

DES RELATIONS NUMÉRIQUES ENTRE BACTÉRIES LYSOGÈNES ET PARTICULES DE BACTÉRIOPHAGE

[par ANONÉ GRATIA.

(*Institut de Bactériologie de l'Université de Liège*)

Dans une note parue à la Société de Biologie, il y a un an, M. et M^{me} Wollman [1] ont rapporté les résultats de leurs expériences sur une souche de *B. megatherium* spontanément lysogène pour une souche asporogène de ce bacille, souches toutes deux isolées par Den Dooren de Jong [2]. Ils ont confirmé cette note par un mémoire paru dans les *Annales de l'Institut Pasteur* en février dernier [3].

Leurs principales conclusions sont les suivantes :

1° Le titre lytique d'une culture en *bouillon* du *B. megatherium* lysogène 899 serait remarquablement bas (10^1 , 10^2) et très inférieur à celui qu'on obtient avec les lysats bactériophagiques (10^8 , 10^9).

2° Les cultures de *B. megatherium* lysogène sur milieu solide (gélose sèche) ne contiennent pas de bactériophages libres.

3° De telles cultures contiennent des bactériophages intracellulaires. Ces bactériophages peuvent être mis en liberté lorsqu'on fait dissoudre les bactéries par du lysozyme sous forme de blanc d'œuf.

4° Sous l'action de ce lysozyme, les suspensions de *B. megatherium* cultivé sur gélose mettent en liberté autant de particules de bactériophage qu'elles donnaient de colonies par ensemencement avant ce traitement.

M. et M^{me} Wollman déduisent de cette stricte relation qu'il y a une particule de bactériophage dans chaque germe lysogène. Ils considèrent cette notion comme difficilement compatible avec la théorie diastasique et avec la notion parasitaire des bac-

tériophages, mais comme confirmant remarquablement leur théorie selon laquelle le bactériophage serait un « facteur lysogène héréditaire », c'est-à-dire une particule représentative d'hérédité.

Dès la publication de la note de M. et M^{me} Wollman, j'ai essayé de vérifier la curieuse relation numérique invoquée par ces auteurs en faveur de leur thèse; mais j'ai constaté l'intervention de causes d'erreur que j'ai déjà rapportées dans ces *Annales* [4]. Sans vouloir revenir ici sur cette discussion, je rappelle deux critiques principales que j'ai formulées, à savoir :

Les émulsions du streptobacille qu'est le *B. megatherium* sont constituées :

1° Non pas d'individus isolés, mais de chaînettes de plusieurs individus, ce qui fausse entièrement les résultats des numérations du microbe;

2° D'autre part, de spores résistantes au lysozyme et dont la présence dans la culture sensible produit des taches claires qui faussent le résultat des numérations des taches de bactériophage.

A ce mémoire faisait suite une réponse de Wollman [5] qui ne m'a nullement convaincu, notamment en ce qui concerne l'objection péremptoire du facteur « chaînette » mais qui, par contre, réfute à juste titre l'objection du facteur « spore ». Dans leur note, M. et M^{me} Wollman disaient que leurs émulsions de bacilles lysogènes étaient faites avec des cultures âgées de dix-huit heures. Je ne pouvais pas deviner qu'ils entendaient par là des cultures ayant séjourné seulement treize heures à 37° et cinq heures à la température du laboratoire, ainsi qu'ils le précisent seulement beaucoup plus tard; ces cultures étaient alors non encore pourvues de spores, tandis que mes cultures ayant passé dix-huit heures entièrement à 37°, en contenaient dans la proportion d'environ une par chaînette d'une dizaine d'individus microbiens. Les expériences de Wollman étaient donc faites avec des émulsions sans spores. Je retire très volontiers cette critique résultant d'un malentendu dont je ne suis pas responsable. Mais alors si l'on fait abstraction du facteur « spore », on constate que, dans mes expériences, on ne retrouve plus la relation numérique de M. et M^{me} Wollman et je suis donc en désaccord non seulement sur l'interprétation,

mais encore sur le fait lui-même. J'ai poursuivi mes recherches avec le vif désir d'obtenir exactement les mêmes résultats que M. et M^{me} Wollman. Pendant l'espace d'un an qui sépare la note de ces auteurs et la rédaction de ce mémoire, j'ai accompli au cours de multiples expériences des centaines de numérations, seule façon d'obtenir une représentation statistique convenable des relations numériques entre les individus lysogènes et les particules de bactériophage qu'elles libèrent; malheureusement, je n'ai pu vérifier aucune des données de M. et M^{me} Wollman rappelées ci-dessus.

Dans deux notes préliminaires [6], j'ai déjà résumé très brièvement mes principaux résultats. Je désire les rapporter ici de façon aussi concise que possible, mais avec la précision désirable pour éviter tout malentendu.

MATÉRIEL DE RECHERCHE.

Voici l'origine des souches que j'ai employées :

De juin à octobre 1935, j'ai utilisé comme souche lysogène, le *B. megatherium* 899 sporulé et comme souche sensible le *B. megatherium* 36 (mutilat) asporulé que je devais à l'obligeance de M. Wollman, lequel les avait lui-même reçues de Den Dooren de Jong.

D'octobre 1935 à mars 1936, j'ai continué mes expériences avec ces souches, mais concurremment avec une souche de *B. megatherium* 899 et avec une souche de *B. megatherium* « mutilat » 338 b', que je dois à l'obligeance de M. Den Dooren de Jong. Enfin, je me suis demandé si les divergences entre les faits décrits par M. et M^{me} Wollman et les miens ne résidaient pas dans d'éventuelles variations microbiennes survenues dans mes cultures. J'ai redemandé à M. Wollman ses souches 889 et 36, et c'est avec ces dernières cultures que j'ai refait toutes mes expériences de mars à juin 1936. Qu'il me soit permis de remercier encore ici MM. Den Dooren de Jong et Wollman pour leurs aimables envois.

Pour la conservation, les souches stock ont été régulièrement repiquées tous les huit jours et placées vingt heures à 37°; elles étaient ensuite conservées à la glacière. Toutefois, mes expériences se poursuivant de façon presque quotidienne, les

souches dont je me servais couramment étaient en fait repiquées quasi tous les jours. Entretienues sur gélose ordinaire jusqu'en octobre 1935, elles le furent dans la suite sur gélose peptonée (eau 1.000, peptone 20, gélose 25). Les milieux de culture étaient ajustés à pH 7,4.

Au cours de mes recherches, j'ai retrouvé des faits qui, tout au moins en certains points, concordent avec ceux observés par Den Dooren de Jong. Les cultures de *B. megatherium* 899 sur gélose peptonée donnent, après quelques jours, des colonies secondaires de coloration jaune se détachant comme des gouttelettes de beurre fondu sur le fond crème de la culture qui, primitivement sèche, devient muqueuse. A ce moment, tout le fond est entièrement formé de spores, tandis que les taches jaunes sont constituées par des bacilles présentant des formes d'involution aboutissant à un aspect de levures. Si l'on soumet à l'isolement le matériel muqueux sporulé, on obtient des colonies sèches, rugueuses, qui vont évoluer exactement comme ci-dessus en redonnant la même dissociation, tandis que les taches jaunes soumises à l'isolement donnent des colonies lisses qui ne sporuleront pas. En somme, les premières colonies sont du type R, les secondes du type S. Comme le type R sporule, il se conserve aisément; par contre, le type S asporogène est fragile. Le type R est beaucoup plus filamenteux que le type S, lequel s'obtiendra assez facilement sous forme de bacilles isolés, lorsqu'on émulsionne un prélèvement fait sur la partie la plus sèche de la gélose inclinée. On entretient aisément ces deux types à l'état pur en les soumettant régulièrement à l'isolement et en sélectionnant chaque fois des colonies typiques. Ces observations ressemblent à beaucoup de cas analogues de dissociation décrits pour d'autres microbes; elles ont certainement un caractère de généralité qui doit avoir une signification importante. On a beaucoup invoqué l'existence éventuelle de cycles microbiens; les faits ci-dessus suggèrent l'idée de générations alternantes et l'on peut se demander si, par analogie avec ce qui se passe chez les végétaux, le type R du *B. megatherium* ne serait pas l'équivalent d'un « sporophyte » et le type S, l'équivalent d'un « gamétophyte ».

