donc que tous les substrats du cycle citrique essayés sont oxydés convenablement par *Proteus mirabilis*, excepté le citrate.

Lorsque l'on étudie les vitesses d'oxydation de certains substrats tels que le citrate et l'acétate, on remarque que celles-ci sont très nettement inférieures à celles des autres substrats. Les courbes représentées

SUBSTRATS	O_2 théorique pour l'oxydation totale	Consommation d'O_2 totale	
		Culture sur glucose	Culture sur substrat correspondant
Glucose.....	30	22,8	22,8
Pyruvate.....	12,5	8,5	10,9
Acétate.....	10	7,4	8,7
Citrate.....	22,5	9,9	12,2
α-cétoglutarate.....	20	résultats inconstants	
Succinate.....	17,5	12,7	12
Fumarate.....	15	10,9	12,6
Malate.....	15	9,5	11,9
Oxalacétate.....	12,5	résultats inconstants	11,2

Les nombres représentent la moyenne de 4 séries d'expérience. Les résultats sont exprimés en micromoles d'oxygène consommées après avoir défalqué les chiffres de respiration endogène donnés par un témoin.

Ces résultats ne sont établis que lorsque la consommation d'oxygène en présence du substrat devient nulle, le temps de contact variant entre 1 heure et 3h30.

TABLEAU I

Influence de la nature de la source de carbone du milieu de culture sur la consommation d'oxygène en présence de 5 micromoles de substrat

sur la fig. 2 donnent la quantité d'oxygène consommée en fonction du temps. Lorsque les germes ont été cultivés en présence de glucose, les courbes à l'origine sont logarithmiques ; ceci correspond au schéma de synthèse d'un enzyme adaptatif ; il est difficile de penser que les systèmes enzymatiques de l'oxydation du citrate ou de l'acétate ne soient pas préformés après culture en présence de glucose : en effet, tous nos résultats montrent que l'oxydation du glucose par Proteus mirabilis passe normalement par l'acide citrique. Il s'agit donc certainement d'une question de perméases inductibles semblables à celles décrites pour les β -galactosides par RICKENBERG et coll. (135) et pour les acides du cycle citrique par CLARKE et MEADOW (23).

Ces considérations nous ont amenés à effectuer les cultures sur milieux dont la source principale de carbone est celle qui sera étudiée en appareil de Warburg. La comparaison entre les chiffres des colonnes 2 et 3 du tableau I indique que dans tous les cas, la consommation d'oxygène est plus importante lorsque P. mirabilis a été cultivé en présence du substrat correspondant. Ces résultats sont constants quel que soit le milieu de base utilisé pour la culture qu'il s'agisse du milieu B.P.G. ou du milieu synthétique. D'autre part, l'examen des courbes de la figure 2 montre que la vitesse d'oxydation du substrat carboné est constante quand le germe a été cultivé en présence de ce même substrat. Un système de perméation inductible préside certainement à la pénétration de l'acétate et du citrate chez P. mirabilis.

P. mirabilis oxyde donc les divers substrats de la chaîne

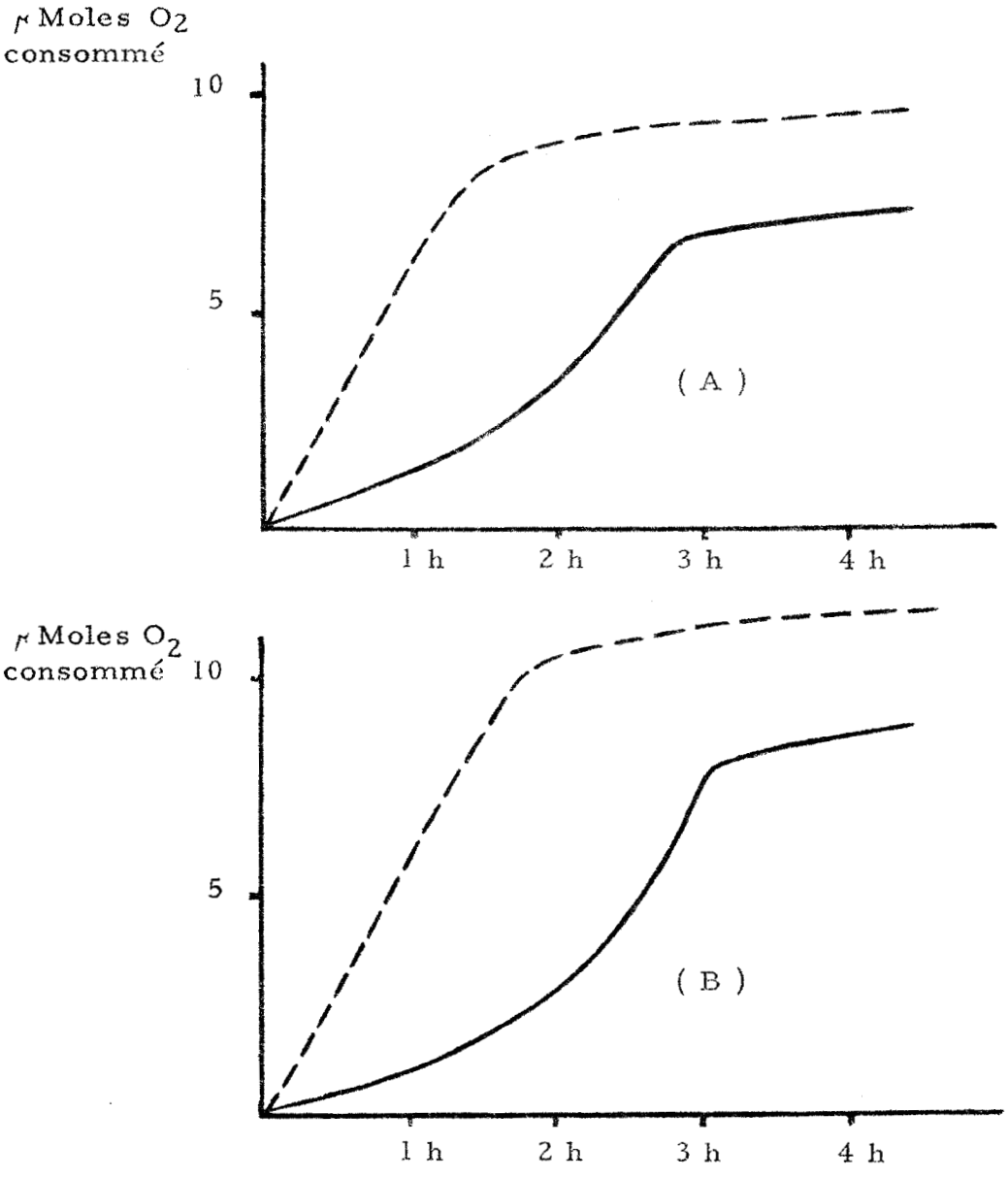


Figure 2

Cinétique de la consommation d'oxygène en présence de 5 micromoles d'acétate (A) ou de 5 micromoles de citrate (B) ; en pointillés : bactéries cultivées sur le substrat étudié en appareil de Warburg ; en trait plein : bactéries cultivées sur glucose

de dégradation du glucose, faisant partie du cycle citrique. Ceci plaide en faveur de l'existence d'un cycle tricarboxylique chez ce germe. Par ailleurs, les substrats qui ne font pas partie du cycle ne sont pas oxydés ; nous avons essayé en appareil de Warburg les acides organiques proches des acides du cycle de Krebs parmi lesquels : les acides α-céto-adipique (*), tartrique et glyoxylique ; ils ne sont pas métabolisés ; les acides di-hydroxytartrique, di-hydroxyfumarique, glycolique et mesoxalique sont très faiblement oxydés, mais dans une proportion qui n'est pas comparable avec celle des acides du cycle de Krebs.

ETUDE DES PRODUITS DE DEGRADATION

1) Emploi des inhibiteurs

Les expériences ont été effectuées en fioles de Warburg de grand volume (30 ml environ). Les identifications sont faites par chromatographie bidimentionnelle sur le contenu de la fiole entière. Les inhibiteurs utilisés ont été : l'arsénite de potassium 1.10^{-1}M et 1.10^{-3}M, le cyanure de potassium, l'azide de sodium et le fluoracétate, aux mêmes concentrations.

On constate qu'en l'absence d'inhibiteur et en présence de cyanure, il n'a été possible d'identifier que l'acide lactique, en faibles quantités ; avec l'arsénite et l'azide de sodium, il est trouvé de plus, mais de façon inconstante, une tache correspondant au succinate ; enfin, en présence de fluoracétate,

---

(*) Nous remercions Monsieur GUINGNET, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille, pour la synthèse qu'il a aimablement effectuée.

outre le lactate apparaît une tache importante de citrate en même temps que des traces de malate et de succinate. Nous discuterons ultérieurement de l'accumulation du malate et du succinate en présence d'un inhibiteur de la dégradation du citrate. En présence d'inhibiteurs, on trouve donc accumulés certains des intermédiaires du cycle citrique. Ceci est en faveur de l'existence du cycle, mais l'emploi des inhibiteurs met la cellule dans des conditions artificielles qui ne permettent pas d'affirmer que les voies suivies en leur présence soient les mêmes que celles utilisées normalement. C'est pourquoi nous avons utilisé, pour suivre la chaîne des réactions, le glucose U ^{14}C.

2) Intégration du glucose U^{14}C dans le cycle

En variant le temps de contact des bactéries avec le glucose, on peut suivre sur les autoradiogrammes successifs la transformation du glucose et l'apparition des différents constituants du cycle citrique ; comme nous pouvons le voir sur la planche III, lorsque l'intégration dure une minute (électrochromatogramme 1), seuls apparaissent sur la plaque photographique le glucose, le citrate, l'aspartate et les traces de malate, de glutamate et d'alanine ; l'oxalacétate, trop labile, se décompose immédiatement, il semble responsable de l'apparition de l'aspartate et du malate en raison de la réaction réversible qu'il présente avec le dernier ; le glutamate et l'alanine correspondent vraisemblablement à la formation de traces d'acides α-céto-glutarique et pyruvique.

Si le contact dure deux minutes, tous les substrats du cycle sont présents ; en particulier les acides succinique et fumarique apparaissent

(électrochromatogramme 2 de la planche III).

L'ordre d'apparition des divers acides permet de faire figurer sur le schéma de la figure 3 la chaîne de dégradation du glucose, en aérobiose, par P. mirabilis ; en traits doubles, les réactions effectuées durant la première minute de contact, dans nos conditions expérimentales, en trait simple celles effectuées durant la deuxième minute. Le passage du pyruvate à l'oxalacétate au moyen de la réaction de Wood Werkman est démontré par l'intégration du $^{14}CO_2$ en présence de pyruvate, dans les acides aspartique et malique.

VOIES DE LA DEGRADATION DU GLUCOSE

La dégradation du glucose marqué spécifiquement sur le carbone 1 ou le carbone 6, permet de déterminer quelles voies sont utilisées pour parvenir au pyruvate et en particulier quelle est l'importance relative de la voie des pentoses.

Le tableau II donne la cinétique de la consommation d'oxygène et de la formation de gaz carbonique, provenant de l'un ou l'autre carbone du glucose initial ; ces expériences en présence des différents substrats marqués sont réalisées en même temps en fioles de Warburg, dans des conditions identiques, cependant les vitesses de réaction ne sont pas toujours les mêmes, sans que nous puissions en discerner la cause ; les résultats portés sur le tableau II correspondent à la moyenne de cinq expériences successives.

./.

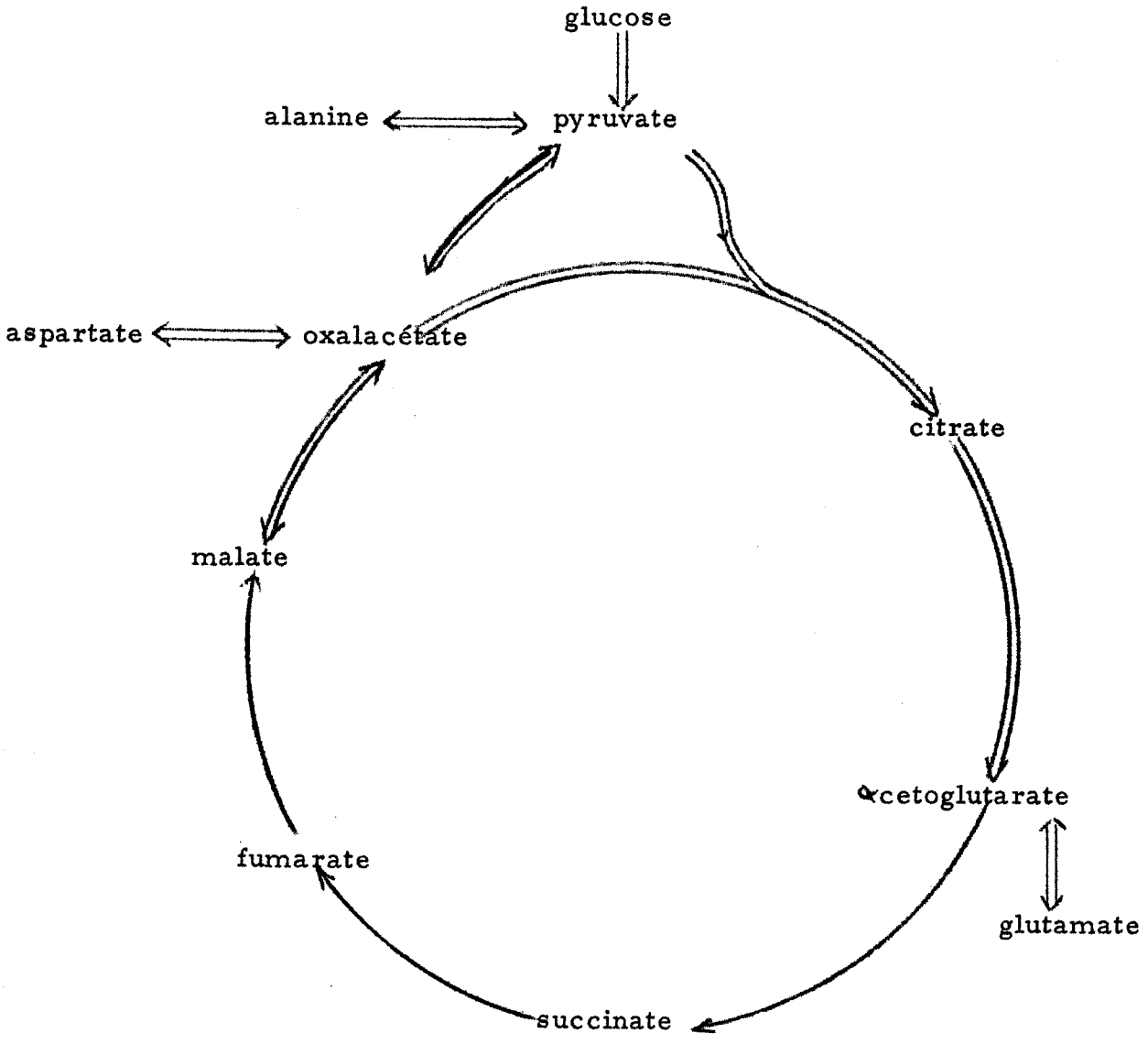

glucose
alanine
pyruvate
aspartate
oxalacetate
citrate
malate
α-cetoglutarate
fumarate
glutamate
succinate

