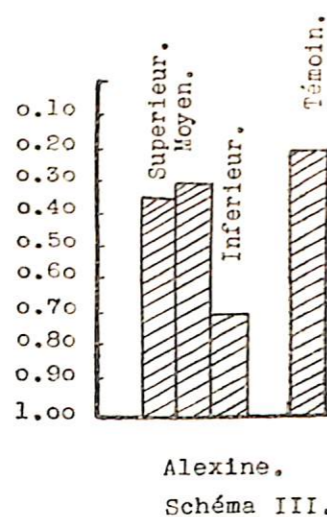


60 min. de centrifugation à 80.000 t/m. De la lecture de ces résultats, on peut déduire qu'il y a une sédimentation très appréciable de l'hémolysine après une centrifugation de 60 minutes à 80.000 t/m.

2° *Titrage des agglutinines.* — Dans une série de tubes à hémolyse, on verse 1 c.c. de sérum agglutinant à des dilutions progressivement croissantes, puis on y ajoute une goutte de globules rouges de mouton lavés et dilués au demi dans de l'eau physiologique. Les résultats consignés dans le schéma n° 2 montrent que, contrairement à l'hémolysine, l'agglutinine antiglo-



bules rouges de mouton ne semble pas s'être sédimentée de façon appréciable après 60 minutes de centrifugation à 80.000 t/m.

3° *Titrage de l'alexine.* — Du sérum de cobaye fraîchement récolté est centrifugé pendant 60 minutes à 80.000 t/m dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Puis on dilue au 1/20° le sérum témoin non centrifugé, ainsi que chacune des trois portions, supérieure, moyenne et inférieure du sérum centrifugé. On verse dans des tubes à hémolyse des quantités progressivement croissantes de ces sérums contenant l'alexine, puis on porte le volume de chaque tube à 1,5 c.c. à l'aide d'eau physiologique. On ajoute 0,5 c.c. de globules rouges de mouton lavés et dilués au 1/20° et 0,5 c.c. d'hémolysine au 1/1.000°.

De la lecture des résultats consignés dans le schéma n° 3, il résulte qu'après 60 minutes de centrifugation à 80.000 t/m, il y a une sédimentation relative de l'alexine puisqu'il y a une diminution de l'activité dans la portion supérieure par rapport au sérum témoin et à la portion moyenne; mais, chose curieuse, au

lieu d'observer une augmentation de l'activité dans la portion inférieure par suite de la concentration plus grande de l'alexine sédimentée, on constate au contraire une diminution considérable qui ne peut s'expliquer que par une inactivation de l'alexine dans le fond du tube. Il s'agit probablement là d'une inactivation par action mécanique.

Il va de soi que l'on a vérifié que la congélation des sérums dans la neige carbonique, telle qu'elle a été pratiquée au cours de notre technique, n'altère pas leurs activités.

Il y aura lieu d'appliquer également la centrifugation à d'autres anticorps, les précipitines et les antitoxines notamment, ainsi qu'aux anticorps normaux et autres agents humoraux. Il importe aussi de voir si le comportement ne varierait pas selon l'espèce de l'animal producteur du sérum ainsi que selon la nature et l'origine de l'anticorps.

(Institut de bactériologie de l'Université de Liège.)

ULTRACENTRIFUGATION ET CRISTALLISATION  
D'UN MÉLANGE DE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC  
ET DE BACTÉRIOPHAGE,

par ANDRÉ GRATIA et PAUL MANIL.

Au cours des recherches que nous avons poursuivies sur la sérologie des virus des plantes, nous nous sommes convaincus que, tout au moins pour le virus de la mosaïque ordinaire du tabac et pour le virus X de la pomme de terre, la virulence était étroitement liée à la présence dans la plante malade d'un antigène spécifique flocculant énergiquement par l'addition de l'antisérum correspondant. Cet antigène spécifique est non héréditaire et se reproduit de façon propre et autonome quelle que soit la plante qui l'héberge. Il se comporte conformément aux principes pastoriens; il faut admettre qu'il s'agit d'un germe (1\*). Lorsque Stanley (2\*) d'abord, puis Bawden et Pirie (3\*) ont pu obtenir