TECHNIQUE DE TITRAGE DU BACTÉRIOPHAGE.

Le titrage du bactériophage est établi par la numération des taches claires que fait une dilution convenable du bactériophage sur un fond de microbes sensibles poussant en milieu solide. La plupart des auteurs, lorsqu'ils utilisent cette méthode, mélangent dans un tube stérile une émulsion de microbes sensibles avec une quantité donnée de bactériophage; puis ils étalent, à l'aide d'une anse de platine, une certaine quantité du mélange à la surface de la gélose nutritive contenue dans une boîte de Petri. Cette technique, qui a été utilisée par M. et M^{me} Wollman, n'a jamais eu mes préférences, car elle offre plusieurs inconvénients. D'abord, la quantité de liquide à titrer que l'on peut étaler ainsi à la surface d'une boîte de Petri ne dépasse guère 0 c. c. 1, soit environ 11 gouttes, quantité trop petite pour pouvoir être mesurée avec précision. De plus l'étalement n'est jamais homogène : trop dense à certains endroits, il sera trop maigre à d'autres. Ici, la couche microbienne sera discontinue, réduite même à des colonies isolées entre lesquelles des particules de bactériophage seront perdues; là, au contraire, l'étalement trop épais restera trop longtemps humide et les taches y auront une tendance fâcheuse à la confluence. On comprendra mieux ce que je veux dire en voyant les figures 1a et 1b illustrant la réponse de Wollman [5] à mon mémoire antérieur [4].

C'est pourquoi j'ai de tout temps préféré faire directement, dans la boîte de Petri stérile, le mélange bactériophage-microbe sensible, en quantité suffisamment grande pour être aisément mesurable, puis d'y ajouter la gélose nutritive fondue, dans laquelle on incorpore le mélange de façon bien homogène.

Mais si cette technique a sur la précédente l'avantage d'une plus grande précision et d'une homogénéité parfaite, elle présente l'inconvénient que microbes et bactériophages se trouvent non plus répartis en une mince couche superficielle, mais disséminés dans toute l'épaisseur de la gélose. Cela est souvent sans importance; mais dans certains cas la numération des taches peut en être gênée; de plus, la gélose nutritive ayant étéensemencée dans toute sa masse au lieu de ne l'être qu'à la

surface, elle s'épuise plus rapidement, la culture s'arrête et corrélativement les taches n'atteignent pas toujours leur meilleur développement. C'est pourquoi j'ai mis au point une technique qui évite les inconvénients des deux précédentes, tout en combinant leurs avantages. En voici la description :

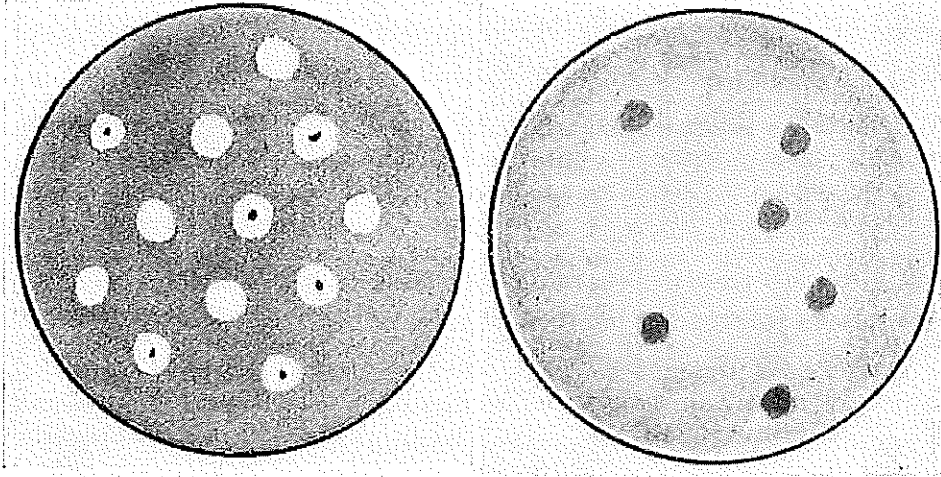
A partir d'une culture âgée de douze heures à 37° du *B. megatherium* sensible sur eau peptonée gélosée, on fait une émulsion bien homogène et très légèrement trouble en eau peptonée. Dans un tube stérile large, on mélange 3 c. c. 5 de cette émulsion, 0 c. c. 5 d'une dilution convenable du bactériophage à titrer, 1 cent. cube d'eau peptonée contenant 2,5 p. 100 d'agar-agar maintenue en surfusion à 55°. Dans ce mélange, le titre du bactériophage sera réduit au 1/10 de ce qu'il était, c'est-à-dire qu'il y sera de 10⁴ s'il y était de 10⁵. Quant à l'agar-agar, il sera à la concentration faible de 0,5 p. 100. Avec la pipette de 1 cent. cube qui vient de servir à verser l'eau peptonée gélosée, on aspire et refoule deux fois le mélange de façon à bien l'homogénéiser puis on prend 1 cent. cube qu'on verse au milieu d'une boîte de Petri contenant déjà une couche d'environ 0 cent. 5 d'épaisseur d'eau peptonée gélosée qu'on y aura coulée la veille. Grâce à la légère viscosité que lui confère le 1/2 p. 100 d'agar-agar, le centimètre cube du mélange s'étale spontanément de façon régulière; on favorisera néanmoins cet étalement en animant la boîte d'un léger mouvement de circonduction qu'on arrêtera dès que le mélange commencera à se solidifier. On réalise ainsi cette condition idéale d'un mélange de bactériophage et de microbes sensibles étalé à la fois de façon bien homogène et en couche mince à la surface d'une épaisse couche de gélose nutritive. Après dix minutes, lorsque la solidification est bien assurée, on retourne la boîte pour la placer à 37° pendant quatre à cinq heures, puis à la température ordinaire. La lecture se fera de préférence après trente-six heures, lorsque les taches de bactériophage auront atteint à peu près le développement maximum. Les images ainsi obtenues sont toujours d'une remarquable netteté (voir figures et planches).

NUMÉRATION DES COLONIES LYSOGÈNES.

La technique que je viens de décrire convient également de façon remarquable à la mise en évidence et à la numération des colonies lysogènes.

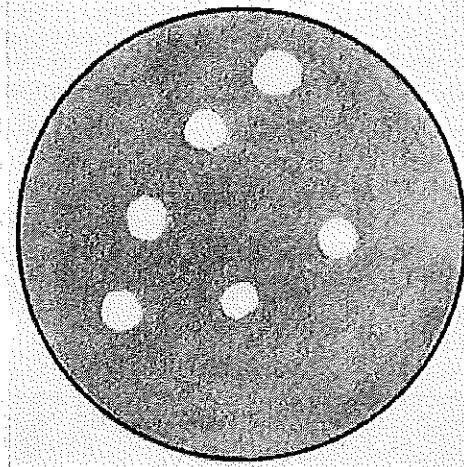
Comme je l'avais observé il y a une dizaine d'années et rapporté ici seulement en 1932 [7], lorsque des microbes exerçant un antagonisme à l'égard d'un autre microbe ou lorsque des microbes lysogènes sont disséminés parmi une masse homogène de microbes sensibles, chaque individu antagoniste ou lysogène réserve autour de lui une zone de gélose nutritive où son action inhibitrice interdit toute croissance au microbe sensible. La couche uniforme de la culture sensible est ainsi

parsemée de taches claires, identiques à des taches vierges de bactériophage, sauf que le centre en est occupé par une



a) Numération simultanée des colonies lysogènes et des taches de bactériophage sur culture sensible.

b) Numération des colonies seules sur gélose ordinaire.



c) Numération des taches de bactériophage seul sur culture sensible.

FIG. 1.

minuscule colonie du microbe antagoniste ou du microbe lysogène.