Figure 3

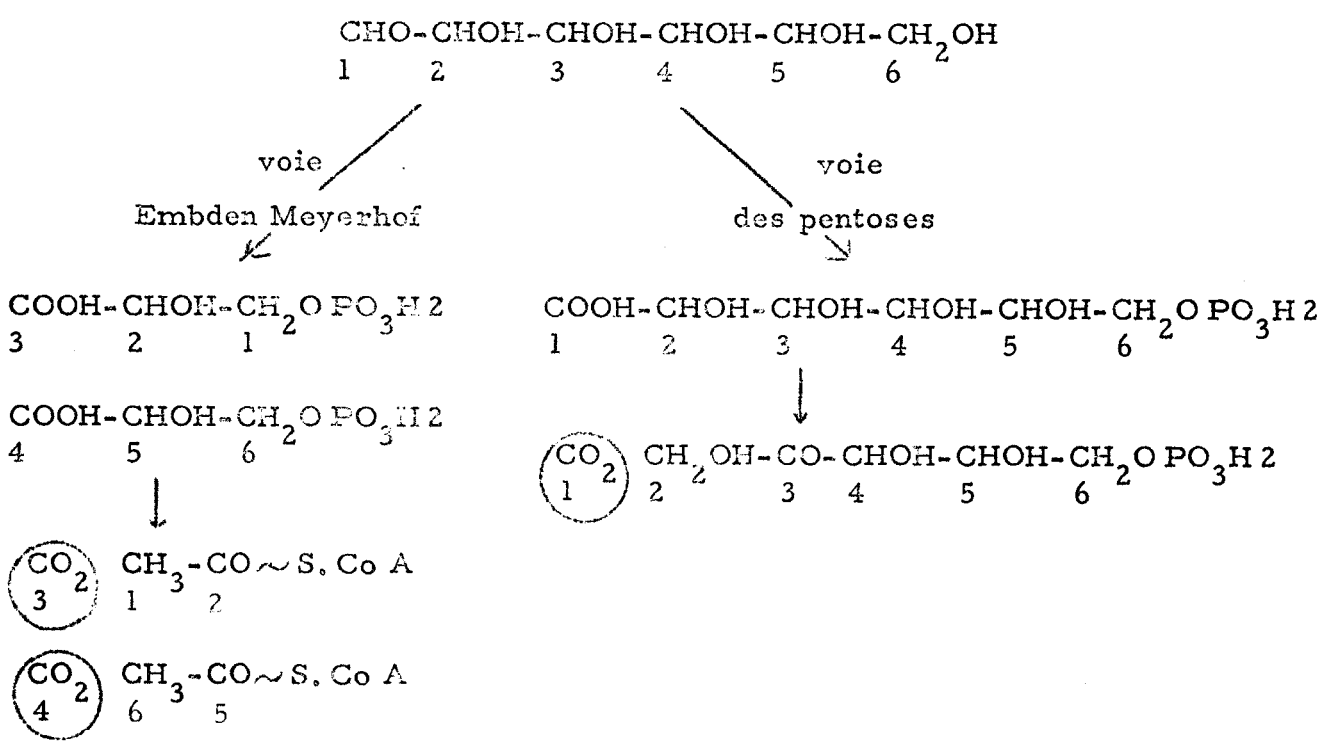
	15 minutes		30 minutes		fin de réaction (2 heures 30)	
	$^{14}CO_2$	O_2	$^{14}CO_2$	O_2	$^{14}CO_2$	O_2
Glucose $1^{14}C$	20,9	19,3	28,0	41,8	66,1	65,4
Glucose $6^{14}C$	10,9	20,1	26,5	41,5	69,5	64,7
Glucose $U^{14}C$	36,0	22,5	50,2	44,2	65,8	68,2

TABLEAU II

Cinétique de la formation de $^{14}CO_2$ et de la consommation d'oxygène à partir de glucose marqué ; les nombres expriment, pour le CO_2 : le pourcentage de radioactivité retrouvée par rapport à la radioactivité initiale du glucose ; pour l'oxygène : le pourcentage d'oxygène consommé par rapport à l'oxygène nécessaire pour une oxydation totale

On constate, quel que soit le marquage initial du glucose, que les proportions d'oxygène consommé et de CO_2 dégagé sont les mêmes en fin de réaction ; ceci suggère que toutes les molécules de glucose dégradées le sont totalement jusqu'au stade de CO_2 ; la radioactivité non retrouvée, correspondant à environ 35 p. cent du glucose initial, est pour la plus grande partie incorporée dans les cellules bactériennes.

La cinétique de la formation du CO_2 montre que dans les premières minutes, une proportion importante du CO_2 provient du carbone 1 du glucose ; il y a donc vraisemblablement passage de 10 p. cent du glucose initial par la voie des pentoses : en effet dans ce cas la dégradation du glucose n'est pas symétrique comme lors du passage par la voie d'Embden Meyerhof.



Cependant la dégradation par la voie des pentoses rejoint la voie glycolytique au niveau des trioses phosphates, car la proportion de CO_2 provenant du glucose uniformément marqué est toujours plus grande que celle venant du carbone 1. Enfin après quelques temps on observe une égalisation des proportions de CO_2 des diverses origines correspondant à une oxydation complète au niveau du cycle de Krebs.

Ces résultats quantitatifs complètent les conclusions apportées par l'étude qualitative des intermédiaires de la dégradation du glucose : à savoir que pratiquement tout le sucre catabolisé passe par le cycle citrique.

II - INHIBITION DE L'OXYDATION DU GLUCOSE PAR LA CHLORTETRACYCLINE *

EXPERIENCES PRELIMINAIRES

La souche de Proteus mirabilis utilisée ne se développe pas en présence de 2 µg de l'antibiotique par ml de milieu nutritif liquide (milieu synthétique ou milieu B. P. G.) durant une incubation de 18 heures à 37° C. Les bactéries se divisent normalement dans les mêmes conditions en présence de 1 µg d'auréomycine par ml. Dans nos expériences préliminaires, nous avons utilisé l'antibiotique à la dose de 75 µg par ml, compte tenu des fortes concentrations en bactéries employées.

1) Action de l'auréomycine sur l'oxydation des divers substrats :

Dans la fiole de Warburg qui contient la suspension bactérienne, l'auréomycine à la concentration de 75 µg/ml est ajoutée au temps zéro. Les substrats contenus dans le diverticule latéral sont versés après 2 h 30 de contact. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III où sont comparés d'une part les consommations d'oxygène en présence de substrat et d'auréomycine, et d'autre part les chiffres théoriques représentant l'oxygène nécessaire pour une oxydation totale.

La comparaison de la colonne 1 et des colonnes 2 et 3 du

* Il s'agit de chlorhydrate d'Auréomycine Rhône-Poulenc

./.

SUBSTRATS	O_2 théorique pour l'oxydation totale	Culture sur glucose	Culture sur substrat correspondant
Glucose.....	30	6,9	6,9
Pyruvate.....	12,5	2,5	2,9
Acétate.....	10	0,6	0,2
Citrate.....	22,5	1	2,5
α-cétoglutarate..	20	résultats inconstants	
Succinate.....	17,5	2,5	4,6
Fumarate.....	15	1,7	2,8
Malate.....	15	0,6	2,2
Oxalacétate.....	12,5	résultats inconstants	1,8

Les nombres représentent la moyenne de 4 séries d'expérience. Les résultats sont exprimés en micromoles d'oxygène consommées. Les chiffres obtenus sont calculés de façon identique à celle utilisée précédemment dans l'établissement du tableau I.

TABLEAU III

Consommation d'oxygène en présence de 5 micromoles de substrat et d'Auréomycine 75 μg par ml

tableau III ainsi que celle du tableau I avec le tableau III montre l'action inhibitrice nette de l'auréomycine sur les processus d'oxydation des différents substrats ; on peut remarquer que cette inhibition est variable suivant ceux-ci. La respiration en présence d'auréomycine correspond à 23% de la respiration théorique en présence de glucose ou de pyruvate ; par contre, elle est très faible avec le citrate, elle correspond en présence d'auréomycine à 11% de la respiration théorique.

La respiration en présence d'auréomycine des germes cultivés avec du glucose comme source principale de carbone (tableau III, colonne 2) est généralement plus faible que celle des germes cultivés en présence du substrat correspondant (colonne 3). Ces résultats indiquent que l'auréomycine n'agit certainement pas sur l'oxydation des substrats en diminuant la perméabilité de la membrane cellulaire à ces substrats.

2) Action de l'auréomycine sur la respiration endogène.

La respiration endogène correspond à la consommation d'oxygène en l'absence de substrat. Les chiffres de consommation d'oxygène en présence du substrat sont calculés dans nos expériences en retranchant le chiffre du témoin. Si l'on étudie les courbes de respiration endogène de *Proteus mirabilis* (fig 4) cultivé sur glucose, on constate que celle-ci augmente considérablement en présence d'auréomycine dans les premiers temps de l'expérience. Ce fait se retrouve également quand les germes sont mis en présence de pyruvate. Par contre, avec tous les autres substrats, la respiration endogène est diminuée en présence d'auréomycine dès

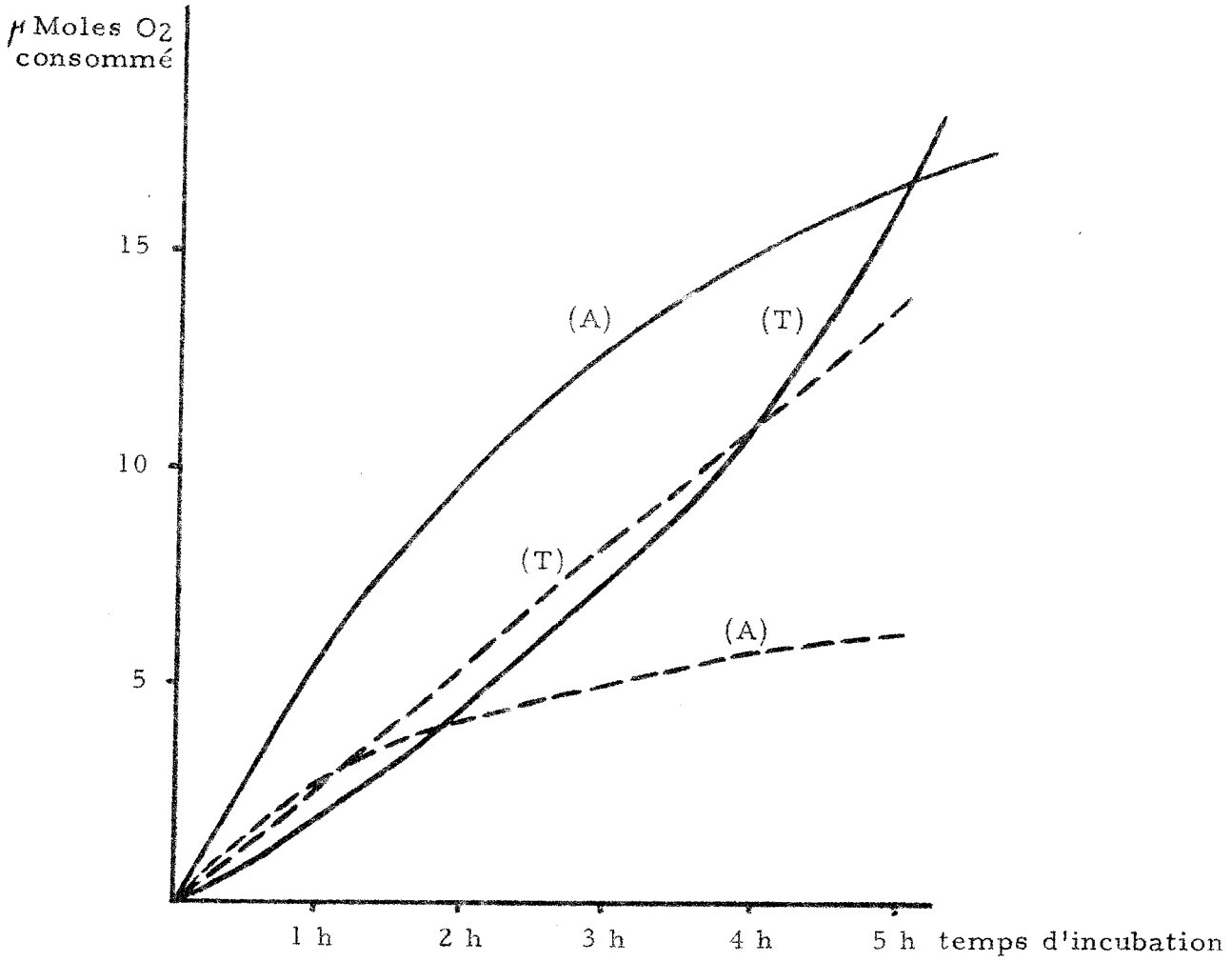


Figure 4

Influence de la chlortétracycline (50 μg/ml)
sur la respiration endogène, mesurée en fioles de Warburg
en traits pleins : souche cultivée en présence de glucose
en pointillés : souche cultivée en présence de citrate
T : suspension bactérienne en absence d'antibiotique
A : suspension bactérienne en présence d'antibiotique

le début de l'expérience, comme il est indiqué sur la figure 4 pour les bactéries cultivées sur citrate.

Ces expériences préliminaires nous ont amenés à n'ajouter le substrat qu'après 2 h 30 de contact entre les bactéries et l'antibiotique : en effet, à ce moment, la respiration endogène est diminuée, le nombre trouvé par soustraction de la fiole contenant le substrat est donc entaché d'une erreur plus faible.

3) Choix des concentrations en auréomycine

Nous avons étudié l'oxydation de divers substrats en présence de concentrations croissantes d'auréomycine, par des suspensions de P. mirabilis cultivé sur les substrats correspondants. Le tableau IV exprime les pourcentages d'inhibition de la consommation d'oxygène. Il permet de classer les substrats en 2 groupes :

- le premier groupe comprend le glucose, le pyruvate et l'acétate. L'oxydation de ces substrats est déjà fortement diminuée en présence de seulement 25 µg/ml d'auréomycine (colonne 1). De plus, le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène augmente lorsque l'on passe du glucose au pyruvate, puis à l'acétate.

- le deuxième groupe comprend les acides di et tricarboxyliques dont l'oxydation, peu influencée par les concentrations faibles d'antibiotiques, est fortement ralentie par des doses plus élevées (75 µg/ml).

./.

SUBSTRATS	CONCENTRATIONS EN AUREOMYCINE			
	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
Glucose.....	24	55	70	73
Pyruvate.....	39	75	74	70
Acétate.....	58	97	98	98
Citrate.....	10	78	80	85
Succinate.....	3	62	62	60
Fumarate.....	9	58	78	76
Malate.....	2	53	82	82
Oxalacétate.....	9	70	84	80

0 représente une inhibition nulle
100 représente une inhibition maximum.

TABLEAU IV

Pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène de "Proteus mirabilis" cultivé sur le substrat étudié

ETUDE DES PRODUITS DE DEGRADATION DU GLUCOSE EN PRESENCE D'AUREOMYCINE

Nous avons voulu préciser en quel point du catabolisme du glucose agit l'auréomycine. En l'absence de l'antibiotique, nous avons vu que l'utilisation du glucose, de l'acétate et du pyruvate est pratiquement complète ; les consommations d'oxygène sont respectivement de 76, 87 et 87 % de celles calculées théoriquement pour une oxydation totale. Quand on utilise du glucose $U^{14}C$ en appareil de Warburg, la totalité de la radioactivité est retrouvée, aux erreurs d'expérience près, dans le gaz carbonique (70 p. cent), des traces d'acide lactique et les corps bactériens. Donc le glucose, en absence d'inhibiteur, est brûlé jusqu'au stade ultime du CO_2.

Au contraire, en présence de 75 μg d'auréomycine par ml, une fraction importante du glucose est transformée en acétate qui s'accumule. La cinétique de la formation du pyruvate et de l'acétate est schématisée sur la figure 5 : dans un premier temps, le glucose disparaît rapidement en donnant du pyruvate ; celui-ci s'accumule, sa vitesse d'oxydation en acétate étant plus faible que celle de la dégradation du glucose ; après trente minutes, au contraire 75 % du glucose étant consommés, la vitesse de sa transformation en pyruvate diminue alors que celle de la réaction pyruvate $\longrightarrow$ acétate est maxima ; la quantité de pyruvate décroît donc.