(1\*) A. Gratia, *C. R. de la Soc. de biol.*, 1953, t. 114, pp. 923, 925 et 1382; *ibid.*, 1934, t. 115, p. 1239. *Bull. de l'Acad. roy. méd. Belg.*, 1935, t. 17, p. 208. A. Gratia et P. Manil, *C. R. de la Soc. de biol.*, 1934, t. 117, pp. 490 et 493; *ibid.*, t. 118, p. 379; *ibid.*, 1936, t. 122, p. 814; *ibid.*, t. 123, pp. 325 et 509. *Sec. Intern. Cong. f. Microb., Abstracts of Communications*, Londres, 1936, 34.

(2\*) W.-M. Stanley, *Science*, 1935, t. 81, p. 644. *Phytopathology*, 1935, t. 25, p. 922. *Science*, 1936, t. 83, p. 85. *Phytopathology*, 1936, t. 26, p. 305. *Science*, 1936, t. 83, p. 626.

(3\*) Bawden et Pirie, *Nature*, 1937. *British Journ. of exper. pathol.*, 1937,



cet antigène à l'état de protéine cristallisable, deux éventualités s'offraient à l'esprit : ou bien cette protéine est réellement l'agent de la mosaïque et alors il n'y avait qu'une conclusion logique, c'est que, sous leur forme la plus simple, les germes virulents sont des micelles susceptibles de s'agglomérer en présentant une architecture cristalline, ou bien, seconde éventualité, c'est que la protéine spécifique cristallisable n'est pas l'agent lui-même, mais quelque substance produite au cours de l'infection, comparable à une toxine, à une capsule ou tout autre épiphénomène et entraînant le véritable agent avec lui par adsorption. La plupart des faits connus paraissent favorables à la première éventualité, notamment le fait que soumise à des cristallisations répétées la protéine conserve intégralement sa virulence. Il faut reconnaître cependant que cela n'exclut pas nécessairement la seconde éventualité, le phénomène d'entraînement pouvant se répéter à chaque recristallisation.

Lorsque nous avons obtenu la protéine spécifique par ultracentrifugation fractionnée, nous avons été frappés du caractère singulièrement collant de cette substance et nous nous sommes demandé ce qui arriverait si l'on centrifugeait, puis cristallisait la protéine spécifique de la mosaïque du tabac en présence d'autres virus non flocculables, tels par exemple celui du « tobacco necrosis » ou bien en présence de bactériophages. La protéine spécifique de la mosaïque du tabac n'entraînerait-elle pas aussi ces agents étrangers et ne conserverait-elle pas alors les activités propres de ces virus au cours des recristallisations. Voici le résultat d'une semblable recherche faite avec des bactériophages.

5 c.c. de jus de tabac mosaïqué, chauffé à 56° et dépouillé par une première centrifugation de 5 minutes à 45.000 t/m, sont additionnés de 0,5 c.c. de bactériophage du *B. megatherium* (choisi en raison de sa résistance à l'acidité). On soumet le mélange à une centrifugation de 15 minutes à 80.000 t/m, cette fois, que nous savons suffisante pour sédimenter pratiquement toute la protéine spécifique et une grande partie du bactériophage. Après avoir décanté le liquide surnageant, et prudemment rincé la coupelle avec de l'eau de distribution stérile, on reprend le sédiment fortement collé dans la rainure périphérique de la coupelle, avec 1 c.c. d'eau de distribution stérile. Ce liquide contient la protéine spécifique ayant entraîné avec elle la plus grande partie du bactériophage ; en effet, il possède un titre bactériophagique de  $10^5$  au lieu de  $10^4$  pour le mélange non centrifugé et  $10^3$  pour le liquide surnageant après la centrifugation, chiffres entièrement conformes à tous les résultats obtenus antérieurement par l'un de nous pour la centrifugation des bactériophages. A 0,9 c.c. de ce liquide, on ajoute 0,3 c.c. de la solution saturée