Si l'émulsion contient, outre les individus lysogènes, des particules de bactériophage libre, on trouvera simultanément

sur la même boîte de Petri les taches claires centrées par les colonies lysogènes et les taches vierges de bactériophage libre ; la relation numérique entre les deux données s'y trouve ainsi automatiquement inscrite. On conçoit aisément l'avantage que cette technique offre, sur la technique classique de numération microbienne, pour le problème qui nous occupe ici. Son usage constant m'a montré, — comme je l'ai déjà brièvement signalé dans mon précédent mémoire, et comme nous le verrons plus loin — qu'à l'inverse de l'opinion formulée par M. et M^{me} Wollman, les cultures de *B. megatherium* lysogène sur gélose ne sont pas exemptes de bactériophage libre.

On peut néanmoins désirer avoir les deux données numériques, le nombre de colonies lysogènes et le nombre de taches de bactériophage, non plus simultanément, mais séparément. (C'est le cas, entre autres, lorsque ces deux données sont d'un ordre de grandeur très différent). Il suffit alors d'apporter à la technique une légère modification appropriée à chaque cas. Si l'on veut avoir uniquement le nombre de colonies lysogènes, il suffira de ne pas introduire de microbes sensibles dans le mélange ; on ajoutera 0 c. c. 5 de l'émulsion lysogène à 3 c. c. 5 d'eau peptonée stérile au lieu de 3 c. c. 5 d'émulsion sensible. Si l'on veut, au contraire, uniquement le nombre de taches de bactériophage libre, on maintiendra évidemment l'émulsion sensible, mais on centrifugera l'émulsion lysogène de façon modérée (cinq minutes à 5.000 t/m), de façon à éliminer les microbes lysogènes tout en maintenant les particules de bactériophage libre en suspension, ainsi que nous l'avons déjà signalé dans notre mémoire précédent.

Selon les trois variantes de notre technique, nous aurons donc les résultats schématisés dans la figure ci-jointe et qui se recouperont parfaitement (Voir figure 1).

Voici d'autre part dans le tableau ci-dessous quelques chiffres obtenus à titre d'exemple.

Emulsion *B. megatherium* 899 dilué à 10^{-5} dans émulsion *megatherium* sensible 36.

Emulsion normale . .	}	Colonies	70	16	12	48
		Taches	5	20	21	25
Emulsion centrifugée.	}	Colonies	0	0	0	0
		Taches	4	20	21	21

TENEUR EN BACTÉRIOPHAGE LIBRE DES CULTURES
DE « *B. MEGATHERIUM* » LYSOGÈNE EN BOUILLON.

D'après M. et M^{me} Wollman, les cultures en bouillon de *B. megatherium* 899 ne contiennent de bactériophage libre qu'au titre de 10^3 à 10^4 très inférieur à celui qu'on obtient avec les lysats bactériophagiques (10^8 à 10^9).

Ces auteurs ne disent ni la méthode de titrage qu'ils ont employée, ni les conditions de leurs cultures du *B. megatherium* en bouillon, à savoir température d'incubation, aération, durée de la culture. Or, tous ces facteurs ont leur importance. C'est, en effet, une notion classique fondamentale de la bactériophagie que la multiplication du bactériophage est fonction de la multiplication microbienne. Cela est non seulement vrai lorsque la régénération du bactériophage se fait au dépens du microbe sensible ainsi que l'avaient les premiers montré Bordet et Jau-main [7] mais encore lorsqu'elle se fait dans une culture « lysogène » ainsi que cela se voit dans les expériences que j'ai rapportées ici en 1932 [7]. Le titre bactériophagique d'une culture en bouillon de *B. megatherium* lysogène peut donc varier beaucoup selon les conditions de culture du microbe. Sans m'étendre davantage sur une notion aussi évidente, je me contenterai de l'illustrer par une expérience dont l'exposé m'oblige à faire ici une digression préalable.

En secouant énergiquement les cultures en bouillon de *B. megatherium* lysogène pendant leur développement, j'avais espéré obtenir des émulsions dont les individus, au lieu d'être groupés en chaînettes, seraient bien isolés, de façon que la numération des colonies représentât aussi exactement que possible le nombre d'individus lysogènes. Or, je suis arrivé au résultat diamétralement opposé. Loin d'être dissociées par l'agitation, les chaînettes deviennent plus longues encore, jusqu'à former souvent des filaments interminables et pour une raison qui, nous allons le voir, a son intérêt.

Dans les rares Traités qui y font allusion, l'agitation est considérée comme un facteur très défavorable au développement microbien. Pourtant déjà Galli Valerio [9] a soutenu la thèse opposée. En tout cas, pour le *B. megatherium*, et davantage

encore pour un autre bacille isolé par Den Dooren de Jong, le *B. luteus*, j'ai constaté que l'agitation favorise la croissance d'une façon extraordinaire. La cause essentielle, sinon unique, de cette influence réside dans l'oxygénation intense que l'agitation apporte à la culture de ces microbes très aérobies. L'expérience suivante va nous montrer l'influence considérable de l'agitation sur la croissance du *B. megatherium* et corrélativement sur le titre de la culture en bactériophage libre.

EXPÉRIENCE I. — A l'aide des spores de *B. megatherium* 899, chauffées une demi-heure à 75°, de façon à tuer tout bactériophage libre, on ensemence 10 tubes de 20 centimètres de long contenant chacun 7 cent. cube de bouillon ordinaire, puis on les scelle. 5 de ces tubes sont placés verticalement dans une étagère, les 5 autres sont placés dans une machine à secouer. Étagère et agitateur sont portés à 35°. Après quatre heures, huit heures, douze heures, vingt-quatre et quarante-huit heures d'incubation, on retire de l'étuve un des tubes au repos et un des tubes agités. Déjà après quatre heures, une différence très notable se marque entre le tube non agité où le contenu se trouve sous la forme d'une colonne verticale très faiblement aéré et le tube secoué où une mousse abondante est le témoin d'une aération intense. Dans le premier, c'est à peine si l'on peut deviner l'apparition d'un léger développement; dans le second, on constate déjà un trouble très marqué. Et tandis que, déjà après huit heures, dans les tubes agités, la culture a atteint son apogée sous la forme d'un trouble d'une densité extraordinaire, dans les tubes au repos la croissance se poursuit avec lenteur, c'est à peine si, après vingt-quatre heures, elle y atteint un trouble équivalent à celui que présentaient déjà après quatre heures les tubes agités.

Chaque fois qu'on retire ainsi une paire de tubes, on y fait le titrage du bactériophage par la technique décrite plus haut. Le tableau suivant nous renseigne sur la concentration en bactériophage libre de la culture à différents âges selon qu'il s'agit d'un tube bien agité, donc bien aéré, (ox) ou d'un tube au repos, donc peu aéré (anox).

	4 HEURES	8 HEURES	12 HEURES	24 HEURES	48 HEURES
Anox. . .	10 ⁵ à 10 ⁶	10 ⁵ à 10 ⁶	10 ⁵ à 10 ⁶	10 ⁵ à 10 ⁶	10 ⁶ à 10 ⁷
Ox. . . .	10 ⁷ à 10 ⁸	10 ⁸ à 10 ¹⁰	10 ⁹ à 10 ¹⁰	10 ⁸ à 10 ⁹	10 ⁷ à 10 ⁸

On obtient des résultats forts semblables si, au lieu d'aérer fortement la culture par agitation, on l'aère en l'étalant en couche mince dans une boîte de Petri ou dans une boîte de Kolle. On voit dans quelle mesure la teneur en bactériophage libre d'une culture de *B. megatherium* lysogène peut varier

selon le degré d'aération de la culture puisque toute autre chose égale d'ailleurs, une culture de douze heures contiendra de mille à dix mille fois plus de bactériophage libre si elle est fortement aérée, que si elle l'est modérément. C'est le seul enseignement que je veuille retirer pour le moment de cette expérience, bien que son examen plus détaillé ait apporté d'intéressantes indications, points de départ d'autres expériences qui seront publiées ultérieurement.