En présence d'auréomycine, l'oxydation de 5 micromoles de glucose a consommé environ 8 micromoles d'oxygène ; 38 % du glucose ont

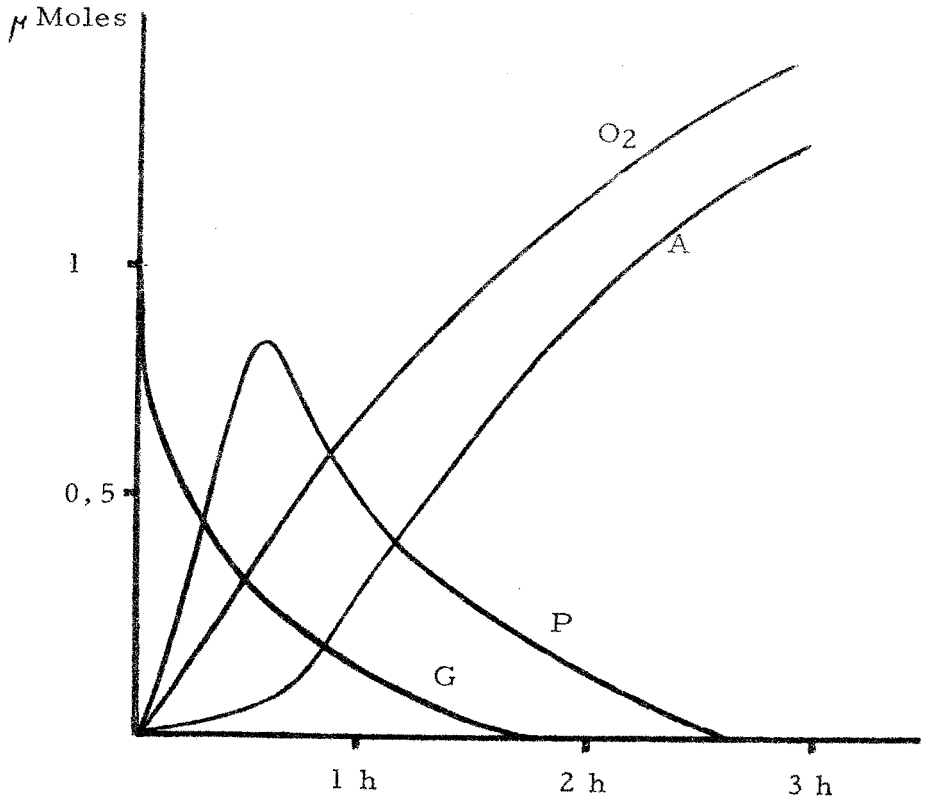


Figure 5

Cinétiques de la formation de l'acétate (A)
et du pyruvate (P), de la dégradation du glucose (G)
et de la consommation d'oxygène (O_2) par les bactéries
en présence de 75 μg/ml de chlortétracycline
et de glucose (1 μ Mole)

donné de l'acide acétique, et en fin de réaction, la radioactivité est retrouvée dans le lactate (28 p. cent de la radioactivité du glucose initial) et le gaz carbonique (30 p. cent) ; par autoradiographie, on constate que trois acides du cycle de Krebs sont marqués : les acides succinique, fumarique et malique ; ceux-ci n'apparaissent qu'en fin de réaction, leur proportion est faible et leur présence inconstante.

Le processus de dégradation du pyruvate en présence d'auréomycine est identique à celui du glucose ; le pyruvate est entièrement transformé en acétate, malate, fumarate et succinate. Enfin, l'acétate $1^{14}C$, en présence d'auréomycine, ne conduit à aucun acide organique ni au CO_2 marqué.

Ces résultats permettent de concevoir la dégradation du glucose en présence d'auréomycine de la façon suivante : 1/4 du glucose donne de l'acide lactique tandis que les 3/4 sont oxydés en pyruvate. Celui-ci subit pour les 4/5 une oxydation conduisant à l'acétate et au CO_2. Deux voies sont ensuite possibles pour expliquer la formation des acides dicarboxyliques : la condensation de deux molécules d'acide pyruvique restant, pour former le succinique ou plutôt le transfert d'une molécule de CO_2 sur le pyruvique pour donner l'oxalacétique ; ce dernier acide est trop labile pour être retrouvé par électrochromatographie mais les témoins de sa présence sont les acides dicarboxyliques. Cette dernière voie existe vraisemblablement chez Proteus mirabilis en effet, l'incubation du germe en présence de pyruvate et de $^{14}CO_3Na_2$, donne lieu à une formation faible, mais nette, des divers acides dicarboxyliques.

ETUDE DES PRODUITS DE DEGRADATION DU GLUCOSE EN PRESENCE DE FLUORACETATE

Nous avons employé le fluoracétate afin de bloquer le cycle au niveau du citrate comme YEE et coll. (187) l'ont montré chez Shigella flexneri. En effet, le fluoracétate inhibe les transformations ultérieures de l'acide citrique. Nous avons constaté qu'en présence de fluoracétate à la concentration de 10^{-1} M, P. mirabilis forme du citrate à partir du glucose, les acides dicarboxyliques se trouvant à l'état de traces. Nous avons pensé que l'action couplée du fluoracétate et de l'auréomycine devait empêcher la synthèse de l'acide citrique. Le tableau V montre les produits formés au cours de la dégradation du glucose, en présence de chacun des 2 inhibiteurs ou de leur mélange. Dans ce dernier cas, il n'y a pas de formation de citrate ; l'auréomycine arrête donc l'oxydation du glucose au niveau d'une étape antérieure à celle bloquée par le fluoracétate. La même expérience réalisée avec du pyruvate donne des résultats identiques. Par contre, la dégradation de l'acétate est totalement inhibée par le fluoracétate comme par l'auréomycine.

DISCUSSION

Il semble bien prouvé que l'auréomycine agit en empêchant l'entrée du maillon dicarboné de l'acétate dans le cycle de Krebs. En effet :

1) En présence d'auréomycine, il n'est jamais trouvé de citrate lors de la dégradation du glucose, du pyruvate ou de l'acétate, alors qu'il

Intermédiaires formés	Auréomycine 75 µg/ml	Fluoracétate 10^{-1} M	Auréomycine 75 µg/ml Fluoracétate 10^{-1}M
Citrate.....		+ +	
Malate.....	+ +	+	+ +
Succinate.....	±	±	±
Fumarate.....	±		±
Lactate.....	+	+ +	+

TABLEAU V

Intermédiaires formés au cours de la dégradation du glucose

en présence d'inhibiteurs

(Auréomycine 75 µg/ml et Fluoracétate 10^{-1}M)

a été démontré au chapître précédent que le catabolisme du glucose passait normalement par le cycle citrique.

2) Le fluoracétate se comporte comme l'auréomycine, en inhibant l'oxydation des substrats du cycle de Krebs ; par contre, en sa présence le citrate est accumulé. En couplant l'action du fluoracétate et de l'auréomycine, on trouve les mêmes produits de dégradation qu'avec l'antibiotique seul : il est permis de penser que l'antibiotique agit à un stade situé obligatoirement entre le pyruvate et le citrate, c'est-à-dire au niveau de l'enzyme de condensation. Cependant, tous nos essais pour isoler et étudier l'activité de cet enzyme en présence et absence d'auréomycine, ont échoué ; nous devons donc jusqu'à présent nous contenter de ces preuves indirectes.

D'autre part, si nous admettons que l'auréomycine bloque la dégradation du glucose au niveau du pyruvate, en la déviant vers les voies sans issues du lactate et de l'acétate, il doit exister une voie directe pyruvique $\longrightarrow$ acides dicarboxyliques qui consiste certainement en une fixation de CO_2 sur le pyruvique amenant la formation transitoire d'oxalacétique suivant la réaction connue sous le nom de réaction de Wood-Werkman et Hemingway. Quoi qu'il en soit, ce processus est normalement peu intense mais devient plus important en présence d'auréomycine.

III - COMPARAISON DU MODE D'ACTION DE LA CHLORTETRACYCLINE ET DE LA DEMETHYLCHLORTETRACYCLINE

Il nous a paru intéressant d'examiner le mode d'action sur les bactéries de la demethylchlortetracycline (mexocine) dont les propriétés antibactériennes sont très proches de celles de l'auréomycine, afin de voir s'il possédait une action inhibitrice semblable sur le métabolisme du glucose.

Vis-à-vis de notre souche bactérienne, la mexocine présente un pouvoir bactériostatique très légèrement supérieur à celui de l'auréomycine. En effet, la mexocine inhibe la croissance de P. mirabilis à la concentration de 1,5 µg par ml et l'auréomycine à celle de 2 µg, après 18 heures d'incubation à 37°C ; par contre, après 24 heures, la concentration bactériostatique des deux antibiotiques est de 2 µg par ml (57).

Action de la mexocine sur la respiration

En l'absence de substrat, la mexocine provoque une augmentation considérable mais transitoire de la respiration endogène des bactéries cultivées sur glucose ; on observe, comme avec l'auréomycine, que cette augmentation est moins marquée lorsque les bactéries ont été cultivées sur des intermédiaires du cycle citrique. Dans les expériences faisant intervenir les

./.

divers substrats, ceux-ci ont été ajoutés aux bactéries 2 heures 30 après l'addition de la mexocine afin que la respiration endogène soit revenue à un niveau normal. Le tableau VI permet de comparer l'inhibition de la consommation d'oxygène en présence de divers substrats par les deux antibiotiques à la concentration de 100 µg par ml et de constater qu'elle est très semblable ; nous avons choisi cette concentration en inhibiteur, car à concentration plus faible, l'activité de la mexocine sur la respiration est variable et nettement inférieure à celle de l'auréomycine.

Devenir du glucose

En présence de mexocine, P. mirabilis à partir du glucose forme de l'acide pyruvique dont l'accumulation est moins marquée qu'avec l'auréomycine, puis les acides acétique et lactique ; on rencontre des traces d'acides succinique, fumarique et malique, par contre il n'a jamais été possible de mettre en évidence l'acide citrique. Ces résultats sont parallèles à ceux obtenus avec l'auréomycine.

Localisation des carbones du glucose transformés en CO_2 lors de sa dégradation

Cette étude est réalisée en déterminant la provenance du $^{14}CO_2$ formé à partir du glucose ou du pyruvate sélectivement marqués. Le tableau VII résume les résultats obtenus (à comparer avec le tableau II) et permet d'apporter les conclusions suivantes :

1°) Les proportions de CO_2 provenant du carbone 6 sont

./.

	Glucose	Pyruvate	Citrate	Succinate
Théorique	30	12,5	22,5	17,5
Sans antibiotique	22,8	10,9	12,2	12
Mexocine 100 µg/ml.....	5	4,3	0,1	6,3
Auréomycine 100 µg/ml....	6,2	3,3	1,9	5

TABLEAU VI

Volumes d'oxygène consommé exprimés en micromoles pour l'oxydation de 5 micromoles de chaque substrat par P. mirabilis ; les bactéries ont été cultivées en présence du substrat étudié en fiole de Warburg

	sans inhibiteur		Mexocine		Auréomycine	
	$^{14}CO_2$	O_2	$^{14}CO_2$	O_2	$^{14}CO_2$	O_2
Glucose $1^{14}C$	66,1	65,4	3,5	21,4	8,2	23,3
Glucose $6^{14}C$	69,5	64,7	1,9	19,2	0,9	18,7
Glucose $U^{14}C$	65,8	68,2	37,0	24,8	30,2	18,2
Pyruvate $2^{14}C$	69,4	75,3	1,1	20,1	0,3	17,7

TABLEAU VII

—

Formation totale de $^{14}CO_2$ et consommation d'oxygène à partir de glucose et de pyruvate marqués, lorsque le substrat a été entièrement dégradé ; les nombres expriment les mêmes pourcentages que sur le tableau II

presque nulles, ce qui exclut toute dégradation totale par la voie des pentoses ou le cycle de Krebs.

2°) Les proportions de CO_2 venant du carbone 1 sont faibles, mais nettement plus élevées que les précédentes ; il y a donc passage d'une petite quantité de sucre par la voie des pentoses, comme en absence d'inhibiteur.

3°) 30 p. cent environ du CO_2 provient des carbones 2, 3, 4 ou 5 du glucose ; ceci ne peut s'expliquer, si l'on admet le passage par la voie d'Embden Meyerhof, que par la décarboxylation de l'acide pyruvique, portant sur les carbones 3 et 4 du glucose initial et conduisant à l'acide acétique.

Ainsi se trouvent confirmés les résultats obtenus précédemment : l'auréomycine et la mexocine ont un comportement identique : elles bloquent le métabolisme du glucose au niveau de l'entrée du maillon décarboné dans le cycle citrique, ce qui semble prouver l'importance de ce processus dans l'action bactériostatique des deux antibiotiques. Mais pour obtenir la même inhibition métabolique, la concentration de la mexocine doit être plus forte que celle de l'auréomycine, alors que l'activité bactériostatique de cette dernière est plus faible vis-à-vis de la souche de Proteus mirabilis étudiée.

IV- ETUDE DU METABOLISME DE SOUCHES DE PROTEUS MIRABILIS RESISTANTES A LA CHLORTETRACYCLINE

Nous avons d'abord étudié des germes résistants à l'auréomycine obtenus sur milieu complexe glucosé et entretenus sur le même milieu glucosé ou contenant des sels d'acides organiques. Dans ces conditions, la respiration des germes cultivés en présence de divers substrats présente des variations qui ne semblent pas être toujours attribuables à la perméabilité cellulaire, mais plutôt à un mélange de clônes. Ceci nous a amenés à sélectionner des mutants résistants sur milieu synthétique liquide. Dans ce milieu, l'unique source de carbone est, soit le glucose, soit le sel sodique d'un acide organique. Nous avons isolé des souches capables de se développer en présence de 100 µg d'auréomycine par ml. Parmi ces souches, nous avons pu déterminer 2 types de mutants résistants dont nous avons exploré le métabolisme.

Nous étudierons donc successivement P. mirabilis auréomycino-résistant cultivé sur milieu complexe, puis le métabolisme de ce germe cultivé sur milieu synthétique.

./.

METABOLISME D'UNE SOUCHE DE PROTEUS MIRABILIS RESISTANTE A L'AUREOMYCINE, OBTENUE PAR CULTURE SUR MILIEUX COMPLEXES

L'obtention des souches hautement résistantes est réalisée par repiquage de la souche résistante à n µg d'auréomycine par ml, sur des milieux contenant la même concentration en antibiotique et les deux concentrations immédiatement supérieures. Après 48 heures de séjour à 37°C, on repart de la concentration la plus forte ayant donné lieu à une culture convenable et on pratique trois nouveaux ensemencements.

Dans le cas présent, la souche de Proteus a été repiquée sur milieu B.P.G. liquide, contenant de l'auréomycine, jusqu'à ce que les germes soient capables de se développer en présence de 110 µg d'antibiotique par millilitre. Après isolements par culture en surface, la souche est entretenue soit sur le milieu initial, soit sur des milieux dans lesquels le glucose est remplacé par les sels sodiques des principaux acides du cycle de Krebs. Ces derniers essais ont été effectués afin de limiter l'action éventuelle de la perméabilité cellulaire. Alors qu'en milieu B.P.G. la souche résistante se développe facilement, même en profondeur, nous avons remarqué que, pour croître en milieu liquide et en présence de sels d'acides organiques, elle exige une oxygénation

./.

poussée réalisée par barbotage d'air stérile ou par culture en couche mince. Dans ces conditions, le pH du milieu s'élève durant la culture (de pH 7 à pH 8 environ) ; ceci est dû à l'augmentation de la consommation en acides organiques libérant l'ion metallique ; l'alcalinisation et l'oxydation concomitantes nous ont paru indispensables à l'obtention de cultures reproductibles sur les milieux contenant les acides organiques.

L'étude du comportement des bactéries résistantes à l'auréomycine vis-à-vis des différents substrats du cycle citrique a été faite en appareil de Warburg suivant la même technique que pour les germes sensibles. Des résultats exprimés dans le tableau VIII, il ressort qu'il n'y a pratiquement pas de différence dans l'oxydation des substrats en présence ou en absence d'auréomycine. On voit que les germes résistants consomment sensiblement plus d'oxygène en présence ousans auréomycine que les germes sensibles en absence de l'antibiotique.

Comme nous avions modifié les conditions de culture, nous avons voulu voir si celles-ci n'avaient pas d'influence sur le comportement de la souche de Proteus sensible ; nous avons donc soumis les germes à une oxygénation forte en laissant le milieu s'alcaliniser. Comme l'indique le tableau IX, les bactéries obtenues possèdent une faculté d'oxydation des substrats supérieurs à celle des germes cultivés à pH alcalin

./.

	Germes sensibles		Germes résistants	
Auréomycine ajoutée dans les fioles de Warburg	0	75µg/ml	0	75 µg/ml
Glucose.....	60%	23%	67%	60%
Pyruvate.....	91%	23%	90%	93%
Acétate.....	87%	2%	96%	94%
Citrate.....	55%	8%	80%	80%
Succinate.....	69%	26%	100%	100%
Malate.....	79%	15%	90%	97%

Les cultures sont réalisées sur le substrat correspondant.