de sulfate d'ammoniaque contenant 5 p. 100 d'acide acétique glacial. Il se fait aussitôt un précipité nacré et soyeux de cristaux de Stanley. Après sédimentation de ce précipité par une centrifugation de 5 minutes à 9.000 t/m à la centrifuge ordinaire on décante le liquide surnageant d'une part, tandis que le culot après avoir été soigneusement remis en suspension dans 1 c.c. de la solution de sulfate d'ammoniaque acétique dilué au quart pour le laver est recentrifugé à 9.000 t/m. Le culot rapidement rincé avec un peu d'eau de distribution stérile est ensuite redissous dans 0,9 c.c. d'eau de distribution. La même opération de cristallisation suivie de redissolution après lavage est répétée 3 fois successivement en l'espace d'une heure environ. Après chaque cristallisation, on prélève 0,05 c.c. de ce liquide surnageant, puis 0,05 c.c. du liquide dans lequel le culot de cristaux vient d'être redissous ; chacun de ces prélèvements est soumis au titrage par étalement sur gélose après mélange à diverses dilutions avec le *B. megatherium* sensible. Le résultat de l'expérience est que, encore présent mais en très faible quantité dans le culot de la première cristallisation, le bactériophage *megatherium* disparaît ensuite complètement à la fois dans les liquides surnageants et dans les culots de cristaux. Choisi pourtant pour sa résistance à l'acidité, le bactériophage *megatherium* ne résiste pas à l'action combinée du sulfate d'ammoniaque et de l'acide acétique et l'expérience reste sans résultat.

Nous l'avons alors recommencée après avoir éprouvé divers bactériophages de notre collection à l'action du sulfate d'ammoniaque acétique dilué au quart. Tandis que les uns, à l'exemple du bactériophage *megatherium*, succombent presque instantanément à l'action de la solution salée acide, les autres résistent de façon intégrale même après un séjour de plusieurs heures. C'est le cas notamment, chose curieuse, pour tous nos coli-phages producteurs de lysine. Nous avons donc choisi l'un d'eux pour refaire l'expérience, cette fois avec succès. Il en résulte qu'à chaque cristallisation, la plus grande partie du bactériophage est entraînée avec le précipité cristallin ; une partie toutefois reste en suspension à l'état libre dans le liquide surnageant ; aussi, après la troisième recristallisation, la protéine de la mosaïque du tabac a conservé un fort pouvoir bactériophagique. Sans doute ce pouvoir est-il diminué mais dans une mesure très inférieure à celle qu'il eût fallu attendre des six dilutions successives opérées au cours des trois lavages et des trois redissolutions des cristaux. En effet, du titre initial de  $10^6$ , il est descendu à  $10^4$ , alors qu'il eut dû tomber à zéro.

Bien que le bactériophage constitue pour la protéine cristallisable de la mosaïque du tabac un élément étranger pour lequel



elle n'a pas vraisemblablement d'affinité élective, il est cependant en grande partie entraîné par elle au cours de sa cristallisation. Il faut donc bien convenir qu'une telle éventualité, à savoir celle d'un entraînement, ne peut être rejetée, à plus forte raison, en ce qui concerne le virus de la mosaïque du tabac lui-même, sans toutefois qu'il soit permis d'affirmer que les cristaux de Stanley ne doivent leur activité virulente qu'à un tel entraînement. La réalité est qu'à l'heure présente la question reste ouverte.

Nous espérons pouvoir donner prochainement le résultat de l'expérience faite avec le mélange de virus de la mosaïque du tabac et le virus du « tobacco necrosis ».

(Institut de bactériologie de l'Université de Liège.)

COMPARAISON ENTRE LA REPRODUCTION EN SÉRIE  
DES BACTÉRIOPHAGES ET VIRUS DES PLANTES  
ET L'ACTIVATION EN SÉRIE DU FIBRIN-FERMENT,

par ANDRÉ GRATIA et PIERRE FREDERICQ.