La teneur en bactériophage libre peut varier également selon qu'il s'agit d'une culture de *B. megatherium* du type R ou d'une culture du type S. Placées dans des conditions absolument identiques, les cultures du type S contiennent dix fois moins de bactériophage libre que celles du type R. Quoi qu'il en soit, le type S, bien que mutilat asporogène, est parfaitement lysogène, ce qui, si je ne me trompe, est en contradiction avec certaines vues de Wollman.

On risque encore de se faire une idée très inexacte de la teneur en bactériophage libre des cultures en bouillon si, au lieu de faire le titrage par la numération des taches en milieu solide, on le fait en recherchant jusqu'à quelle dilution limite la lyse s'effectue encore en milieu liquide.

EXPÉRIENCE II. — Filtrons une culture de *B. megatherium* en bouillon qui a été agité à 35° pendant huit heures. De ce filtrat, nous faisons en tubes de bouillon (pH 7.4) une série de dilutions allant de 10^{-15} à 10^{-10} . Après avoir prélevé de chacune de ces dilutions 0 c. c. 5 pour faire le titrage en milieu solide selon la technique décrite plus haut, nous ensemençons chaque tube avec 1 goutte d'une jeune culture en bouillon de *B. megatherium* 36 sensible et nous portons le tout à 37°. Tandis que dans le titrage en milieu solide nous trouvons encore trois taches pour la dilution 10^{-9} , nous constatons que dans la série des tubes en bouillon tous se troublent de façon uniforme, sauf seulement les deux ou trois premiers qui manifestent une légère inhibition nette seulement dans le premier tube.

Cette expérience nous montre qu'un filtrat dont l'activité s'étend jusqu'à 10^9 lorsqu'il est titré par la méthode des taches, ne paraît être actif que jusqu'à 10^3 lorsqu'il est titré en bouillon. C'est encore une fois tout ce que je rapporterai ici de cette expérience sur laquelle je compte revenir dans un autre mémoire.

CONCLUSION. — *Il résulte donc de tous ces faits que la teneur en bactériophage libre des cultures en bouillon de B. megathe-*

rium est une notion fort contingente. En réalisant des conditions favorables, on obtient non pas le titre très inférieur de 10^3 , 10^4 , mais au contraire un titre atteignant et dépassant même le titre habituel de 10^8 et pouvant aller même jusqu'à 10^{10} .

TENEUR EN BACTÉRIOPHAGE LIBRE DES CULTURES
DE « *B. MEGATHERIUM* » 899 SUR GÉLOSE INCLINÉE.

D'après M. et M^{me} Wollman, les cultures de *B. megatherium* 899 sur gélose inclinée seraient indemnes de bactériophage libre. En ce qui me concerne, je les ai toujours trouvées pourvues de bactériophage libre. Toutefois, le titre observé dépendait encore une fois de diverses conditions. C'est ce que nous montre l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE III. — On ensemence de *B. megatherium* 899 un tube de gélose « ultrasèche » (eau peptonée, gélifiée, inclinée, privée d'eau de condensation puis laissée à 37° pendant plusieurs jours jusqu'à ce que l'extrémité supérieure du milieu ait un aspect corné et soit même souvent crevassé).

On le place à 37°. Après cinq heures, il présente déjà une culture importante. Avec une anse de platine, on fait un prélèvement à la partie supérieure, là où le milieu est particulièrement sec. Ce prélèvement est alors émulsionné dans une petite gouttelette de bouillon sur les parois d'un tube stérile contenant 10 cent. cubes de bouillon. Sitôt l'émulsion bien homogène, on délaie la gouttelette dans les 10 cent. cubes de bouillon, de façon à y former un trouble extrêmement léger, correspondant environ au trouble que ferait une dilution au 1/10 d'une culture de vingt heures de *B. megatherium* en tube de bouillon. Qualifions de *partielle* cette première émulsion.

Sur le restant de la culture, on laisse tomber III ou IV gouttes de bouillon dans lesquelles on délaie toute la masse microbienne en une émulsion très épaisse aussi homogène que possible qu'on étend ensuite de 10 cent. cubes de bouillon. On obtient ainsi avec la totalité de la culture une émulsion très dense qu'on dilue en versant 0 c. c. 1 dans 10 cent. cubes de bouillon où elle forme alors un léger trouble analogue à celui de « l'émulsion partielle ». Appelons *totale* cette seconde émulsion qui a été faite à partir de la totalité de la culture.

Avec les deux émulsions, respectivement « partielle » et « totale », on procède aussitôt à la numération des colonies lysogènes et à celle des taches de bactériophage libre selon les techniques décrites plus haut.

Puis, à titre de vérification, ayant centrifugé les deux émulsions, on fait encore une numération des taches de bactériophage libre avec les liquides surnageants, tandis qu'avec les culots on fait des frottis qu'on colore par la méthode de Gram.

Nous faisons ensuite exactement les mêmes numérations de colonies lysogènes et de taches de bactériophage avec des émulsions « partielle » et « totale » préparées de la même façon, mais à partir d'une culture âgée de dix-huit heures, dont treize heures passées à 37°, et cinq heures à la température du laboratoire.

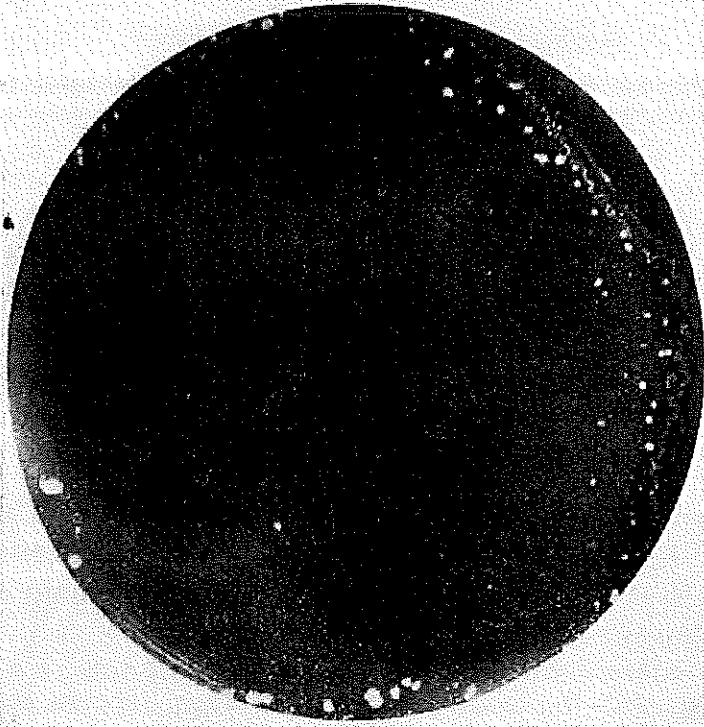
Voici dans le tableau ci-dessous les résultats d'une expérience prise au hasard parmi de nombreuses expériences semblables. Ces chiffres sont ceux obtenus avec la dilution 10^8 .