TABLEAU VIII

Pourcentage d'oxygène expérimentalement consommé par rapport à l'oxygène nécessaire théoriquement pour l'oxydation totale des divers substrats

SUBSTRAT	Milieu B.P.G. contenant du succinate			
	Alcalin avec oxygénation	Acide avec oxygénation	Alcalin anaérobie	Acide anaérobie
Glucose.....	37,4	28,2	10,8	7,1
Pyruvate.....	20,5	16,2	7,3	5,3
Acétate.....	20	12,5	1	0,5
Citrate.....	14,2	13,4	6,5	3,1
Succinate.....	27,8	30,9	14	9,7
Malate.....	22,1	17,9	9,6	7,1

Les résultats sont exprimés en micromoles d'oxygène consommées en fiole de Warburg par heure, par milligramme d'azote bactérien, pour 5 micromoles de substrat.

TABLEAU IX

Influence du pH du milieu de culture et de son oxygénation sur la consommation d'oxygène en présence de divers substrats par P. mirabilis sensible à l'auréomycine

en anaérobiose ou à pH maintenu artificiellement acide en présence d'oxygène (les cultures à pH constant ont été réalisées à l'aide d'un montage effectué au moyen d'un titrateur automatique Radiometer). Mais, malgré ce pouvoir catabolique accru, les germes restent sensibles à l'auréomycine et l'on retrouve les mêmes proportions d'inhibition de la respiration que chez le Proteus cultivé à pH acide en anaérobiose (55). Ce n'est donc pas la modification des conditions de culture qui a entrainé la disparition du pouvoir inhibiteur de l'auréomycine chez la souche résistante.

Nous avons alors porté nos efforts sur la recherche de la voie métabolique insensible à l'auréomycine, qui permet aux germes résistants de se développer en présence de l'antibiotique. Le fluoracétate qui inhibe la respiration des germes sensibles en présence des intermédiaires du cycle tricarboxylique perd, comme l'auréomycine, son pouvoir inhibiteur chez la souche résistante. Si la souche auréomycino-résistante était restée sensible au fluoracétate, on aurait pu concevoir que la réaction inhibée par l'auréomycine était devenue indifférente à l'antibiotique ; que la souche soit devenue résistante aussi au fluoracétate, cela indique que ces germes oxydent vraisemblablement les substrats suivant une voie enzymatique qui ne passe plus par l'étape citrique, bloquée par le fluoracétate. Mais il faut remarquer que si le fluoracétate à faibles concentra-

./.

tions inhibe toujours la respiration des germes sensibles, le choix de la concentration de cet inhibiteur intervient quand les germes sont résistants : la respiration du germe sensible est inhibée jusqu'à la concentration en fluoracétate de 1.10^{-2} M ; à cette concentration, la souche résistante est totalement indifférente au fluoracétate ; à la concentration de 1.10^{-1} M, cette souche subit une inhibition de 50 %, et à la concentration choisie de $2,5.10^{-2}$ M, le fluoracétate se comporte de la même façon que l'auréomycine. Ces différences d'activité diminuent considérablement l'intérêt des résultats apportés par l'étude du fluoracétate.

Comme nous l'avions précédemment montré, chez les germes sensibles en présence d'auréomycine, le glucose est dégradé jusqu'au stade d'acétate ; la cinétique de la formation de l'acétate et du pyruvate montre que le glucose est transformé en pyruvate qui s'accumule et donne ensuite de l'acétate. Il n'en est pas de même chez la souche résistante ; en présence d'auréomycine, le glucose est oxydé presque quantitativement ; il conduit à la formation de quantités variables de pyruvate accumulé comme par le germe sensible sous l'influence de l'antibiotique ; le pyruvate lui-même disparaît sans donner lieu à une accumulation d'acétate. Ces constatations permettent de penser que les souches de Proteus mirabilis auréomycino-résistants dégradent le glucose sans

./.

passer par l'intermédiaire du cycle de Krebs ; en effet, l'oxydation de ce substrat n'est inhibée ni par l'antibiotique, ni par le fluoracétate.

Cependant il est nécessaire, avant de poursuivre l'étude du métabolisme des bactéries résistantes, de déterminer si la résistance ne pouvait être imputée à une élimination de l'antibiotique de la réaction. Nous avons envisagé trois processus :

1° Destruction de l'auréomycine par un exoenzyme de même type que la pénicillinase. Après contact, allant de une heure à 24 heures, du germe résistant avec une solution de l'antibiotique, celle-ci est filtrée sur filtre "millipore (0,45 μ)", puis dosée en se basant sur son action bactériostatique vis-à-vis du germe sensible. Nous n'avons, en aucun cas, trouvé de diminution de l'activité bactériostatique.

2° Imperméabilisation à l'auréomycine de la membrane cellulaire du mutant résistant : on peut éliminer cette alternative, en effet, comme nous le verrons plus loin, le métabolisme du glucose par les germes sensibles et résistants est totalement différent.

3° Résistance à l'auréomycine de l'enzyme inhibé normalement par l'antibiotique ; le fluoracétate, qui bloque le cycle de Krebs à un niveau différent de l'auréomycine n'a, lui non plus, aucune influence sur l'oxydation du glucose par le Proteus résistant ; or, il n'est pas concevable que l'on ait isolé par hasard un mutant dont l'enzyme de

./.

condensation soit résistante à l'auréomycine, et l'isocitrique déhydrogénase résistante au fluoracétate. De plus, les autoradiogrammes des produits de dégradation du glucose par les germes résistants mettent en évidence l'absence de citrate. On peut donc affirmer que l'oxydation totale du glucose et de ses métabolites par les germes résistants n'est pas le résultat de la résistance de l'enzyme en cause, mais est bien due à une déviation du métabolisme.

Cependant, avant de tenter de préciser ces voies métaboliques nouvelles, il était indispensable de s'adresser non plus à des germes auréomycino-résistants cultivés sur milieux complexes, mais au contraire d'essayer d'obtenir des mutants résistants sélectionnés, d'une part grâce à leur caractère de résistance à l'antibiotique, d'autre part, à leur culture sur milieu synthétique, en présence d'une source unique de carbone.

METABOLISME DE SOUCHES RESISTANCES A L'AUREOMYCINE OBTENUES EN MILIEU SYNTHETIQUE LIQUIDE

1) Obtention

Les repiquages en présence d'auréomycine à doses croissantes sont pratiqués suivant la technique décrite précédemment,

./.

sur milieu synthétique liquide dont la source de carbone est un des acides du cycle citrique. Les tubes sont incubés à l'étuve à 37°C, inclinés de façon à présenter la plus grande surface possible à l'aération. Nous appelons, par exemple, souche "résistante-glucose", ou "souche résistante-succinate" des souches cultivées en présence de 100 µg d'auréomycine sur milieu synthétique dont les seules sources de carbone sont respectivement le glucose ou le succinate. Il faut noter que la souche "résistante-citrate" a été très difficile à obtenir.

Notre expérimentation à l'aide des mutants résistants sélectionnés sur milieux synthétiques a porté sur trois types de recherches : d'abord la détermination des caractères culturaux et des besoins nutritionnels des divers mutants, car ces souches ne sont plus capables de se développer sur n'importe quel substrat hydrocarboné. Puis nous avons voulu savoir si les substrats ne supportant pas la culture, étaient encore oxydés en fiole de Warburg. Enfin, nous avons essayé de déterminer certains intermédiaires du métabolisme à l'aide des radio-isotopes.

2) Caractères culturaux

Quelle est l'aptitude de ces mutants à se développer sur milieux synthétiques solides contenant l'un des substrats comme unique source de carbone et en présence de 100 µg d'auréomycine par

./.

ml ? Les résultats rapportés dans le tableau X permettent de classer les souches résistantes en deux groupes : le premier comprend les souches "résistante-glucose" et "résistante-pyruvate", qui ne peuvent croître convenablement que sur milieu contenant du glucose ou du pyruvate et donnent une culture faible sur glutamate ; elles sont incapables de se développer en présence des autres acides essayés. Dans le second groupe, on trouve des mutants résistants sélectionnés en présence de glutamate, succinate ou malate, qui peuvent croître sur tous les substrats, y compris le glucose et le pyruvate. Au contraire, la souche sensible, après plusieurs passages sur milieu synthétique contenant du glucose ou du pyruvate, se développe (en l'absence d'auréomycine) aussi bien sur milieu solide dont la source de carbone est un acide du cycle citrique que sur milieu glucosé.

3) Etude de l'oxydation des substrats du cycle citrique

L'étude de l'oxydation en présence d'auréomycine des acides du cycle de Krebs par les divers types de souches résistantes a donné les résultats rassemblés dans le tableau XI. Ils conduisent à une classification identique à celle que donnent les caractères culturaux : d'une part, les souches "résistante-glucose" ou "résistante-pyruvate" oxydent faiblement l'acétate, le succinate, le malate et le citrate, tandis qu'elles oxydent convenablement le glucose, le pyruvate ou le glutamate ; d'autre part, les souches résistantes isolées en présence de succinate, de malate, ou de glutamate sont capables

Essai de culture sur milieu synthétique contenant :	Germes résistants isolés en présence de				
	Glucose	Pyruvate	Succinate	Malate	Glutamate
Glucose.....	+	+	+	+	+
Pyruvate.....	+	+	+	+	+
Succinate.....	0	0	+	+	+
Malate.....	0	0	+	+	+
Glutamate.....	±	±	+	+	+
Citrate.....	0	0	+	+	+

TABLEAU X

Caractères culturaux des divers mutants résistants

en présence de différents substrats

Substrat étudié en fiole de Warburg	Germes résistants isolés en présence de				
	Glucose	Pyruvate	Succinate	Malate	Glutamate
Glucose.....	40%	71%	80%	45%	67%
Pyruvate.....	59%	67%	55%	46%	57%
Acétate.....	10%	36%	64%	67%	78%
Succinate.....	12%	23%	97%	79%	60%
Malate.....	9%	23%	75%	45%	60%
Glutamate.....	32%	100%	67%	43%	43%
Citrate.....	3%	26%	63%	46%	46%

Les nombres indiquent le pourcentage d'oxygène consommé par rapport à la quantité théorique nécessaire pour une oxydation totale.

TABLEAU XI

Consommation d'oxygène par les germes résistants en présence de différents substrats et d'auréomycine 75 µg/ml

d'oxyder tous les substrats étudiés ; la consommation d'oxygène atteignant toujours 43 % de la quantité d'oxygène théoriquement nécessaire pour une oxydation totale.

4) Etude de l'incorporation des substrats marqués

Pour la bonne compréhension de l'exposé, nous avons à la fois étudié le métabolisme des souches résistantes et repris les résultats obtenus avec la souche sensible.

Ces investigations ont été réalisées au moyen de la technique décrite précédemment mais les suspensions bactériennes ont été mises en contact avec de fortes concentrations d'auréomycine. En effet, lorsque nous avons voulu inhiber la formation de citrate par l'auréomycine chez le germe sensible en suspension dense, la concentration de 75 µg par ml n'a pas suffit. Nous avons été obligés de déterminer en appareil de Warburg la concentration en antibiotique inhibant la respiration d'une suspension bactérienne correspondant à 1.10^8 germes par ml, et d'évaluer par numérations successives la concentration bactériostatique ; nous nous sommes arrêtés à la concentration de 8.000 µg/ml.

Nous allons examiner successivement les autoradiogrammes fournis par les divers types de mutants résistants. Les taches correspondant aux acides que nous possédons ont été identifiées avec certitude par élutions et par chromatographies successives. D'autres n'ont pu être identifiées : elles ne correspondent à aucun acide décrit jusqu'ici comme faisant partie du cycle de Krebs, du cycle glyoxylique ou aux autres intermédiaires habituels de la dégradation du glucose, parmi les

acides organiques à chaîne linéaire, non volatils de C_2 à C_6 de notre collection. Certaines enfin semblent s'identifier à tel ou tel composé car leur Rf, en électrophorèse à pH 3,5 et en chromatographie sont semblables; nous n'avons pu cependant jusqu'à présent affirmer leur identité, car ces intermédiaires du métabolisme sont isolés en quantités trop infimes pour permettre une étude chimique ultérieure.

a - Bactéries cultivées sur glucose comme source principale de carbone (planche III)

Substrat : GLUCOSE $U^{14}C$

- Les autoradiogrammes de la figure 2 décrivent les produits formés à partir du glucose par P. mirabilis, souche sauvage : après 2 minutes de contact, les acides du cycle de Krebs se trouvent au complet. Nous n'avons pas fait figurer d'autoradiogramme des produits de dégradation du glucose par le germe sensible en présence d'auréomycine ; en effet, dans ces conditions expérimentales on ne trouve à côté du seul glucose aucun intermédiaire, excepté l'acide lactique.

- La souche "résistante-glucose", en présence de glucose et d'auréomycine, conduit à des autoradiogrammes très différents ; après un temps de contact bref, on voit apparaître simultanément des quantités importantes d'esters mono et diphosphoriques et une tache ayant le même Rf que le glucose en électrophorèse mais migrant plus rapidement en chromatographie. Lorsque la suspension bactérienne a été mise en présence de glucose durant 15 minutes, cette tache s'est considérablement renforcée. Son étude en chromatographie descendante dans le

système butanol formique, durant 5 jours, permet de l'identifier vraisemblablement à l'arabinose ; la seule autre tache importante de métabolite correspond à l'acide glycolique (figure 3, planche III).

Les deux mutants obtenus sur glucose ou sur pyruvate donnent les mêmes autoradiogrammes, qu'ils aient été mis en contact avec du glucose U^{14}C ou du pyruvate 2^{14}C.

Substrat : SUCCINATE 1^{14}C

- Le germe sensible cultivé sur milieu glucosé et mis en présence de succinate dégrade ce substrat en suivant le cycle de Krebs en effet, on retrouve (planche III, 4), outre l'acide succinique, beaucoup d'acide fumarique et les acides malique, aspartique, citrique, glutamique et α-cétoglutarique en plus faibles quantités ; la présence d'alanine témoigne de l'activité de l'oxalacétocarboxylase puisqu'elle révèle la formation d'acide pyruvique dont nous discuterons plus loin l'importance.

- Par contre, la souche "résistante-glucose", en présence de succinate et d'auréomycine (planche III, 5) conduit uniquement aux acides fumarique, malique et aspartique. Ces acides sont les mêmes que ceux formés dans des conditions identiques par la souche sensible en présence d'auréomycine. Il faut noter l'absence totale des acides citrique et glutamique. Ces résultats sont superposables à ceux obtenus lors de l'étude des caractères culturaux et de l'oxydation des divers substrats par la souche résistante. La souche "résistante-glucose" ne se développe pas sur succinate et ne l'oxyde pas ; de même, le métabolisme de ce substrat est inhibé par l'auréomycine.

b - Bactéries cultivées sur succinate comme source principale de carbone

Substrat : GLUCOSE $U^{14}C$

Le catabolisme du glucose par P. mirabilis sensible, cultivé sur succinate, donne lieu à la formation des principaux acides du cycle de Krebs, en particulier l'acide citrique.

- La souche "résistante-succinate", contrairement au mutant "résistant-glucose", ne forme pas de pentose à partir du glucose mais, outre les esters phosphoriques et l'acide aspartique, abondants, on trouve les acides lactique, malique, glutamique et α-cétoglutarique en faibles quantités. Il faut noter la présence d'un composé fortement acide non identifié. Il ne semble donc pas que ce mutant dégrade le glucose en passant par le cycle citrique ni par la voie des pentoses (planche III, 6).

Substrat : SUCCINATE $1^{14}C$

Les autoradiogrammes sont superposables à ceux obtenus avec le glucose. Ceci correspond aux caractères culturaux : la souche "résistante-succinate" utilise pour sa croissance et oxyde en présence d'auréomycine aussi bien le glucose que le succinate.

./.

DISCUSSION

Nous avons montré que Proteus mirabilis, souche Ahmed, dégrade le glucose principalement suivant le cycle tricarboxylique de Krebs, l'apparition des acides aspartique et malique avant les acides succinique et fumarique, indique que la réaction de Wood-Werkman est active ; ce fait est confirmé par l'intégration du $^{14}CO_2$ en présence de pyruvate dans les acides dicarboxyliques ; d'autre part, l'acide succinique est dégradé lui aussi selon la voie citrique et donne lieu à la formation d'acide glutamique ; cela nécessite la formation abondante d'acide pyruvique à partir de l'acide succinique par l'intermédiaire de l'enzyme malique ou de l'oxalacétique-carboxylase.