C'est en 1922, au Congrès du British Medical Association à Glasgow, que le rapprochement entre la reproduction du bactériophage et l'activation en série du fibrin-ferment a été faite pour la première fois par l'un de nous (1). Une comparaison analogue a été faite plus récemment par Stanley (2) au sujet de la mosaïque du tabac qu'il considère comme une protéine autocatalytique dont il rapproche la reproduction, de l'activation en série du trypsinogène en trypsine. Ainsi que l'un de nous le lui a fait personnellement remarquer lors du Congrès de microbiologie à Londres en août 1936, il y a cependant dans ces comparaisons une dissemblance fondamentale que voici.

Supposons une série de plantes de tabac ; inoculons la première avec du virus de la mosaïque du tabac ; dès que les symptômes de la mosaïque se manifestent, prélevons un peu de suc de cette première plante mosaïquée, inoculons-le à la deuxième et ainsi de suite. A la fin de la série de transmissions, ce que l'on obtient est toujours de la mosaïque du tabac. Si au lieu d'inoculer la première plante avec de la mosaïque du tabac, nous l'inoculons avec de la mosaïque de la pomme de terre ou tout autre virus étranger, ce que nous obtiendrons à la fin de la série des trans-

(1) *British med. Journ.*, 1922, 19 août, p. 296.

(2) *Phytopath.*, 1936, t. 26, p. 305.

missions ne sera plus cette fois de la mosaïque du tabac, malgré les passages répétés sur cette plante, ce sera de la mosaïque de la pomme de terre ou tout autre virus hétérologue qu'on aurait inoculé. C'est là le principe de l'autonomie des virus des plantes que l'un de nous a établi avec Manil (3) par la méthode sérologique et qui correspond au principe de l'autonomie des bactériophages que l'un de nous a également établi par la méthode sérologique (4). En d'autres termes, pour la mosaïque comme pour la lyse transmissible, la reproduction en série conserve à l'agent causal, virus ou bactériophage, son caractère propre et spécifique, quel que soit le substrat végétal ou microbien aux dépens duquel il se régénère. L'agent causal transforme les matériaux du substrat pour les assimiler en sa substance propre et spécifique, en d'autres termes il est, comme un germe vivant, doué d'assimilation. Il en va tout autrement pour l'activation en série du fibrin-ferment. Faisons l'expérience suivante.

Répartissons du plasma stable de poule dans une série de tubes à raison de 0,5 c.c. par tube et ajoutons 1 goutte de fibrin-ferment de poule au premier tube. La coagulation s'opère en 2 minutes ; défibrinons aussitôt le caillot et introduisons une goutte du liquide défibriné dans le deuxième tube ; la coagulation s'opère en 2 minutes ; nous défibrinons aussitôt et versons une goutte du deuxième tube dans le troisième tube et ainsi de suite ; la coagulation se répète à l'infini toujours en 2 minutes environ, sans que le fibrin-ferment se soit affaibli par dilution ; il se régénère donc à chaque coagulation. Or, on peut faire la même expérience en ajoutant au premier tube de la série, non plus du fibrin-ferment homologue de poule, mais un fibrin-ferment hétérologue, d'homme par exemple ; mais alors ce que l'on obtiendra à la fin de la série ne sera pas du fibrin-ferment d'homme, mais encore du fibrin-ferment de poule. Inversement, si l'on prenait un plasma stable humain, un plasma d'hémophile par exemple, on pourrait provoquer sa coagulation en série avec du fibrin-ferment de poule et ce que l'on obtiendrait à la fin de la série serait cette fois du fibrin-ferment d'homme et non de poule.

Ainsi donc, à l'inverse de ce qui se passe pour les virus des plantes et pour les bactériophages, ce qui détermine le caractère spécifique du phénomène dans la coagulation en série, ce n'est pas l'élément causal étranger, le germe exogène inoculé, c'est au contraire le substrat endogène ; ce n'est pas le fibrin-ferment introduit dans le premier tube qui se reproduit en conservant son caractère spécifique original ; le fibrin-ferment n'est

(3) *C. R. de la Soc. de biol.*, 1933, t. 114, p. 1382 ; *ibid.*, 1934, t. 115, p. 1239.

(4) *C. R. de la Soc. de biol.*, 1922, t. 87, p. 364.