	CULTURES 5 HEURES à 37°		CULTURES 18 HEURES (13 à 37°, 5 à 20°)	
	Emulsion partielle	Emulsion totale	Emulsion partielle	Emulsion totale
Colonies	60	45	63	59
Taches	1.200	40	250	3

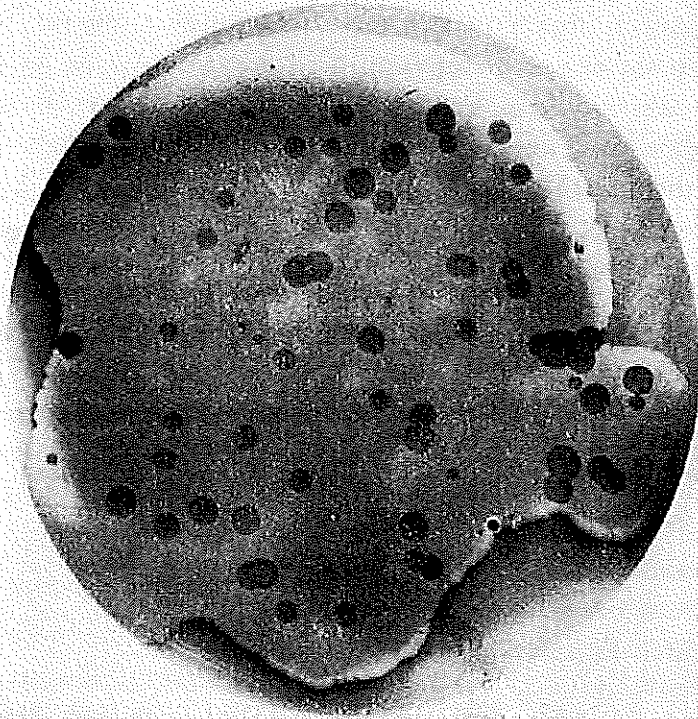
Faites en très grand nombre, des numérations semblables ont donné des résultats du même ordre, d'où l'on peut déduire que les cultures de *B. megatherium* lysogène sur gélose ultra-sèche contiennent du bactériophage libre dont le titrage donnera des chiffres très différents selon l'âge de la culture et selon la manière dont cette culture est émulsionnée. Le titre le plus élevé s'obtient avec l'émulsion partielle d'une culture jeune, de quatre à cinq heures; il peut atteindre alors facilement le titre habituel de 10^8 et l'on trouve alors dix à cent fois plus de taches de bactériophage libre que de colonies lysogènes. Le titre le plus bas s'obtient avec l'émulsion totale d'une culture âgée de dix-huit heures; il tombe en-dessous de 10^8 et l'on trouve alors de dix à cent fois moins de taches de bactériophage libre que de colonies. Entre ces deux extrêmes, on obtiendra des conditions intermédiaires pour lesquelles le nombre de taches de bactériophage libre sera sensiblement le même que celui des colonies lysogènes.

A quoi sont dues ces variations dans la teneur en bactériophage libre selon la façon dont a été faite l'émulsion? Tout simplement à des phénomènes de fixation. En effet, tandis que l'émulsion totale très dense en microbes est favorable à la fixation du bactériophage libre, l'émulsion partielle, très disséminée au contraire, est peu favorable à cette fixation. Il peut paraître étrange à première vue qu'une culture lysogène puisse fixer le bactériophage qu'elle a libéré. Il en est pourtant bien ainsi d'après l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE IV. — On ensemence avec le *B. megatherium* lysogène 899 du type R, 25 cent. cubes de bouillon étalé en couche mince dans une boîte de Kolle. Après huit heures à 37°, la culture très trouble est centrifugée, puis décantée et filtrée. Le titre en bactériophage du filtrat est de 10^8 (1 cent. cube



a) Avant fixation. Lyse totale.



b) Après fixation. 63 taches seulement.

FIG. 2 (expérience IV). — Filtrat de culture lysogène en bouillon. Dilution 10⁻⁴.

de la dilution 10^8 donne 7 taches). Dans 5 cent. cubes de filtrat, on émulsionne de façon « totale » une culture sur gélose de *B. megatherium* 899 R., âgée de dix-huit heures (treize heures à 37° , cinq heures à 20°) et qui elle-même contient du bactériophage libre à la concentration de 10^8 , ainsi que le montre le titrage de son émulsion « partielle ». Après trente minutes de contact, on centrifuge l'émulsion et on soumet au titrage le liquide surnageant. On constate qu'après le traitement par la culture sur gélose, le titre du filtrat est tombé de 10^8 à 10^5 (1 cent. cube de la dilution 10^8 donne 5 taches). Ainsi donc la culture sur gélose sèche contenant du bactériophage libre au titre de 10^8 , mise en émulsion dense dans le filtrat d'une culture en bouillon contenant aussi du bactériophage libre au titre de 10^8 , fixe à la fois le bactériophage de la culture en bouillon et celui de sa propre culture au point de le faire tomber au titre de 10^5 (fig. 2).

Nous avons vu plus haut que le type S est environ dix fois moins lysogène que le type R. L'expérience ci-dessus répétée avec le type S nous montre que celui-ci est également environ dix fois moins fixateur que le type R.

CONCLUSION. — *La teneur en bactériophage libre du B. megatherium 899 sur gélose inclinée est, comme pour les cultures en bouillon, une notion tout à fait contingente. Dans les conditions favorables, il atteint le chiffre habituel de 10^8 .*

Nous apprenons en outre que, dans les émulsions de *B. megatherium*, chaque individu microbien est le support non seulement de bactériophage intracellulaire non encore libéré, mais encore de bactériophage libre secondairement fixé sur lui. C'est là une notion très importante avec laquelle nous aurons à compter dans la discussion.

DE LA LIBÉRATION DU BACTÉRIOPHAGE INTRACELLULAIRE PAR LA DISSOLUTION DU *B. megatherium* LYSOGÈNE.

Nous pouvons maintenant aborder en connaissance de cause l'objet essentiel de ce travail.

Dans leur note de mai 1935, M. et M^{me} Wollman [1] rapportent leur expérience comme suit :

« On prépare par dilutions successives des suspensions contenant des quantités décroissantes de germes. De chacune on ensemence 0 c. c. 1 (II gouttes) en gélose fondue qu'on coule en boîtes de Petri. Les suspensions bactériennes sont ensuite additionnées de lysozyme (blanc d'œuf) et 0 c. c. 1 (II gouttes) de suspension ainsi lysée mélangé à quelques gouttes d'une suspension de bactérie sensible, étalé sur la surface d'autres

boîtes de gélose. Voici les chiffres obtenus, dans une expérience type, respectivement pour le nombre de bactéries et pour celui de bactériophages :

Nombre de colonies : 1° environ 500; 2° 52; 3° 7-8,

Nombre de plages : 1° plus de 400; 2° environ 50; 3° 7-8.

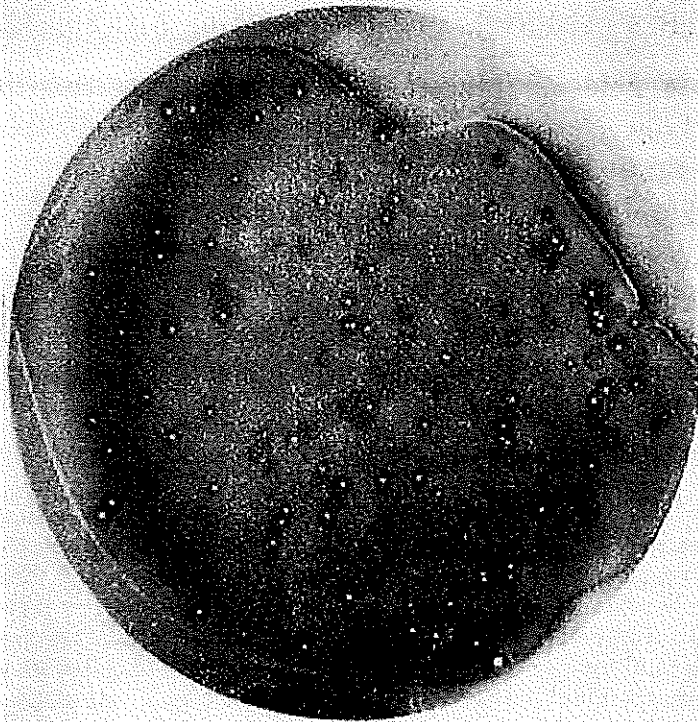
« On peut en conclure que, dans le cas de la souche spontanément lysogène étudiée, le nombre d'éléments actifs (bactériophages-facteurs lysogènes) est égal à celui des corps bactériens mis en expérience. »

J'ai répété cette expérience un grand nombre de fois en procédant de la façon suivante :