La souche sensible, en présence d'auréomycine, conduit, après une accumulation transitoire d'acide pyruvique, à l'acide acétique ; il n'a été trouvé en aucun cas d'acides citrique, α-cétoglutarique ou glutamique ; il se forme cependant quelques acides dicarboxyliques provenant de la condensation du CO_2 avec l'acide pyruvique.

Deux types de mutants résistants à l'auréomycine ont été isolés ; le premier est obtenu en présence de glucose comme source principale de carbone ; il ne se développe que sur le glucose, le pyruvate ou le glutamate et ne donne pas de colonie lorsque la seule source de carbone est un des acides dicarboxyliques ; cette dernière propriété peut fort bien s'expliquer par l'impossibilité des germes "résistant-glucose" à

former du glutamate à partir des acides succinique et malique en présence d'auréomycine ; en effet, il semble démontré que, dans ces conditions, l'entrée du maillon dicarboné dans le cycle de Krebs est bloquée. On retrouverait ainsi un mutant exigeant en glutamate d'un type voisin de celui décrit par GILVARG et DAVIS (44). Mais cette souche se développe aussi en présence de glucose ou de pyruvate, il faudrait donc concevoir une voie permettant de former à partir du glucose de l'α-cétoglutarate, sans passer par les acides tricarboxyliques ; nous avons essayé de déterminer cette voie par l'examen des produits de dégradation du glucose dans ces conditions :

L'apparition d'un pentose sur les autoradiogrammes suggère la chaîne de réactions suivante : glucose ⟶ esters mono et diphosphoriques ⟶ pentoses ⟶ acide α-cétoglutarique ⟶ acides dicarboxyliques ⟶ acide pyruvique ⟶ pentoses.

Le passage de l'arabinose à l'acide α-cétoglutarique a été décrit par WEINBERG et DOUDOROFF (177) chez <u>Pseudomonas saccharophila</u> ; la condensation en pentose des acides pyruvique et acétique a été envisagée par BRENNEMAN et VISHNIAC (14). Selon cette hypothèse, le glucose entrerait dans le cycle de Krebs par la voie des pentoses, au niveau de l'acide α-cétoglutarique. Cependant, ce schéma n'a pu être retenu ; en effet, il n'a pas été possible de déterminer la formation d'intermédiaires entre le glucose et les pentoses, en particulier d'acides cétogluconiques (KATZNELSON (80), WURTZ (185), et surtout, la dégradation du glucose passant par les acides dicarboxyliques, ceux-ci

devraient être oxydés par la souche "résistante-glucose", ce qui n'est pas le cas.

Le deuxième type de mutant résistant, isolé sur succinate, ou malate, se développe aussi bien sur glucose ou pyruvate qu'en présence des acides dicarboxyliques et il oxyde ces différents substrats de la même façon. La présence habituelle sur les divers chromatogrammes d'acide glycolique permettait de penser que le cycle glyoxylique de KORNBERG (85) pouvait être actif chez Proteus mirabilis comme cela a été montré chez Pseudomonas (86), Escherichia coli (183) ou Aerobacter (154) ; mais la recherche de l'acide glyoxylique lui-même a toujours été négative. Nous avons par ailleurs éliminé la voie faisant intervenir la condensation du glycocolle avec le succinylcoenzyme A (114-150) pouvant conduire à l'acide α-cétoglutarique ; en effet, les souches résistantes n'ont jamais formé dans nos conditions expérimentales, d'intermédiaires du cycle citrique marqués au ^{14}C lorsqu'elles étaient incubées en présence de glycocolle $U^{14}C$ et d'acides dicarboxyliques.

Nous avons donc montré l'existence de 2 types de mutants résistants à l'auréomycine, capables de dégrader les substrats carbonés par des voies différentes de celles du métabolisme normal, mais la détermination exacte des chaînes de réactions n'a pu être réalisée jusqu'à présent. Il faut enfin noter que si nous n'avons, sans doute, pas étudié la voie métabolique dont le bloquage est la cause première de l'action bactériostatique, tout au moins nous avons mis en évidence avec

certitude l'inhibition d'un système enzymatique suffisamment indispensable à la vie de la bactérie pour que celle-ci doive modifier son métabolisme intermédiaire pour survivre.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Nous discuterons d'abord des résultats obtenus dans l'étude des trois groupes de substances antibactériennes agissant au niveau des structures externes de la cellule : nous envisagerons successivement leur mode d'action comparé à celui d'autres antibiotiques, puis le mécanisme de la résistance microbienne à ces composés.

Nous tenterons, ensuite, de dégager de ce travail quelques raisonnements d'ordre général, concernant, d'une part, les relations entre structure chimique et activité antibactérienne, d'autre part, les modalités de la résistance aux antibiotiques.

Les acides aminés de la série non naturelle et le glycocolle interférent dans les processus de synthèse de la structure rigide de la paroi. Comme la pénicilline, ces composés provoquent l'apparition de sphéroplastes en milieu de culture hypertonique, et la lyse en milieu isotonique ; leur activité faible en solution non nutritive peut s'expliquer par la destruction précoce de quelques bactéries, dont le contenu cellulaire, libéré dans le milieu, le rend apte à assurer un début de croissance. Les résultats de ces expériences rejoignent ceux obtenus par LARK (93), lorsqu'il montre l'incorporation importante de D méthionine dans le mucopeptide de la paroi ; les acides aminés D, en concentration élevée, pourraient entrer en compétition avec des corps de la même série, composants normaux de la paroi.

La pénicilline, comme les acides aminés, sélectionne dans une culture de sphéroplastes d'*Escherichia coli*, des mutants qui synthétisent en abondance un polysaccharide donnant un aspect muqueux à leurs colonies. Ces mutants, mis en présence des substances antibactériennes étudiées

possèdent les propriétés de se développer convenablement au sein d'un milieu solide, et de survivre quelques temps, sous forme bactérienne, en milieu liquide. Cette résistance est liée à la température d'incubation et suit une loi identique à celle régissant le pouvoir de synthèse du polysaccharide ; ceci laisse supposer que les deux phénomènes : synthèse du polysaccharide et résistance, ont une relation de cause à effet ; on conçoit que la secrétion d'un composé muqueux, au niveau des enveloppes cellulaires, protège le microorganisme en le rendant moins sensible aux chocs osmotiques. Cependant, deux arguments infirment cette hypothèse : d'une part, les bactéries pour former le polysaccharide doivent croître sur milieu pauvre, or les mutants muqueux sont résistants à l'agent inducteur, en milieu riche ; d'autre part, tous les sphéroplastes d'E. coli, souches sauvages ou mutants muqueux, synthétisent le même polysaccharide. Cette contradiction n'est qu'apparente, si l'on tient compte du fait que seules les modalités de culture conditionnent la synthèse ultérieure du polysaccharide ; en effet c'est au moment de l'addition des substances antibactériennes à une suspension de germes, que celles-ci exercent leur action lytique ; ensuite, les cellules qui ont pu subir la transformation en sphéroplastes peuvent rester viables si elles se trouvent dans un milieu hypertonique ou suffisamment visqueux ; c'est la préexistence des systèmes enzymatiques permettant aux mutants de synthétiser immédiatement le polysaccharide, qui les rend capables de se transformer en sphéroplastes en grande proportion, et de survivre.

Les histones, comme la protamine, la polymyxine ou les ammoniums quaternaires provoquent la sortie de composés intracellulaires

dans le milieu extérieur et l'inhibition des activités enzymatiques. La première structure cellulaire atteinte est certainement la membrane cytoplasmique, siège des phénomènes de perméabilité ; ensuite les substances basiques bloquent les réactions du métabolisme par combinaison avec les protéines enzymatiques, soit parce que celles-ci sont situées au niveau de la membrane, soit que les peptides antibactériens pénètrent à l'intérieur de la cellule à la faveur des lésions qu'ils ont créées. Il n'est pas possible de déterminer avec certitude si la mort cellulaire est due aux modifications de la perméabilité ou l'atteinte des systèmes enzymatiques. Cependant, la rapidité de l'effet bactéricide nous semble en faveur de la première alternative. Qu elle est l'action de ces composés basiques à l'échelle moléculaire ? Leur pouvoir lethal sur les bactéries à Gram négatif, fonction de l'activité métabolique, laisserait supposer qu'elles interfèrent dans un processus dynamique, en remplaçant un acide aminé basique lors du renouvellement des protéines. Ceci s'est avéré inexact : les bactéries à Gram positif sont tuées par les peptides basiques quel que soit leur état métabolique. Il s'agit donc, à température proche de 0°C, d'un défaut de perméabilité de la paroi bactérienne des germes ne prenant pas le Gram. Il faut alors admettre qu'il y a combinaison directe des produits organiques basiques de poids moléculaire élevé, avec les protéines. Ce fait est mis en évidence par la propriété de ces substances de précipiter les protéines et d'inhiber l'activité d'enzymes isolés. Ces réactions sont reversibles, tout au moins partiellement : les cations bivalents libèrent les histones de leur combinaison avec les protéines et, permettent de retrouver l'activité des enzymes

précipités, par contre ils sont incapables d'éluer quantitativement les histones fixées sur les bactéries ; ceci peut s'expliquer par la concentration importante et la complexité des molécules réagissantes, au niveau de la cellule. L'isolement de mutants résistants aux différents composés bactéricides basiques n'a pu être en aucun cas réalisé. Cela confirme que leur mode d'action s'apparente plus à celui des antiseptiques par lésion directe de structure cellulaires, qu'à celui des antibiotiques.

La chlortétracycline et la déméthylchlortétracycline inhibent l'oxydation du glucose par Proteus mirabilis. Cette action n'est peut être pas la cause unique de l'arrêt de croissance provoquée par ces antibiotiques. Alors que pour les substances bactéricides, on peut avec certitude attribuer la mort cellulaire à telle lésion observée ; pour les agents bactériostatiques, le ralentissement des activités métaboliques peut être le résultat d'inhibitions à différents niveaux. Ceci est vérifié pour les deux antibiotiques étudiés. En effet la mexocine manifeste un pouvoir bactériostatique plus intense que l'auréomycine, mais une activité moins grande sur la respiration des bactéries. Il est démontré que le catabolisme aérobie du glucose par P. mirabilis, passe, pour la plus grande partie, par la voie glycolytique, puis par le cycle tricarboxylique de Krebs. Cette dégradation est bloquée par les deux antibiotiques au niveau de l'entrée du maillon dicarboné dans le cycle citrique. On constate alors une accumulation d'acétate et l'absence totale de citrate parmi les intermédiaires. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer si les tétracyclines agissaient directement sur l'enzyme de condensation, tout essai d'isolement de

./.

l'enzyme ayant abouti à un produit d'activité trop faible pour qu'une étude valable de son inhibition puisse être réalisée.

La sélection de germes résistants à l'auréomycine conduit à deux types de mutants qui diffèrent par leurs exigences en source de carbone et par les voies utilisées dans leur métabolisme hydrocarboné. Parmi les produits intermédiaires de la dégradation du glucose ou des acides dicarboxyliques, en présence d'auréomycine, le citrate n'a jamais pu être retrouvé. Le premier type de mutant, isolé par culture en présence de glucose, semble oxyder ce sucre par l'intermédiaire des pentoses ; le deuxième type, sélectionné en présence de succinate, dégrade cet acide suivant une chaine de réactions conduisant à des composés acides non identifiés. Ainsi, dans les deux cas, les mutants résistants évitent la réaction bloquée par l'antibiotique.

Quand on essaie de classer les résultats obtenus en vue d'étudier les relations pouvant exister entre activité antibactérienne et structure chimique, on est frappé par le nombre important de composés divers agissant au niveau, soit de la paroi, soit de la membrane des microorganismes. A cela, il peut y avoir plusieurs causes : d'abord le fait que les substances antibiotiques sont choisies en fonction de leur faible toxicité pour la cellule animale. Cette sélection porte sur des produits agissant sur des structures spécifiquement bactériennes, comme la paroi. Cependant, ce raisonnement n'est pas valable pour les acides aminés de la série D et le glycocolle ou pour la plupart des composés bactéricides basiques, dont l'utili-

./.

sation en thérapeutique n'a jamais été envisagée. On peut se demander, alors, si certaines chaines de réactions ou certains constituants cellulaires ne sont pas particulièrement vulnérables à l'agression par les agents chimiques. Il nous semble que ce soit le cas de la synthèse du mucopeptide de la paroi. Celle-ci s'effectue, en effet, par addition successive des composants, contrairement au processus habituel de la synthèse des protéines. Toute substance inhibant une des réactions conduisant au mucopeptide, bloque la chaine entière, seule voie de synthèse actuellement connue. Quant à la membrane cytoplasmique, c'est la première structure indispensable à la vie cellulaire, se trouvant en contact avec les produits toxiques. A l'opposé de la diversité des composés agissant sur la formation de la paroi, on constate une grande homogénéité des substances qui dégradent la membrane cytoplasmique : il s'agit toujours de dérivés organiques de poids moléculaires assez important et possédant un caractère basique net. Tous les composés essayés, qui présentent ces propriétés, montrent un pouvoir bactéricide intense. A cette activité bactéricide générale, liée à la nature chimique et correspondant à une combinaison avec les protéines cellulaires, s'ajoute une certaine sélectivité, sans doute due à la structure de la molécule. En particulier, la polymyxine, semble se fixer électivement sur la membrane bactérienne alors qu'elle ne réagit pas avec la plupart des protéines banales. L'étude systématique des facteurs de spécificité de telles molécules est difficile, mais nous semble être une voie de recherche particulièrement fructueuse pour ses applications pratiques.

./.

L'indifférence aux substances antibactériennes des mutants que nous avons étudiés, n'est pas causée par une résistance de la réaction qui est bloquée chez le germe sensible. Elle est due à l'acquisition de propriétés nouvelles permettant au microorganisme de survivre : synthèse d'un polyoside muqueux pouvant partiellement protéger la cellule après la dégradation de sa paroi ou catabolisme du glucose passant par des voies anormales. En aucun cas, il n'a été possible d'isoler des mutants d'E. coli résistant à la pénicilline ou aux acides aminés de la série D et synthétisant une paroi rigide, ni des résistants à la chlortétracycline formant du citrate à partir du glucose. Par ailleurs, nous avons montré qu'il existait plusieurs types de mutants résistant à l'auréomycine ; leur fréquence d'apparition dépend des conditions de culture, favorables au développement de certains clones. L'action de la chlortétracycline au niveau d'une réaction proche des carrefours du métabolisme intermédiaire, constitués par le pyruvate et le glutamate, explique la variété des mutants pouvant emprunter une autre voie. Vis-à-vis des substances agissant sur la paroi, dont le système de synthèse est particulier et unique, un seul type de mutant moins sensible à leur action a pu être sélectionné. Enfin, il n'a pas été possible d'isoler des germes devenus résistant aux composés bactéricides basiques. La fréquence d'apparition, in vitro, des mutants résistants dépend essentiellement de la nature de l'action des substances antibactériennes ; en particulier, elle est faible ou nulle pour celles qui lèsent une structure essentielle de la bactérie.

./.

Au terme de cette étude, il nous semble que la détermination du mode d'action de substances antibactériennes et des mécanismes de la résistance ait été un but quelque peu présomptueux. En effet, si nos recherches ont abouti à des résultats certains, de nombreux points ont dû être laissés dans l'ombre, soit que nous nous trouvions à la limite de nos moyens d'étude, soit par insuffisance de nos connaissances de la biologie bactérienne. Il n'a pas été possible de localiser la réaction bloquée par les acides aminés non naturels, dans la chaine de synthèse de la paroi, de savoir pourquoi certaines molécules basiques présentent une telle affinité pour la membrane bactérienne, de démontrer directement l'action de la chlortétracycline sur l'enzyme de condensation ni d'identifier exactement les voies de dégradation du glucose chez les mutants résistants. Par contre, ce travail nous a amené à étudier des aspects particuliers et parfois méconnus de la physiologie bactérienne : processus de la synthèse de polysaccharides, passage des molécules protidiques à travers la paroi microbienne, variation des voies du catabolisme hydrocarboné. Les substances antibactériennes, dont l'étude nous avait semblé constituer une fin en soi, se sont révélés un moyen exceptionnel de recherche en biologie cellulaire.

PLANCHE I

Figures 1 à 9 : Induction de sphéroplastes d'E. coli par le glycocolle en mil B.P.G. gélosé à 0,2 %.
Figures 1 à 5 : Formation des sphéroplastes (temps : 1 heure 30)
Figures 6 à 9 : Emission de sphères satellites (temps : 1 heure 30)

Figures 10 à 12 : Induction suivie de lyse ; mêmes conditions expérimentale que ci-dessus (temps : 5 minutes).

Figures 13 à 15 : Fractionnement du cytoplasme d'une sphère glycocolle cau par l'accroissement des vacuoles, puis lyse partielle ; mêmes cond tions expérimentales que précédemment.

Figures 16 à 21 : Evolution d'une colonie de sphéroplastes glycocolle en mil B.P.G. gélosé à 1 %.
Figures 16 à 17 : Boursouflement de la colonie par augmentation de volume des cellules (temps : 45 minutes).
Figures 18 à 21 : Divisions cellulaires par cloisonnement (temps : 2 minutes) ; noter l'apparition progressive de cloisons dans trois cellules situées dans la partie droite des photos.

(Photographies tirées de séquences filmées avec la chambre microcinématographique C. Zeiss, en contraste de phase).

PLANCHE II

Figure 1 : E. coli non traité par les histones (témoin).
Figures 2 à 4 : Bactéries soumises à l'action des histones à 37°.
Figures 5 et 6 : Divers aspects morphologiques d'E. coli traité par les histones à 37°, puis par le lysozyme.
Figure 7 : Protoplaste d'E. coli (témoin).
Figures 8 et 9 : Protoplastes traités par les histones.
Figure 10 : E. coli soumis à l'action des histones à 0°.

Examen en microscopie électronique, ombrage à l'or (la distance séparant 2 index correspond à 1 μ)

Figure 11 : Photographie de colonies d'E. coli H fr C. A gauche mutant muqueux ; à droite, souche sauvage (agrandie 2 fois).

PLANCHE III

De gauche à droite, et de haut en bas

1) Electrochromatographie des produits de métabolismes formés par Proteus mirabilis sensible, en présence de glucose $U^{14}C$ durant 1 minute.
2) Mêmes conditions que précédemment, contact durant 2 minutes.
3) P. mirabilis résistant-glucose en présence d'auréomycine ; contact avec glucose $U^{14}C$.
4) P. mirabilis sensible ; contact avec succinate $1^{14}C$.
5) P. mirabilis résistant-glucose, en présence d'auréomycine ; contact avec succinate $1^{14}C$.
6) P. mirabilis résistant-succinate, en présence d'auréomycine ; contact avec succinate $1^{14}C$.

Planche I

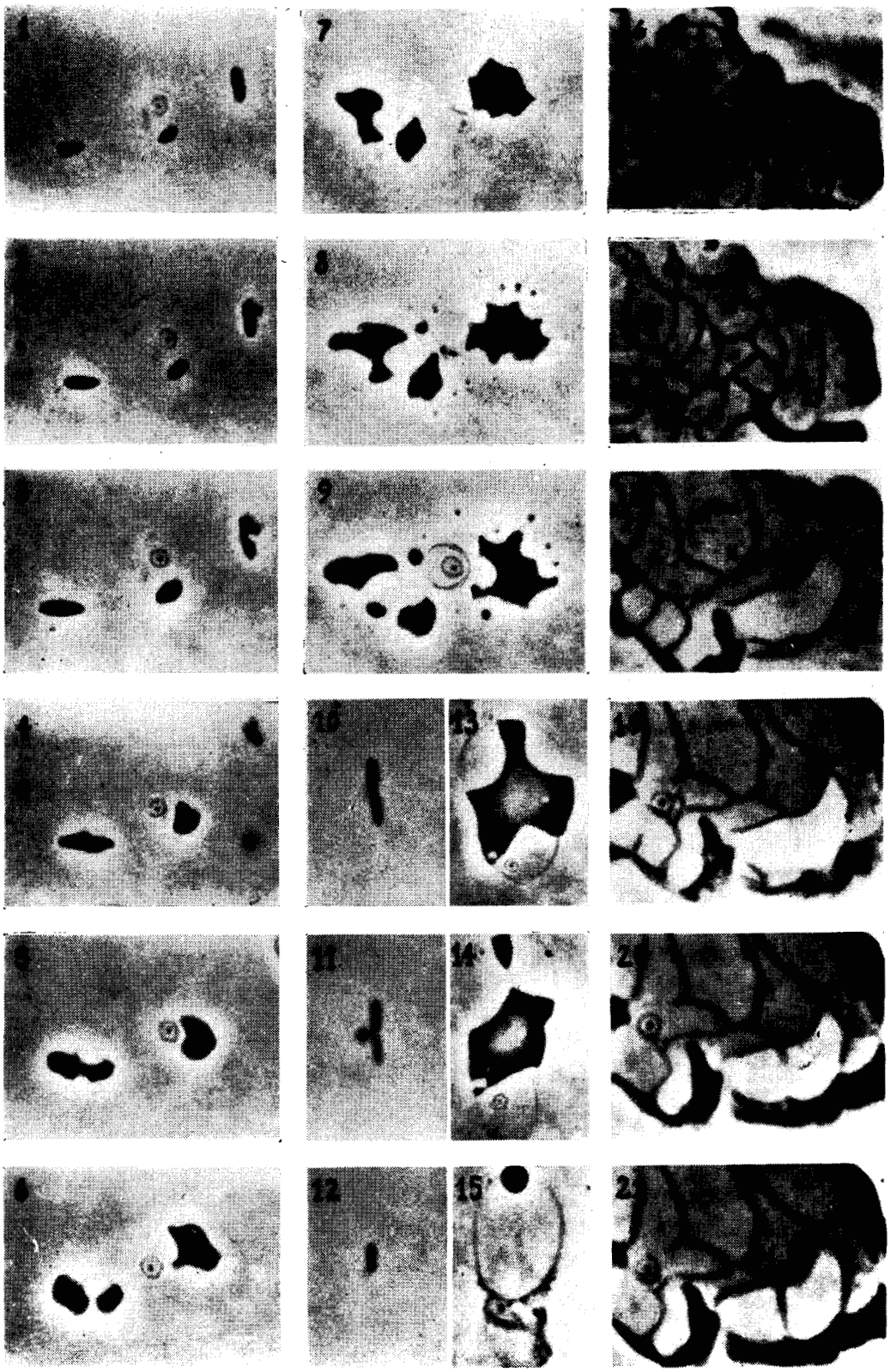


Planche II

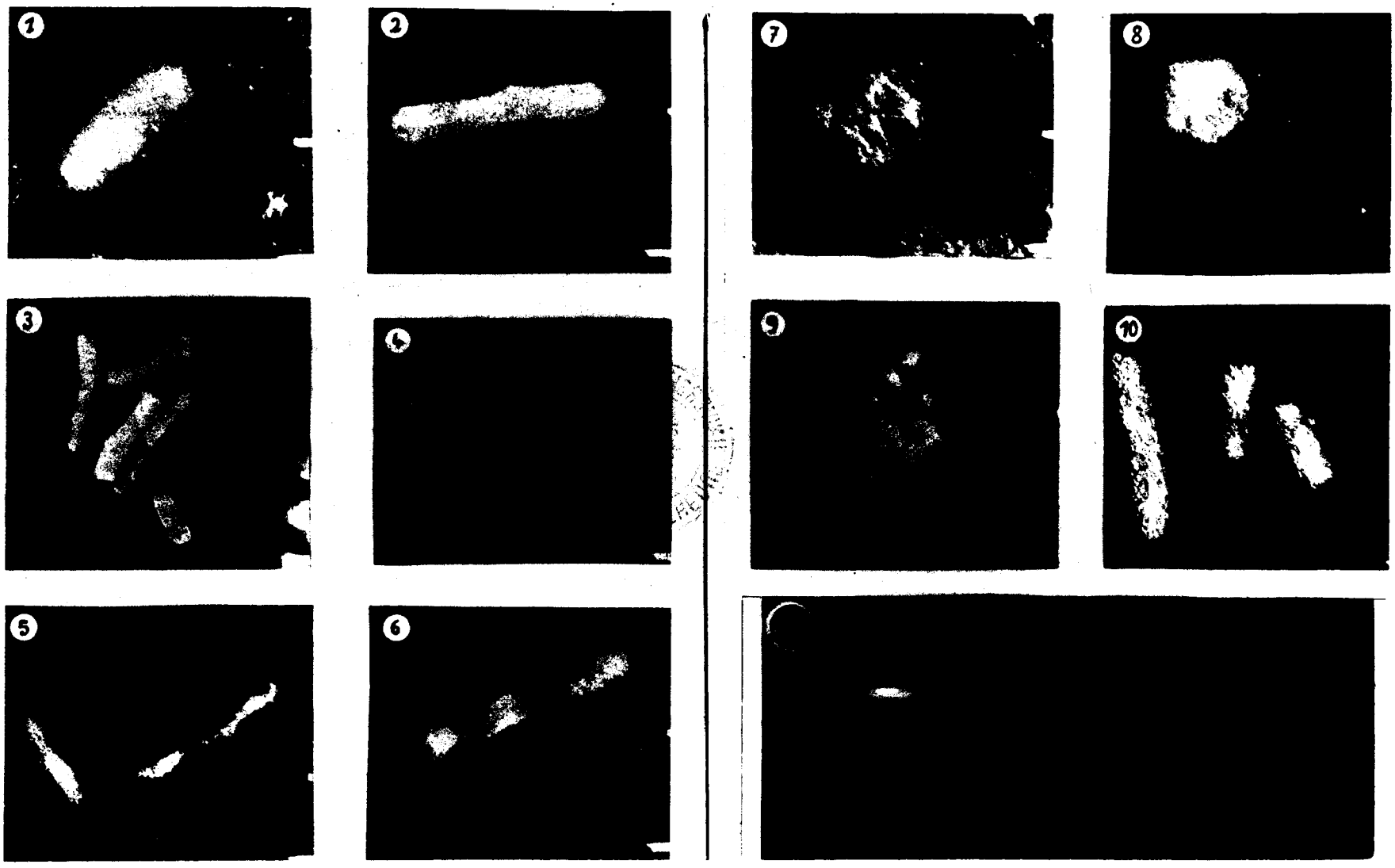
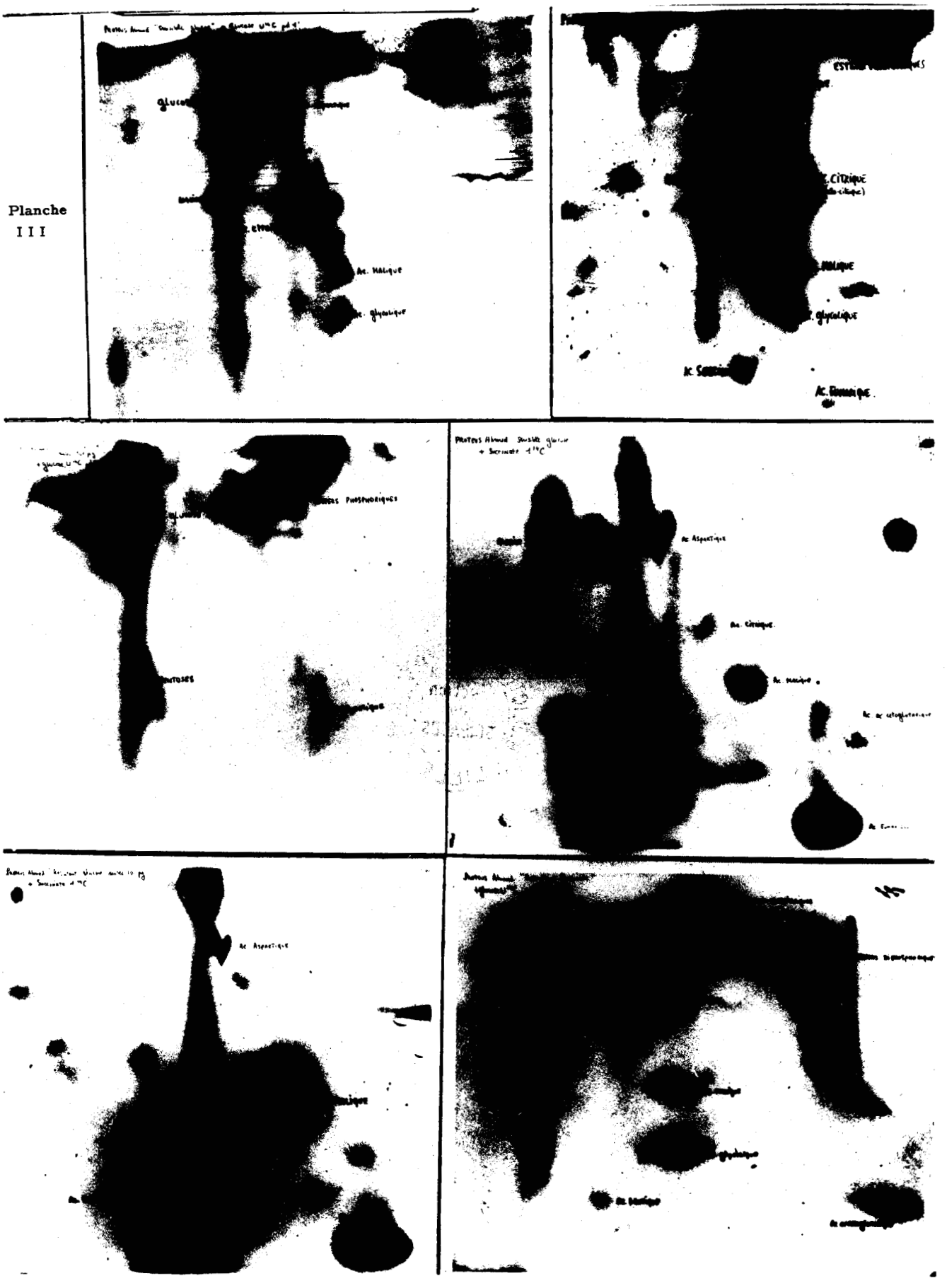


Planche III


Ac. Malique
Ac. glycolique
Ac. Citrique
Ac. Fumarique
Ac. Aspartique
Ac. Citrique
Ac. Malique
Ac. Aspartique

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABRAHAM (E. P.) et NEWTON (G. G. F.)

Ciba Foundation Symposium amino-acids and peptides with antimetabolic activity - 1958 - 205

2 - ANDERSON (T. F.)

Bacterial Viruses - Structure and fonction.
The bacteria 1, 387
Academic Press. New-York 1960

3 - BACHRACH (U.) et COHEN (I.)

Spermidine in the bacterial cell.
J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 1

4 - BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.)

The bactericidal action of synthetic detergents.
J. Exp. Med., 1941, 74, 611

5 - BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.)

Inhibition by phospholipids of the action of synthetic detergents on bacteria.
J. Exp. Med., 1941, 74, 621

6 - BEISER (S. M.) et DAVIS (B. D.)

Mucoid Mutants of E. coli
J. Bact., 1957, 74, 303

7 - BERG (P.) et JOKLIK (W. K.)

Enzymatic phosphorylation of nucleoside diphosphate.
J. Biol. Chem., 1954, 210, 657

8 - BISERTE (G.), TACQUET (A.), LECLERC (H.) et SAUTIERE (P.)

Activité de diverses histones isolées du thymus de veau sur E. coli et les Mycobactéries.
C. R. Soc. Biol., 1959, 153, 1790

./.

9 - BLISS (E.A.), CHANDLER (C.A.) et SCHOENBACH (E.B.)

In vitro studies of polymyxin.
Ann. N.Y. Acad, Sci., 1949, 51, 944

10 - BLOOM (W.L.) et BLAKE (F.G.)

Studies on an antibacterial polypeptid extracted from normal tissues.
J. Infect. Dis., 1948, 83, 116

11 - BLOOM (W.L.), WINTERS (M.G.) et WATSON (D.W.)

The inhibition of two antibacterial basic proteins by nucleic acids.
J. Bact., 1951, 62, 7

12 - BOVARNICK (M.)