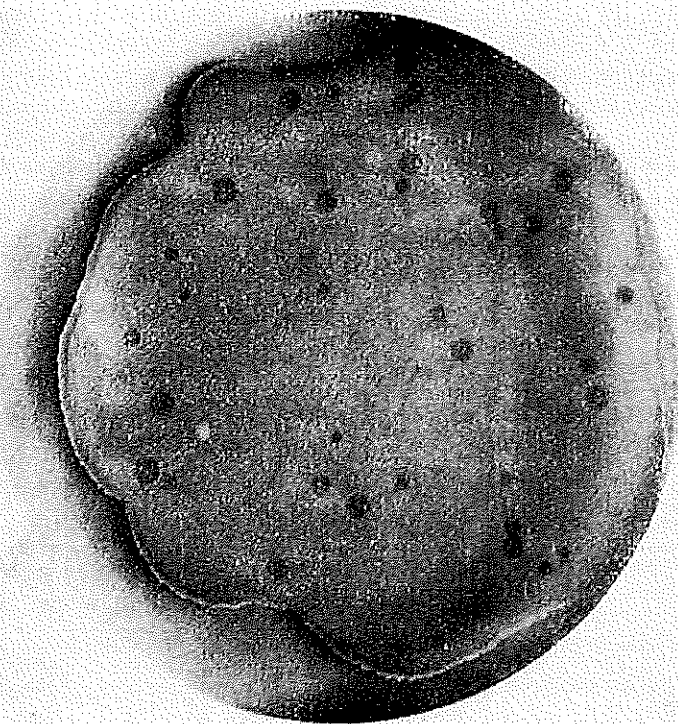
EXPÉRIENCE V. — Avec une culture de *B. megatherium* lysogène 899 sur gélose ultra-sèche, qui est restée treize heures à 37° et cinq heures à 20°, on fait une émulsion bien homogène dans 10 cent. cubes de bouillon (ou d'eau physiologique). On dilue cette émulsion épaisse au 1/100 en versant 0 c. c. 1 dans 10 cent. cubes de bouillon (ou d'eau physiologique). On obtient ainsi un trouble très léger correspondant environ à celui qui ferait la dilution au 1/10 d'une culture de *B. megatherium* en bouillon âgé de vingt quatre heures. Considérons donc cette émulsion légère comme une dilution 10-1. Nous prélevons 1 cent. cube que nous ajoutons à 9 cent. cubes de bouillon, nous avons ainsi une dilution de 10-2 que nous répartissons entre deux tubes à centrifuger à raison de 5 cent. cubes par tube. A l'un d'eux, nous ajoutons alors III gouttes de blanc d'œuf dilué au 1/5 (lysozyme) et, après mélange, nous le plaçons à l'éluve à 37° pendant deux heures. Quant au tube témoin, nous nous en servons pour faire aussitôt la numération des colonies lysogènes et celle des éventuelles taches de bactériophage libre avant et après centrifugation. Après deux heures, nous procédons aux mêmes numérations avec le tube clarifié par le lysozyme. Les culots de centrifugation sont soumis à la coloration par le Gram.

Voici dans le tableau ci-dessous le résultat de quelques expériences semblables. Pour les premières (*a*, *b*, *c*, *d*), j'ai choisi des cas où les conditions de fixation dans l'émulsion ont abaissé le nombre des taches de bactériophage libre sensiblement au-dessous de celui des colonies lysogènes; pour les trois dernières (*e*, *f*, *g*), j'ai choisi des cas où les deux nombres sont sensiblement voisins.

		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
<i>Emulsion normale.</i>	Nombre de colonies. . .	700	71.0	180	500	90	75	45
	Nombre de taches. . .	50	14	4	50	35	40	40
<i>Emulsion lysozymée.</i>	Nombre de taches. . .	45	48	3	39	35	38	40

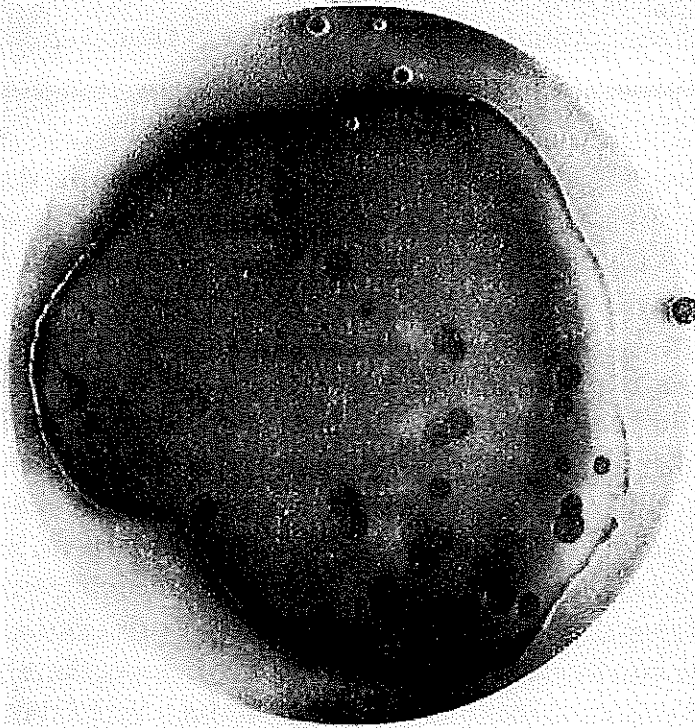


a) Emulsion normale. 90 colonies lysogènes,
36 taches de bactériophage libre.

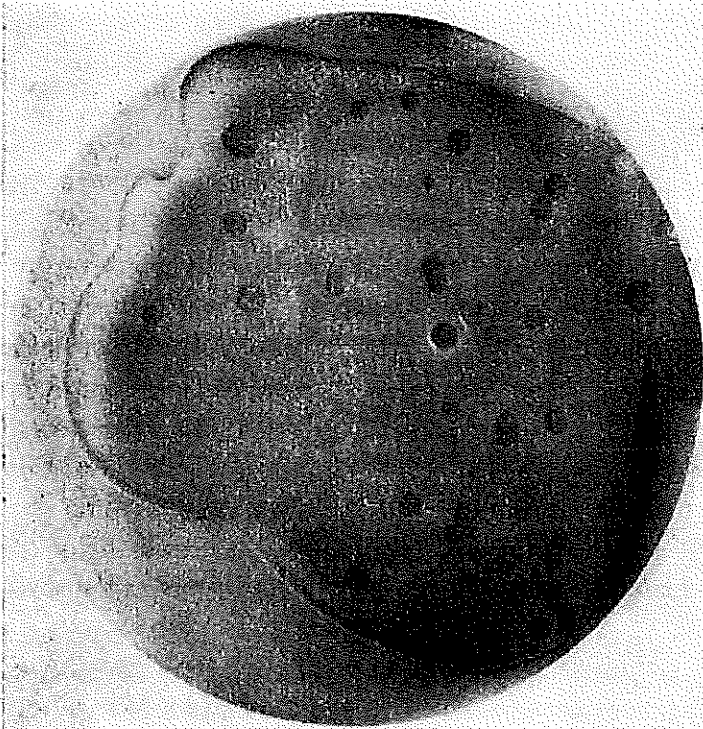


b) Emulsion normale centrifugée. 0 colonie, 39 taches.

FIG. 3 (expérience V).



c) Emulsion lysozymée. 0 colonie, 35 taches.



d) Emulsion lysozymée centrifugée. 0 colonie, 35 taches.

FIG. 3 (expérience V).

Voici à titre d'exemple les photographies montrant les résultats de l'expérience V (e) [fig. 3].

D'après ces quelques exemples, on constate que les émulsions dissoutes par le lysozyme ne contiennent pas d'autre bactériophage libre que celui qui s'y trouvait déjà avant la dissolution.

L'action du lysozyme aboutit exactement au même résultat que la centrifugation; elle élimine les bactéries lysogènes et conserve les particules de bactériophage libre.

J'ai multiplié les expériences en essayant toutes les variantes possibles, en utilisant tantôt le type R, tantôt le type S, des cultures tantôt plus jeunes, tantôt plus âgées, en utilisant des émulsions tantôt en bouillon, tantôt en eau physiologique, tantôt plus concentrées, tantôt plus diluées, en utilisant du blanc d'un œuf pondu tantôt depuis quelques heures, tantôt depuis plusieurs jours, et en le faisant agir tantôt moins, tantôt plus de deux heures, etc. Jamais je n'ai vu le titre du bactériophage libre augmenté par la dissolution des bactéries lysogènes. J'ai alors essayé l'expérience en remplaçant l'action bactériolytique du blanc d'œuf par celle du *Streptothrix* ainsi que je l'avais fait antérieurement pour du *B. coli* lysogène [4]. Le résultat fut toujours négatif.

Que faut-il conclure de tous ces échecs?

C'est, ou bien que pour une raison que j'ignore, tel un détail technique qui ne figurerait pas dans les textes de M. et M^{me} Wollman que ceux-ci ont réussi là où depuis un an j'échoue régulièrement; ou bien c'est qu'il n'y a pas de libération de bactériophage par la dissolution des bactéries lysogènes et que M. et M^{me} Wollman ont en réalité retrouvé, après la dissolution des bactéries, du bactériophage libre dont ils ont méconnu la présence dans l'émulsion microbienne avant la dissolution, parce que, convaincus de son absence dans celle-ci, ils font la numération des colonies lysogènes en gélose ordinaire au lieu de la faire, comme je l'ai fait, en présence de bactéries sensibles.

Plusieurs faits paraissent confirmer cette dernière éventualité : Wollman trouve environ dix fois plus de taches lorsqu'il fait l'expérience avec des cultures de cinq heures à 37° que lorsqu'il la fait avec des cultures de dix-huit heures (treize

heures à 37° et cinq heures à 20°) [5]. Or, ces variations correspondent aux variations de bactériophage libre de la culture normale selon l'âge de la culture, variations que nous avons signalées plus haut.

Il y a surtout aussi cette expérience rapportée par M. et M^{me} Wollman [3] en ces termes : « Nous avons vu que les cultures en bouillon de *B. megatherium* contiennent à l'état libre, 10³, 10⁴ bactériophages par centimètre cube. Fait curieux, le plus souvent ce nombre n'augmente pas de façon considérable sous l'action du lysozyme ; les cultures s'éclaircissent sans qu'il y ait modification très marquée du titre lytique. Mais si, au lieu de traiter directement ces cultures en bouillon par le lysozyme, on les centrifuge et qu'on les remette en suspension dans de l'eau physiologique, les résultats sont les mêmes que ceux qu'on obtient avec les cultures sur gélose : le nombre de plages fourni par une suspension ainsi traitée est très sensiblement égal au nombre de colonies donné par la suspension avant traitement par le lysozyme ».

En d'autres termes, ces auteurs reconnaissent que, dans les cultures en bouillon où ils ont trouvé du bactériophage libre au titre de 10³, 10⁴, la dissolution par le lysozyme n'augmente pas ce titre comme il devrait évidemment le faire de façon notable si cette dissolution libérait du bactériophage. Par contre, ils concluent à une telle libération lorsqu'ils font l'expérience sur le culot de centrifugation remis en suspension dans de l'eau physiologique et additionnée de lysozyme. Ils retrouvent alors le même résultat que celui qu'ils obtiennent avec les cultures sur gélose. Or, il va de soi que ce culot de centrifugation n'était pas indemne de bactériophage libre. Voici d'ailleurs une expérience qui le confirme.

EXPÉRIENCE VI. — On ensemence de *B. megatherium* 899 une boîte de Kolle contenant 20 cent. cubes de bouillon étalé. Après huit heures à 37°, on centrifuge la culture obtenue et on décante à fond le bouillon surnageant lequel donne un titre lytique de 10⁶. Le culot est remis en suspension dans l'eau physiologique, puis 0 c. c. 1 de cette émulsion est ajoutée à 9 cent. cubes d'eau physiologique ce qui donne une dilution de 10⁻². A 5 cent. cubes de celle-ci, on ajoute 111 gouttes de blanc d'œuf dilué au 1/5. Après deux heures à 37°, on fait la numération du nombre de colonies et du nombre de taches de l'émulsion normale témoin et de l'émulsion lysozymée. On trouve à la dilution 10⁻⁵ :

Émulsion normale : 62 colonies et 58 taches ;

Émulsion lysozymée : 55 taches.

Nous retrouvons donc la donnée de M. et M^{me} Wollman, c'est-à-dire que pour 62 colonies dans l'émulsion normale nous trouvons dans l'émulsion lysozymée un nombre assez voisin de taches de bactériophage libre soit 55 taches ; mais, en fait, celui-ci existait déjà comme tel dans l'émulsion normale avant la dissolution (58 taches).

CONCLUSION. — *Malgré de multiples essais dans des conditions diverses, je n'ai jamais pu obtenir la libération du bactériophage intracellulaire par la dissolution du B. megatherium lysogène.*

DISCUSSION.

Dans leur mémoire de février dernier, M. et M^{me} Wollman [3] ont bien voulu me citer en ces termes :

« Un partisan autrefois convaincu de la théorie diastasique, *Gratia*, semble s'être rallié à la théorie parasitaire. »

Je n'ai jamais été partisan convaincu d'aucune théorie. Plus soucieux de faits que de théories, je me suis toujours attaché davantage aux manifestations du bactériophage qu'à sa nature. Pourtant, au cours des recherches que je poursuivais depuis 1920, j'ai rencontré alternativement des faits plus favorables tantôt à la conception diastasique, tantôt à la thèse du virus. Parmi ces derniers qui m'avaient le plus particulièrement impressionné, je rappellerai celui de l'autonomie du bactériophage à l'égard de la bactérie et dont j'avais apporté, en 1922 [10] une démonstration si convaincante que d'Hérelle a pu la reprendre dans son traité *Le bactériophage et son comportement* [11] comme un des arguments les plus solides en faveur de sa thèse. Si je n'ai pas alors opté formellement pour celle-ci, c'est précisément à cause des bactéries lysogènes. En cultivant du *B. coli* lysogène dans de l'eau peptonée glucosée, j'y voyais d'abord apparaître avec le développement microbien un développement parallèle de bactériophage libre ; mais celui-ci ne tardait pas à disparaître ensuite complètement, la fermentation du glucose entraînant une acidité à laquelle le bactériophage succombait irrémédiablement. Or, dans cette culture où tout bactériophage libre avait été ainsi détruit, chaque individu microbien avait conservé intact, tout au moins tant qu'il était

vivant, son aptitude à être lysogène dès qu'il était repiqué en bouillon ordinaire; mais venait-il à mourir sous l'influence, par exemple, d'un chauffage à 56°, température pourtant inoffensive pour le bactériophage, il n'était plus alors le centre d'aucune propriété lytique. Il semblait donc que la bactérie lysogène ne fût pas que le support purement passif d'un virus bactériophage exogène qui la contamine, mais qu'il en fût le générateur actif grâce à quelque fonction sécrétoire endogène que le microbe perdrait avec la vie [7].

Il restait cependant cette possibilité que le virus intracellulaire fût prisonnier dans le cadavre du microbe, et que la dissolution de ce dernier par une action bactériolytique pourrait éventuellement remettre en liberté. C'est ce que depuis longtemps j'avais tenté de faire en dissolvant des cultures lysogènes de *B. coli* par l'action bactériolytique du streptothrix. Mais, comme je l'ai déjà rapporté dans mon précédent mémoire, paru ici en mars dernier [4], mes résultats n'avaient pas été suffisamment démonstratifs pour que je les publie. On comprend par ce qui précède que la tentative plus heureuse, semblait-il, de M. et M^{me} Wollman m'intéressât tout particulièrement.

Wollman est adversaire à la fois de la théorie diastasique et de la théorie parasitaire; mais il emprunte une partie à chacune d'elles pour édifier une théorie personnelle. Il condamne la théorie diastasique, notamment parce que les recherches récentes ont montré que le bactériophage aurait une constitution physico-chimique incompatible avec celle des diastases. C'est une particule qui se reproduit comme le veut la théorie parasitaire, d'une part; mais cette particule, qui se reproduit, n'est pas non plus un virus parasite de la bactérie, car elle serait d'origine microbienne comme le veut la théorie diastasique, d'autre part. Ce serait une particule microbienne représentative d'hérédité: « un facteur lysogène héréditaire », comme dit Wollman avec une juste réserve pour ne pas l'appeler un « gène ». Cette origine microbienne, endogène donc, Wollman en avait trouvé la preuve définitive comme beaucoup d'adversaires de la théorie parasitaire, dans les expériences de Den Dooren de Jong. Cet auteur, comme on sait, a constaté que des spores de *B. megatherium* lysogène, après avoir été chauffées

à 85° et même à 100°, températures sûrement mortelles pour le bactériophage, ont conservé intactes leur propriété lysogène : réensemencées, elles germent et répandent de nouveau dans leur culture du bactériophage en quantité. Prétendre y trouver la démonstration que le bactériophage est un produit du microbe et non pas une contamination de celui-ci par un virus exogène est une façon de voir singulièrement unilatérale. Pourquoi, en effet, la spore refuserait-elle au protoplasme du virus bactériophage la protection qu'elle accorde au protoplasme du microbe ? Heureusement, on doit à Cowles [12] et à Adant [13] d'avoir réconcilié la logique avec les faits. Ces auteurs ont montré que des spores de bacilles non spontanément lysogènes, mais artificiellement contaminées par du bactériophage exogène, conservent également, après chauffage à 100°, leurs propriétés bactériophagiques acquises. Aussi, Wollman ne peut-il plus dire aujourd'hui que les expériences de Dea Dooren de Jong « constituent, en quelque sorte, la condamnation de la théorie parasitaire » [14]. Dans leur mémoire, M. et M^{me} Wollman le reconnaissent d'ailleurs très volontiers.

Mais cette condamnation, qui leur échappe donc, ils la retrouvent à présent dans leur expérience de libération du bactériophage intracellulaire. Au nom de ces expériences, ils condamnent solidairement les théories parasitaire et diastasique en ces termes : « On peut conclure de ces expériences que, dans le cas de la souche spontanément lysogène étudiée, le nombre d'éléments actifs (bactériophages = facteurs lysogènes) est égal à celui des corps bactériens mis en expérience. Il y a là un résultat incompatible avec la théorie diastasique et qui est bien difficile à interpréter dans la théorie parasitaire. Le seul fait de l'existence de souches spontanément lysogènes constitue, du reste pour celle-ci, un écueil qu'elle tourne en invoquant une symbiose possible entre bactéries et bactériophages; cette hypothèse apparaît encore plus difficile à soutenir en présence des données que nous venons de rapporter.

Celles-ci sont, par contre, parfaitement compatibles avec la conception des facteurs lysogènes héréditaires et paraissent apporter en faveur de celle-ci un argument nouveau [1]. »

Ces conclusions, à mes yeux, ne sont nullement justifiées par les faits. Je n'ai pu vérifier aucune des données invoquées

par M. et M^{me} Wollman, ni en ce qui concerne la teneur en bactériophage libre des cultures de *B. megatherium* lysogène en bouillon et en gélose, ni en ce qui concerne la libération du bactériophage intracellulaire.

Sans doute, les partisans de la théorie diastatique voudront voir dans l'absence de libération de bactériophage par la dissolution provoquée des bactéries lysogènes la preuve que celles-ci ne contiennent pas de particules de bactériophage actif, ni virus, ni facteur lysogène, mais uniquement le mécanisme de la sécrétion lytique que le microbe perd donc irrémédiablement avec la vie. Mais une telle conclusion, si logique soit-elle à première vue, ne se justifie pas, car j'ai montré plus haut que les bactéries lysogènes des émulsions soumises à la dissolution provoquée contiennent sûrement du bactériophage actif : à savoir celui qui se trouvait à l'état libre dans la culture et qui s'est secondairement fixé sur les bactéries lors de leur mise en émulsion. Or, ce bactériophage actif, lui non plus, je n'ai pu le libérer par la dissolution des bactéries qui l'avaient fixé. Tout ce que l'on peut dire, c'est que pour une raison encore inconnue le bactériophage intracellulaire, comme le bactériophage secondairement fixé n'a pu, dans mes expériences, être libéré par la dissolution des bactéries.

En résumé, je ne puis que confirmer la conclusion de mon mémoire antérieur, à savoir que la relation numérique invoquée par M. et M^{me} Wollman, contre la théorie parasitaire, est purement contingente.

En appendice au mémoire de M. et M^{me} Wollman et à l'appui de leurs vues, M. Lowoff [15] a apporté des considérations empruntées au problème des virus des plantes. Or, voilà bien longtemps que, comme sans doute beaucoup d'autres auteurs, j'avais le sentiment d'une certaine analogie entre les deux problèmes ; mais, au cours de recherches que depuis trois ans je poursuis en collaboration avec mon collègue Manil sur la sérologie des virus des plantes, j'ai constaté qu'il existe entre les deux problèmes une identité si parfaite jusque dans les moindres détails, que toute conception, pour être exacte, doit être applicable à l'un comme à l'autre problème. Or, il résulte aussi de nos recherches dont je compte réunir ici dans un prochain mémoire les résultats jusqu'ici disséminés dans

plusieurs publications préliminaires [16], que l'agent actif des « mosaïques » est un élément exogène.

Il existe précisément, pour le virus des plantes, une théorie identique à celle de Wollman ; rappelée par Lwoff, elle a été formulée par Duggar et ses collaborateurs Karrer et Armstrong [17]. J'avoue n'avoir jamais pu me représenter cette conception d'un gène égaré quittant une plante pour aller, par l'intermédiaire d'un insecte transmetteur, féconder contre nature le tissu végétatif d'une autre plante qui peut présenter pourtant avec la première une complète incompatibilité génétique, comme la pomme de terre et la tomate, par exemple. Mais il y a plus, au cours d'expériences récemment rapportées [18], nous avons montré que, même dans le cas le plus favorable à la conception endogène, celui de ces curieuses variétés de pommes de terre « carriers » qui, tout en étant infectantes pour d'autres variétés sensibles, ne présentent aucun symptôme et constituent ainsi le pendant des bactéries lysogènes, l'agent causal ne passe pas à la descendance par les graines. Il n'est donc pas héréditaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. et M^{me} WOLLMAN. *C. R. Soc. Biol.*, 119, 1935, p. 47.
- [2] DEN DOOEN DE JONG. *Zentralbl. f. Bakter.*, 120, n° 1, p. 1 et 15, 122, p. 277.
- [3] M. et M^{me} WOLLMAN. *Ces Annales*, 56, 1936, p. 137-164.
- [4] A. GRATIA. *Ces Annales*, 56, 1936, p. 307-315.
- [5] WOLLMAN. *Ces Annales*, 56, 1936, p. 316-324.
- [6] GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 122, 23 mai 1936, p. 812; 122, 18 juillet 1936.
- [7] GRATIA. *Ces Annales*, 48, 1932, p. 413-438.
- [8] BORDET et JAUMAIN. *C. R. Soc. Biol.*, 85, 1921, p. 1097.
- [9] GALLI VALERIO. *Zentralbl. f. Bakter.*, 37, Orig. 1904, p. 151.
- [10] GRATIA et DE NAMUR. *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1922, p. 364.
- [11] D'HÉRELLE. *Le Bactériophage et son comportement*. Masson, 1926, p. 308.
- [12] COWLES. *J. Bacter.*, 22, 1931, p. 421.
- [13] ADANT. *C. R. Soc. Biol.*, 3, 1932, p. 1055.
- [14] WOLLMAN. *Bull. Pasteur*, 32, 1934, p. 947.
- [15] A. LWOFF. *Ces Annales*, 56, 1936, p. 166-169.
- [16] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 114, 1933, p. 923, 925, 1382; 115, p. 189, 1239; *Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 1935, p. 208-218; A. GRATIA et MANIL. *C. R. Soc. Biol.*, 117, 1934, p. 490, 493; 118, p. 379.
- [17] DUGGAR et KARRER. *Ann. Mo. Bot. Garden*, 7, 1921, p. 343; DUGGAR et ARMSTRONG. *Ann. Mo. Bot. Garden*, 10, 1923, p. 191-212.
- [18] A. GRATIA et P. MANIL. *C. R. Soc. Biol.*, 122, mai 1936, p. 814.