The formation of extracellular D (-) glutamic acid polypeptide by Bacillus subtilis.
J. Biol. Chem., 1942, 145, 415

13 - BRANDIS (H.) et THOFERN (E.)

Über den Einfluss des Protamins auf die Ruheatnung von Staphylococcus aureus S.G. 511
Naturwiss., 1960, 47, 88

14 - BRENNEMAN (F.N.), VISHNIAC (W.) et VOLK (W.A.)

Ribose synthesis in Alcaligenes faecalis.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 3.357

15 - BRENNER (S.), DARK (F.A.), GERHARDT (P.), JEYNES (M.H.) KANDLER (O.), KELLENBERGER (E.), KLIENEBERGER-NOBEL (E.) Mc QUILLEN (K.), RUBIO-HUERTOS (M.), SALTON (M.R.J.), STRANGE (R.E.), TOMCSIK (J.) et WEIBULL (C.)

Bacterial protoplasts
Nature, 1958, 181, 1.713

16 - BRUCKNER (V.), KOVACS (J.) et DENES (G.)

Structure of poly-D-glutamic acid isolated from capsulated strains of B. anthracis.
Nature, 1953, 172, 508

17 - BRUMFITT (W.), WARDLAW (A.C.) et PARK (J.T.)

Development of lysozyme-resistance in Micrococcus lysodeikticus and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall
Nature, 1958, 181, 1.783

18 - CAPUTTO (R.), LELOIR (L.F.), CARDINI (C.E.) et PALADINI (A.C.)

Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation
J. Biol. Chem., 1950, 184, 333

19 - CAREY (W.F.) SPILMAN (W.) et BARON (L.S.)

Protoplast formation by mass adsorption of inactive bacteriophage.
J. Bact., 1957, 74, 543

20 - CASCIO (G.)

Mode of action of aureomycin.
Giorn. Microbiol., 1959, 7, 85

21 - CHARGAFF (E.), SCHULMAN (H.M.) et SHAPIRO (H.S.)

Protoplasts of E. coli as sources and acceptors of deoxypentose nucleic acid : rehabilitation of a deficient mutant.
Nature, 1957, 180, 851

22 - CIAK (J.) et HAHN (F.E.)

Mechanisms of action of antibiotics II Studies on the mode of action of cycloserine and its L stereoisomer.
Antibiot. Chemoth., 1959, 9, 47

23 - CLARKE (P.H.) et MEADOW (P.M.)

Evidence for the occurence of permease for tricarboxylic acid cycle intermediates in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol., 1959, 20, 144

24 - COLOBERT (L.)

De la nature de la membrane limitant les protoplastes obtenus par l'action du lysozyme sur Bacillus megaterium.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, 37

25 - DALY (M.M.) et MIRSKY (A.E.)

Histones with high lysine content.
J. Gen. Physiol., 1955, 38, 405

26 - DARK (F.A.) et STRANGE (R.E.)

Bacterial protoplasts from Bacillus species by the action of autolytic enzymes.
Nature, 1957, 180, 759

27 - DEERE (C.J.), DULANEY (A.D.) et MICHELSON (I.D.)

The lactase activity of Escherichia coli mutabile.
J. Bact., 1939, 37, 355

28 - DELAUNAY (A.), PELLETIER (M.) et HENON (M.)

Mise en évidence d'opsonines bactériennes non spécifiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 211

29 - DELAUNAY (A.), PELLETIER (M.) et HENON (M.)

Neoagglutinines - II Neoagglutinines tissulaires.
Path. Biol., 1959, 7, 1.869

30 - DELAUNAY (A.), HENON (M.) et PELLETIER (M.)

Inhibition du métabolisme respiratoire de diverses bactéries par un polypeptide d'origine tissulaire.
Rev. Franc. Et. Clin. Biol., 1960, 5, 187

31 - DIENES (L.) et WEINBERGER (H.J.)

The L. forms of bacteria.
Bact. Rev., 1951, 15, 245

32 - DIENES (L.) et ZAMECNIK (P.C.)

Transformation of bacteria into L forms by amino-acids.
J. Bact., 1952, 64, 770

33 - DISCHE (Z.) et SHETTLER (L.B.)

A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination.
J. Biol. Chem., 1948, 175, 595

34 - DUDMAN (W.F.) et WILKINSON (J.F.)

The composition of the extracellular polysaccharides of Aerobacter-Klebsiella strains.
Biochem. J., 1956, 62, 289

35 - DUGUID (J.P.) et WILKINSON (J.F.)

The influence of cultural conditions on polysaccharide production by Aerobacter aerogenes.
J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 174

36 - FEW (A.V.) et SCHULMAN (J.H.)

Absorption of polymyxin by bacteria.
Nature, 1953, 171, 644

37 - FEW (A.V.) et SCHULMAN (J.H.)

The absorption of polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action.
J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 454

38 - FISHER (A.)

Die Emfindlichkeit der Bakterienzelle und das baktericide serum.
Z. Hyg. Infektionskr., 1900, 35, 1

39 - FISCHER (H.) et BRANDIS (H.)

Die Wirkung basischer Proteine auf Bakteriophagen und Bakterien.
Naturwiss, 1954, 41, 533

40 - FRIEDEMAN (J.E.) et HAUGEN (G.D.)

Pyruvic Acid II. The determination of keto-acids in blood and mine.
J. Biol. Chem., 1943, 147, 415

41 - GALE (E.F.) et TAYLOR (E.S.)

Action of tyrocidin and detergents liberating amino-acids from bacterial cell.
Nature, 1946, 157, 549

42 - GALE (E.F.) et TAYLOR (E.S.)

The assimilation of amino-acids by bacteria.
II - The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amino-acids from the internal environment of Streptococcus faecalis.
J. Gen. Microbiol., 1947, 1, 77

43 - GALE (E.F.) et FOLKES (J.B.)

The assimilation of amino-acids by bacteria 15. Actions of antibiotics on nucleic and protein synthesis in Staphylococcus aureus.
Biochem. J., 1953, 43, 393

44 - GILVARG (C.) et DAVIS (B.D.)

The role of the tricarboxylic acid cycle in acetate oxidation in E. coli.
J. Biol. Chem., 1956, 222, 307

45 - GLICK (M.C.), SALL (T.), ZILLIKEN (F.) et MUDD (S.)

Morphological changes of Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus produced by a cell wall precursor.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 361

46 - GORDON (J.) et GORDON (M.)

Involution forms of the genus Vibrio produced by glycine.
J. Path. Bact., 1943, 55, 63

47 - GORDON (J.), HALL (R.A.) et STICKLAND (L.H.)

A comparison of the degree of lysis by glycine of normal and glycine resistant organisms.
J. Path. Bact., 1949, 61, 581

48 - GORDON (J.), HALL (R.A.) et STICKLAND (L.H.)

The kinetics of the lysis of Bacterium coli by glycine.
J. Hyg., 1951, 49, 169

49 - GRETCHMAN (G.), BRANDIS (H.), FISCHER (H.) et LIPPERT (W.)

Zur Wirkungsweise basischer Proteine auf Bakteriophagen.
Schweiz. Z. allg. Path., 1957, 20, 322

50 - GUILLAUME (J.), BEERENS (H.) et OSTEUX (R.)

La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C1 à C6. Son application à la détermination des bactéries anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1956, 8, 13

51 - GUILLAUME (J.), MARTIN (G.) et DERIEUX (J.C.)

Etude comparée des sphéroplastes d'Escherichia coli induits au moyen de la pénicilline et du glycocolle.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1958-1959, 10, 159

52 - GUILLAUME (J.) et OSTEUX (R.)

Mode d'action de l'auréomycine - Inhibition du métabolisme du glucose et des acides du cycle citrique chez Proteus mirabilis.
C.R. Acad. Sci., 1959, 249, 2643

53 - GUILLAUME (J.), DERIEUX (J.C.) et OSTEUX (R.)

Comparaison de l'activité bactéricide des histones avec leur pouvoir de floculer certaines protéines.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 1942

54 - GUILLAUME (J.), DERIEUX (J.C.) et MARTIN (G.)

Induction de sphéroplastes d'E. coli par les acides aminés.
C.R. Soc. Biol., 1960, 64, 138

55 - GUILLAUME (J.), OSTEUX (R.) et WATTEL (F.)

Etude métabolique de souches de Proteus mirabilis auréomycino-résistantes cultivées sur milieu complexe.
C.R. Soc. Biol., 1961, 155, 81

56 - GUILLAUME (J.), DERIEUX (J.C.) et OSTEUX (R.)

Sur l'action bactéricide des histones - Modification de la perméabilité cellulaire.
C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 1070

57 - GUILLAUME (J.), OSTEUX (R.), WATTEL (F.) et DESCHAMPS (F.)

Comparaison du mode d'action de l'auréomycine et de la mexocine chez Proteus mirabilis.
C.R. Soc. Biol., 1962, 156, 1829

58 - GUILLAUME (J.) OSTEUX (R.) et DERIEUX (J.C.)

Sur l'action bactéricide des histones ; influence de la température.
C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 2095

59 - GUILLAUME (J.), DERIEUX (J.C.) et OSTEUX (R.)

Influence de la nature de la paroi bactérienne sur la pénétration des histones.
C.R. Acad. Sci., 1964, 258, 1922

60 - HAHN (F.E.) et CIAK (J.)

Penicillin-induced lysis of Escherichia coli.
Science, 1957, 125, 119

61 - HANES (C.S.) et ISHERWOOD (F.A.)

Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram.
Nature, 1949, 164, 1107

62 - HEIDELBERGER (M.)

Lectures in immunochemistry.
Acad. Press, N.Y., 1956

63 - HENON (M.), PELLETIER (M.) et DELAUNAY (A.)

Substances antibactériennes d'origine tissulaire.
I - Pouvoir agglutinant de certains polypeptides basiques.
Rev. Immun., 1959, 23, 245

64 - HIRSCH (J.G.)

Mechanisms involved in the antimycobacterial activity of certain basic peptides.
J. Exp. Med., 1954, 99, 79

65 - HIRSCH (J.G.)

Studies of the bactericidal action of phagocytine.
J. Exp. Med., 1956, 103, 613

66 - HIRSCH (J.G.)

Bactericidal action of histone.
J. Exp. Med., 1958, 108, 925

67 - HOTCHKISS (R.D.)

The nature of the bactericidal action of surface-active agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1946, 46, 479

68 - ISHERWOOD (F.A.) et CRUICKSHANK (D.H.)

Chromatographic separation and analysis of mixtures of pyruvic-oxalacetic and alpha ketoglutaric acids.
Nature, 1954, 173, 121

69 - ITO (E.) et STROMINGER (J.L.)

Enzymatic addition of lysine to a uridine nucleotide.
J. Biol. Chem., 1960, 235, PC 7

70 - ITO (E.) et STROMINGER (J.L.)

Enzymatic synthesis of the peptide in a uridine nucleotide from Staphylococcus aureus.
J. Biol. Chem., 1960, 235, PC 5

71 - ITO (E.) et STROMINGER (J.L.)

Enzymatic synthesis of the peptide in Bacterial uridine nucleotides - I Enzymatic addition of L-alanine, D-glutamic acid, and L-lysine.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2689

72 - ITO (E.) et STROMINGER (J.L.)

Enzymatic synthesis of the peptide in Bacterial uridine nucleotides - II Enzymatic synthesis and addition of D-alanyl-D-alanine.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2696

73 - IZUMIHARA MITSUE

Aureomycin as the inhibitor of bacterial glucose oxydation. I. Action of aureomycin on the oxidation of glucose and gluconate. II. Mechanism of Auréomycin inhibition.
Okayama Igakkai Zasshi, 1959, 71, 799

74 - JACOB (F.) et FUERST (C.R.)

The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria.
J. Gen. Microbiol., 1958, 18, 518

75 - JACOB (F.) et WOLLMAN (E.)

Sexuality and the genetics of bacteria.
Academic Press, N.Y. (1961)

76 - JEYNES (M.H.)

Growth and properties of bacterial protoplasts.
Nature, 1957, 180, 867

77 - JOHNSON (E.J.) et COLMER (A.R.)

The relation of magnesium ion to the inhibition of the respiration of Azotobacter vinelandii by chlortetracycline, tetracycline and 2-4 dichlorophenoxyacetic acid.
Antibiot. Chemoth., 1957, 7, 521

78 - KANDLER (O.), HUND (A.) et ZEHENDER (C.)

Cell Wall composition in bacterial and L forms of Proteus vulgaris.
Nature, 1958, 181, 572

79 - KASS (E.H.) et SEASTON (C.V.)

The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group A hemolytic Streptococci.
J. Exp. Med., 1944, 79, 319

80 - KATZNELSON (H.), TANENBAUM (S.W.) et TATUM (E.L.)

Glucose, gluconate and 2-ketogluconate oxidation by Acetobacter melanogersum.
J. Biol. Chem., 1953, 204, 43

81 - KAUFFMANN (F.), LÜDERITZ (O.), STIERLIN (H.) et WESTPHAL (O.)

Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae.
Zbl. Bakt. (Orig.), 1960, 178, 442

82 - KLIENEBERGER-NOBEL (E.)

Filterable forms of bacteria
Bact. Rev., 1951, 15, 77

83 - KLIENEBERGER-NOBEL (E.)

The Bacteria 1, 363
Academic Press N.Y. (1960)

84 - KNOX (W.E), AUERBACH (V.H.), ZARUDNAYA (K.) et SPIRTES (M.)

The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes
J. Bact., 1949, 58, 443

85 - KORNBERG (H.L.) et MADSEN (M.B.)

Synthesis of C4 dicarboxylic acids from acetate by a "glyoxylate bypass" of the tricarboxylic acid cycle
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 651

86 - KORNERG (H.L.) et MADSEN (N.B.)

Formation of C4 dicarboxylic acids from acetate by Pseudomonas KB1.
Biochem. J., 1957, 66, 13

87 - KOSSEL (A.)

The protamines and histones
Monographs on biochemistry - Longmans, Gramand C°
Londres 1938

88 - KRASHIN (K.S.) et STERN (A.M.)

Terramycin inhibition of gluconate oxidation
by E. coli.
J. Bact., 1957, 73, 608

89 - KUBY (S.A.) et LARDY (H.A.)

Purification and kinetics of D-galactosidase from
Escherichia coli strain K 12
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 890

90 - LANCEFIELD (R.C.)

Streptococcal infection
Columbia Univ. Press. N.Y., 1956

91 - LANDMAN (O.E.), ALTENBERN (R.A.) et GINOZA (H.S.)

Quantitative conversion of cells and protoplasts of
Proteus mirabilis and Escherichia coli to the L-form
J. Bact., 1958, 75, 567

92 - LARK (C.) et LARCK (K.G.)

The effects of D-aminoacids on Alcaligenes
faecalis.
Canad. J. Microbiol., 1959, 5, 369

93 - LARK (C.) et LARK (K.G.)

Studies on the mechanism by wich D amino acids
block cell wall synthesis.
Biochim. Biophys. Acta., 1961, 49, 308

94 - LATTERADE (C.) et MACHEBOEUF (M.)

Recherches biochimiques sur le mode d'action
de la Polymyxine.
Ann. Inst. Pasteur., 1950, 78, 753

95 - LATURAZE (J.)

Etude chromatographique des acides organiques
fixes des liquides biologiques
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie - 1959 - Lille -

96 - LEDERBERG (J.)

The β-D-galactosidase of Escherichia coli strain K 12
J. Bact., 1950, 60, 381

97 - LEDERBERG (J.) et St CLAIR (J.)

Protoplasts and L-type growth of Escherichia coli.
J. Bact., 1958, 75, 143

98 - LIEBERMEISTER (K.) et KELLENBERGER (E.)

Studien zur L-Form der Bakterien
Z-Naturforsch., 1956, 116, 200

99 - MAC CLEAN (D.)

Further observations on testicular extract and its effect upon tissue permeability
J. Path. Bact., 1931, 34, 459

100 - MAC QUILLEN (K.)

The Bacteria 1, 249
Academic Press N.Y. 1960

101 - MACULA (E.S.) et COWLES (P.B.)

Use of glycin in disruption of bacteria cells
Science, 1948, 107, 376

102 - MAGER (J.)

The stabilizing effect of spermine and related polyamines and bacterial protoplasts
Biochim. Biophys. Acta., 1959, 36, 529

103 - MANDELSTAM (J.) et ROGERS (H.J.)

The incorporation of amino acids into the cell wall mucopeptide of Staphylococci and the effect of antibiotics on the process.
Biochem. J., 1959, 72, 654

104 - MASSART (L.)

Antagonism between basic compounds (spermine, streptomycin) and basic bactericidal substances.
Nature, 1948, 162, 779

105 - METCHNIKOFF (E.)

Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation
1892 I N° 8, Masson, Paris

106 - MICHEL (M.F.) et HIJMANS (W.)

The additive effect of glycin and other aminoacids on the induction of the L phase of group A -haemolytic streptococci by penicillin and D-cycloserine.
J. Gen. Microbiol., 1960, 23, 35

107 - MILLER (B.F.), ABRAMS (R.), DORFMAN (A.) et KLEIN (M.)

Antibacterial properties of protamine and histone.
Science, 1942, 96, 428

108 - MITCHELL (P.)

Biochemical cytology of microorganisms.
Ann. Rev. Microbiol., 1959, 13, 407

109 - MONTREUIL (J.), DERUMEZ (P.) et BOULANGER (P.)

Chromatographie et électrophorèse quantitatives des nucléotides des acides ribonucléiques tissulaires. Relations chimiques entre acides ribo et desoxyribonucléiques.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 3100

110 - MORGAN (H.R.) et BECKWITH (T.D.)

Mucoid dissociation in the colon-typhoid-Salmonella group.
J. Infect. Dis., 1929, 65, 113

111 - MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.), DU PASQUIER (P.) et LATRILLE (J.)

Sur quelques propriétés de la Kanamycine "in vitro"
Path. Biol., 1961, 9, 1539

112 - MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.), DU PASQUIER (P.) et LATRILLE (J.)

Influence de la protamine sur la morphologie des bactéries.
Ann. Inst. Pasteur. 1961, 101, 192

113 - MURPHY (J.S.)

A phage-associated enzyme of Bacillus megaterium which destroye the bacterial cell wall.
Virology, 1957, 4, 563

114 - NEUBERGER (A.) et SCOTT (J.J.)

Amino levulinic acid and porphyrin biosynthesis.
Nature, 1953, 172, 1093

115 - NEWTON (B.A.)

The releaseof soluble constituents from washed cells of Pseudomonas aeruginosa by the action of polymyxin.
J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 54

116 - NEWTON (B.A.)

Site of action of polymyxin on Pseudomonas aeruginosa : antagonism by cations.
J. Gen. Microbiol., 1954, 10, 491

117 - NEWTON (B.A.)

A fluorescent derivative of polymyxin ; its preparation and use in studying the site of action of the antibiotic
J. Gen. Microbiol., 1955, 12, 226

118 - NEWTON (B.A.)

The properties and mode of action of the polymyxins.
Bact. Rev., 1956, 20, 14

119 - NEWTON (B.A.)

The mechanism of the bactericidal action of surface active compounds ; a summary.
J. Appl. Bact., 1960, 23, 345

120 - NUTINI (L.G.) et KREKE (C.W.)

The toxic effect of splenic extracts on Streptococcus hemolyticus.
J. Bact., 1942, 44, 661

121 - O'BRIEN (P.J.), GLICK (M.C.) et ZILLIKEN (F.)

Acidic aminosugar from bacteria. Incorporation of (1 - ^{14}C)- α, β -methyl-N-acetyl-D-glucosaminide into muramic acid.
Biochim., Biophys. Acta, 1960, 37, 357

122 - OSTEUX (R.), LATURAZE (J.) et BURCK (J.)

Action inhibitrice de l'Auréomycine sur la respiration bactérienne et l'oxydation des acides du cycle citrique.
C.R. Acad. Sci., 1952, 235, 554

123 - OSTEUX (R.), LATURAZE (J.), BURCK (J.) et BOULANGER (M.P.)

Action de l'Auréomycine sur les systèmes enzymatiques bactériens.
J. Med. Bordeaux., 1953, 130, 393

124 - OSTEUX (R.) et LATURAZE (J.)

Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils de l'urine humaine.
Clin. Chim. Acta., 1956, 1, 378

125 - OSTEUX (R.), GUILLAUME (J.), TRAN VAN KY et LATURAZE (J.)

Les acides organiques des milieux biologiques : identification directe par électro-chromatographie sans déminéralisation.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 1150

126 - PARK (J.T.) et STROMINGER (J.L.)

Mode of action of penicillin - Biochemical basis for the mechanism of action of penicillin and for its selective toxicity.
Science, 1957, 125, 99

127 - PARK (J.T.)

Inhibition of cell wall synthesis in Staphylococcus aureus by chemicals wich cause accumulation of cell wall precursors.
Biochem. J., 1958, 70, 2 P

128 - PELLETIER (M.), HENON (M.) et DELAUNAY (A.)

Agglutination bactérienne provoquée par des polypeptides basiques d'origine tissulaire.
C.R. Acad. Sci., 1959, 249, 800

129 - POSTGATE (J.R.)

Cytochrome C_3 and disulphoviridin : pigments of the anaerobe Desulphovibrio desulphuricans.
J. Gen. Microbiol., 1956, 14, 545

130 - PRIMOSIGH (J.), PELZER (H.), MAASS (D.) et WEIDEL (W.)

Chemical characterization of mucopeptides released from the E. coli B cell wall by enzymic action.
Biochim. Biophys. Acta., 1961, 46, 68

131 - QUASTEL (J.H.) et WHETHAM (M.D.)

Dehydrogenations produced by resting bacteria.
Biochem. J., 1924, 18, 520

132 - RAZIN (S.) et ROZANSKY (R.)

Mechanism of the antibacterial action of spermine.
Arch. Biochem., 1959, 81, 36

133 - REPASKE (R.)

Lysis of Gram-negative bacteria by lysozyme.
Biochim. Biophys. Acta., 1956, 22, 189

134 - RICHMOND (M.H.) et PERKINS (H.R.)

Possible precursors for the synthesis of muramic acid by Staphylococcus aureux 524.
Biochem. J., 1960, 76, 1 p

135 - RICKENBERG (H.V.), COHEN (G.N.), BUTTIN (G.) et MONOD (J.)

La galactoside-perméase d'E. coli.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 829

136 - ROGERS (H.J.) et PERKINS (H.R.)

5 Fluorouracil and mucopeptides biosynthesis by Staphylococcus aureus.
Biochem. J., 1960, 77, 448

137 - RYAN (F.J.), OKADA (T.) et NAGATA (T.)

Spontaneous mutation in spheroplasts of Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol., 1963, 30, 193

138 - SALMON (J.)

Comparaison des activités bactériolytiques du pyrophosphate et de la glycine.
C.R. Soc. Biol., 1952, 146, 792

139 - SALTON (M.R.J.)

The adsorption of cetyltrimethyl ammonium bromide by bacteria ; its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects.
J. Gen. Microbiol., 1951, 5, 391

140 - SALTON (M.R.J.)

Bacterial anatomy. 91
Univ. Press. Cambridge, 1956.

141 - SALTON (M.R.J.) et G HUYSEN (J.M.)

The Structure of di-and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and Streptomyces F1 enzyme and the β (1→4) N-acetyl hexosaminidase activity of these enzymes.
Biochim. Biophys. Acta., 1959, 36, 552

142 - SAUKKONEN (J.J.)

Acid-soluble nucleotides of Staphylococcus aureus : massive accumulation of a derivative of cytidine diphosphate in the presence of penicillin.
Nature, 1961, 192, 816

143 - SAUTIERE (P.)

Contribution à l'étude des histones des tissus normaux et néoplasiques
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie - LILLE 1959

144 - SAZ (A.K.) et SLIE (R.B.)

Reversal of aureomycine inhibition of bacterial cell free nitroreductase by manganèse.
J. Biol. Chem., 1954, 210, 407

145 - SAZ (A.K.), BROWNELL (L.W.) et SLIE (R.B.)

Aureomycin-resistant cell free nitro-reductase from aureomycin resistant E. coli.
J. Bact., 1956, 71, 421

146 - SAZ (A.K) et MARTINEZ (L.M.)

Enzymatic basis of resistance to aureomycin. I. Difference between flavoprotein nitroreductase of sensitive and resistant E. coli.
J. Biol. Chem., 1956, 223, 285

147 - SAZ (A.K.) et MARTINEZ (L.M.)

Enzymatic basis of resistance to aureomycin. Inhibition of electron transport in E. coli by aureomycin.
J. Biol. Chem., 1958, 233, 1020

148 - SAZ (A.K.) et MARTINEZ (L.M.)

Enzymatic basis of resistance to aureomycin. Inhibition by aureomycin of protein-stimulated electron transport in E. coli.
J. Bact., 1960, 79, 527

149 - SENEZ (J.)

Some considerations on the energetics of bacterial growth.
Bact. Rev., 1962, 26, 95

150 - SHEMIN (D.) et RUSSEL (C.S.)

δ -amino levulinic acid, its role in the biosynthsis of porphyrins and purines.
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4.873

151 - SHOCKMAN (G.D.), KOLB (J.J.) et TOENNIES (G.)

Relations between bacterial cell wall synthetis, growth phase and autolysis.
J. Biol. Chem., 1958, 230, 961

152 - SHOCKMAN (G.D.), CONOVER (M.J.), KOLB (J.J.) PHILLIPS (P.M.), RILEY (L.S.) et TOENNIES (G.)

Lysis of Streptococcus faecalis.
J. Bact., 1961, 81, 36

153 - SKARNES (R.C.) et WATSON (D.W.)

Characterization of an antibacterial peptide from calf thymus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 93, 267

154 - SMITH (R.A.) et GUNSALUS (I.C.)

Distribution and formation of isocitratase.
Nature, 1955, 175, 774

155 - SPITZNAGEL (J.K.)

The effects of mammalian and other cationic polypeptides on the cytochemical character of bacterial cells.
J. Exp. Med., 1961, 114, 1063

156 - STEDMAN (R.L.), KRAVITZ (E.) et KING (J.D.)

Studies on cell surface-germicide and enzyme-germicide reactions and their contribution to the lethal effect.
J. Bact., 1957, 73, 655

157 - STRANGE (R.E.) et DARK (F.A.)

A cell wall lytic enzyme associated with spores of Bacillus species.
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, 236

158 - STRANGE (R.E.) et DARK (F.A.)

Cell-wall lytic enzymes at sporulation and spore germination in Bacillus species.
J. Gen. Microbiol., 1957, 17, 525

159 - STROMINGER (J.L.)

Microbial uridine 5'pyrophosphate N- acetyl-amino sugar compounds.
I. Biology of the penicillin - induced accumulation.
J. Biol. Chem., 1957, 224, 509

160 - STROMINGER (J.L.)

Enzymatic transfer of pyruvate to uridine diphospho-acetylglucosamine.
Biochim. Biophys. Acta., 1958, 30, 645

./.

161 - STROMINGER (J.L.), SCOTT (S.) et THRENN (R.H.)

Isolation from E. coli of a uridine nucleotide containing diaminopimelic acid.
Fed. Proc., 1959, 18, 334

162 - STROMINGER (J.L.) et SMITH (M.S.)

Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase.
J. Biol.Chem., 1959, 234, 1822

163 - STROMINGER (J.L.) et THRENN (R.H.)

Accumulation of a uridine nucleotide in Staphylococcus aureus as a consequence of lysine deprivation.
Biochim. Biophys., Acta, 1959, 36, 83

164 - STROMINGER (J.L.), ITO (E.), THRENN (R.H.)

Competitive inhibition of enzymatic reactions by oxamycin.
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 998

165 - STROMINGER (J.L.)

Biosynthesis of Bacterial cell walls
The Bacteria 3 - 413
Academic Press N.Y. (1962)

166 - TAKAGI (Y.) et OTSUJI (N.)

Studies on the mechanism of action of 6-azauracil
Biochim. Biophys. Acta., 1958, 29, 227

167 - THOFERN (E.) et BRANDIS (H.)

Über den Einfluss des Protamins auf den Oxydationsstoffwechsel von Staphylococcus aureus und über die Protamin-bedingte Abtötung der Bakterien.
Zbl. Bakt. Orig., 1960, 179, 483

168 - THORNE (C.B.)

Bacterial anatomy.
Univ. Press. Cambridge. (1956) 68

./.

169 - TOMCSIK (J.)

Effect of disinfectants and of surface-active agents on bacterial protoplasts.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 459

170 - TOMCSIK (J.)

Bacterial antomy. 41
Univ. Press. Cambridge (1956)

171 - TOMCSIK (J.) et GUEX-HOLZER (S.)

Anderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozim - Einwirkung.
Schweiz. Z. allg. Path., 1952, 15, 517

172 - TRUCCO (R.E.) et PARDEE (A.B.)

Synthesis of Escherichia coli cell walls in the presence of penicillin.
J. Biol. Chem., 1958, 230, 435

173 - TULASNE (R.)

Les formes L des bactéries.
Rev. Immun., 1951, 15, 223

174 - WEIBULL (C.)

The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme.
J. Bact., 1953, 66, 688

175 - WEIDEL W.

Über die Zellmembran von E. coli B.I
Präparierung der Membranen - Analytische Daten. Morphologie. Verhalten der Membranen gegenüber den Bakteriophagen der T-serie.
Z. Naturforsch. 1951, 6 b, 251

176 - WEIDEL (W.), FRANK (H.) et MARTIN (H.H.)

The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli Strain B
J. Gen. Microbiol., 1960, 22, 158

177 - WEINBERG (R.) et DOUDOROFF (M.)

The oxidation of L arabinose by Pseudomonas saccharophila.
J. Biol. Chem., 1955, 217, 607

178 - WEISSMAN (N.) et GRAF (L.H.)

Studies on infection with Bacillus anthracis
VII - A comparaison of the antibacterial effects of calf thymus histone and a quaternary ammonium cationic detergent on B. anthracis.
J. Infect. Dis., 1947, 80, 145

179 - WELSCH (M.)

Formation de protoplastes d'Escherichia coli sous l'influence de la glycine et d'autres acides aminés.
Schweiz. Z. Allg. Path., 1958, 21, 741

180 - WESTPHAL (O.)

Les nouveaux sucres - exposé introductif.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 90

181 - WILKINSON (J.F.), DUDMAN (W.F.) et ASPINALL (G.O.)

The extracellular polysaccharide of Aerobacter aerogenes A 3 (S 1) (Klebsiella type 54).
Biochem. J., 1955, 59, 446

182 - WILKINSON (J.F.)

The extracellular polysaccharides of bacteria
Bact. Rev., 1958, 22, 46

183 - WONG (D.T.O.) et AJL (S.J.)

Isocitratase in Escherichia coli.
Nature, 1955, 176, 970

184 - WORK (E.)

The isolation of α ε diaminopimelic acid from Corynebacterium diphteriae and Mycobacterium tuberculosis.
Biochem. J., 1951, 49, 17

185 - WURTZ (B.) et JEHL (L.)

Le rôle de l'acide 2 cétogluconique dans le métabolisme d'une souche de Pseudomonas fluorescens.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1023

186 - YEE (R.B.)

Oxidation of glutamate by Shigella flexnerii 3 and its inhibition by Aureomycin.
Diss. Abstr., 1957, 17, 2.126

187 - YEE (R.B.), PAN (S.F.) et GEZON (H.M.)

Studies on the metabolism of Shigella. III The inhibition of the oxidation of glutamate by Aureomycin.
J. Bact., 1958, 75, 56

188 - YOSHIRO YABE, KAZNO AKITA et YOSHIMI AKITA

Action of various inhibitions and antibiotics on glutamate respiration of Staphylococcus.
Okayama Igakkai Zasshi, 1957, 69, 2.505

189 - YOSHIRO YABE, GORO NAKAYAMA, SEI HAYASKI, RYOHEI HASHIMOTO et SHIGETADA ONO

Comparative study on the action of Auromycin and Terramycin.
Okayama Igakkai Zasshi, 1958, 70, 2.547

190 - YU WANG, AMNN (W.), LUNG-SEN CHEN, YVANCHU YANG et DA-SEN WANG

Mechanism of antibiotic action of Aureomycin. Effect on the respiration of E. coli.
Shengli Hsuch Pao, 1956, 20, 255

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE