

és dans le tableau qui donne la relative corrigé pour une surface e correspond à la moyenne des A la concentration de 1/15.000,

I	Expér. II	Expér. III
	8,5	9,6
	8,2	
	8,3	
	12,3	13,0
		9,3
		11,0

sur la croissance.

surface de cultures en 48 heures, ées à la même valeur.

croissance des cultures. A des il n'y a plus d'activation, ou tion. En tenant compte de la nt le test « t » de Student, on vis-à-vis du témoin relatif sont différence supérieure à 99 %). é en présence de pantéthéine elle du lot cultivé sur milieu ette dernière différence n'est

t et en contraste de phase des concentrations les plus favo- déroulent normalement. L'exa- d'anormal à ces concen- fortes où la substance exerce (00), il semble que de légères apparition.

éine à celle de l'acide panto- faits suivants apparaissent : e la plus favorable pour la e de l'acide pantothénique et ntense. Signalons à ce propos artir de pantéthéine s'obtient stades biochimiques intermé- la transformation de l'acide blement plus difficile et plus voie cette transformation se

33, p. 525.

fait dans l'organisme. Si on dépasse considérablement la dose active favorable, la pantéthéine devient toxique, à l'encontre de l'acide pantothénique. Il est possible qu'une faible partie de la pantéthéine soit hydrolysée en acide pantothénique et en cystéamine soit dans le milieu de culture, soit dans les cellules. En effet, les effets toxiques observés sont assez semblables à ceux que l'on obtient avec de la cystéamine.

*En conclusion*, la pantéthéine favorise considérablement la croissance de cultures de tissus, mais devient toxique à des doses élevées, peut-être par libération de cystéamine.

(Institut d'Histologie de l'Université de Liège et Centre national belge de Recherches sur la Croissance).

### Activités protéolytiques et épilante de l'actinomycétine.

Note de JEAN-MARIE GHUYSEN et GASTON LEGER,  
présentée par MAURICE WELSCH.

On sait que l'actinomycétine (1, 2) est un complexe de principes spécifiques bactériolytiques (3, 4, 5) et protéolytiques (4, 6, 7).

Ce complexe produit également, sur les peaux de diverses espèces animales, une desquamation de l'épiderme, accompagnée d'une action épilante remarquable (8).

L'épilage est réalisable non seulement par les actinomycétines, mais aussi par la trypsine, et, comme l'a montré Gustavson (9), par les solutions concentrées d'urée (9). Or, Rudall (10) a démontré que l'urée solubilise un complexe protéinique de la couche germinative de l'épiderme qu'il appelle épidermine.

Notre hypothèse de départ est donc que l'épilage enzymatique résulte, probablement, d'une digestion de l'épidermine ou de l'une de ses fractions.

*Matériel et méthodes.* 1. FRACTIONNEMENT DE L'ACTINOMYCÉTINE. — L'actinomycétine (fraction F), obtenue par les procédés de culture antérieurement décrits (11), est concentrée par distillation *in vacuo*, précipitation au sulfate ammonique à saturation, et dialyse. La solution ainsi obtenue (fraction C) est ensuite passée au travers d'une colonne de sable, ce qui la divise en deux portions. L'une, non adsorbée (fraction N), traverse directement le sable. L'autre, retenue

- (1) M. Welsch, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, t. 126, p. 244.
- (2) M. Welsch, *Rev. belge Pathol. Méd. expérim.*, 1947, t. 18, suppl. 2.
- (3) J. M. Ghuyesen, *C. R. Soc. Biol.*, 1952, t. 146, p. 1268.
- (4) M. Welsch et J. M. Ghuyesen, *C. R. Soc. Biol.*, 1953, t. 147, p. 1659.
- (5) J. M. Ghuyesen, *C. R. Soc. Biol.*, 1954, t. 148, p. 729.
- (6) L. Bergamini, J. M. Ghuyesen et M. Welsch, *C. R. Soc. Biol.*, 1954, t. 148, p. 733.
- (7) L. Bergamini, *Rev. belge Path. Méd. expérim.*, 1955, sous presse.
- (8) J. M. Ghuyesen, *Ind. chim. belge*, 1955, sous presse.
- (9) K. H. Gustavson, *J. Soc. Leather Trades' Chem.*, 1949, t. 33, p. 162.
- (10) K. M. Rudall, Symposium on Fibrous Proteins ; Society of Dyers and Colourists, May 1946.
- (11) J. M. Ghuyesen, *C. R. Soc. Biol.*, 1952, t. 146, p. 1812 ; 1953, t. 147, p. 1502 ; 1954, t. 148, p. 1283.

sur celui-ci (fraction A), est récupérée par élution au moyen d'une solution de NaCl à 5 p. cent tamponnée à pH 9,5 ; elle est ensuite dialysée.

2. PRÉPARATION DE L'ÉPIDERMINE. — De l'épiderme de nez de vache (40 g) est finement découpé, lavé à l'eau distillée, et, enfin, extrait, pendant 24 heures, au moyen de 80 ml d'une solution d'urée 6 M, soit à 25° (épidermine I), soit à 0° (épidermine III). Des extractions identiques, effectuées avec la même solution d'urée, mais renfermant du KCl (M), nous ont fourni les épidermines II et IV. La présence de sel multiplie environ par 10 le rendement de l'extraction.

Les extraits sont centrifugés et les liquides surnageants soumis à une dialyse contre eau distillée, à 4°, jusqu'à élimination totale de l'urée. L'épidermine précipite au cours de cette opération ; on la recueille par centrifugation et on la conserve à l'état congelé à -20°.

Substrat	A				B		
	Concentration standard en $\gamma$ /ml pour les fractions				Activité relative (en pour cent de celle de la fraction N) des fractions		
	F	C	N	A	F	C	A
<i>E. coli</i> chauffée . . . . .	270	12,4	62	77	23	500	81
Kératine . . . . .	1840	60	135	289	7,3	225	47
Épidermine III . . . . .	350	9,6	26	68	7,4	271	38
Épidermine IV . . . . .	258	12	24	29	9,3	200	83
«Épiderme» (*) (épilage)	1800 9200	50 500	100 500	130 525	4	128	80
Épidermine I . . . . .	460	20	20	52	4,3	100	40
Épidermine II . . . . .	239	12,4	12,4	24	5,0	100	52
Mucine (viscosité) . . . . .	391	9,5	9,5	123	2,4	100	7,7
Caséine . . . . .	431	5,6	4,5	79	1,0	80	5,7

(\*) Etant donné la moindre précision des mesures effectuées avec ce substrat, nous donnons d'une part les concentrations standard minimale et maximale observées au cours de 9 séries d'essais, d'autre part l'activité relative moyenne (moyenne des valeurs calculées pour chaque paire d'observations correspondantes).

3. DOSAGE DES ACTIVITÉS COLILYTIQUE, CASÉINOLYTIQUE, KÉRATINOLYTIQUE ET ÉPIDERMINOLYTIQUE. — Un même principe est appliqué dans tous les cas (1, 12). Au moyen d'une technique néphélométrique, nous mesurons les variations du trouble des suspensions (*E. coli*, kératine, épidermine), ou du trouble provoqué dans une solution (caséine) par un agent précipitant (acide trichloracétique), en fonction de la durée d'incubation en présence de la préparation enzymatique étudiée, dans des conditions rigoureusement définies (température, pH, salinité). Choisisant les conditions expérimentales et les limites de temps et de concentrations qui assurent une cinétique d'ordre un, nous pouvons mesurer et comparer l'activité de préparations diverses en recherchant, pour chacune d'elles, la concentration minimale qui assure, en un temps fixé, l'obtention d'une valeur judicieusement

(12) M. Welsch, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, t. 128, pp. 795, 799, 1172.

choisie pour le logarithme ( $\log T_0/T_t$ ). Nous désignons chaque préparation et pour la fraction standard.

Le dosage de l'activité muco-lytique que celui de l'activité épiderminolytique.

Résultats expérimentaux. — Pour chacun des types d'activité examinées, sont consignés les résultats que le procédé de concentration par dialyse, aboutit à une purification satisfaisante.

2. Dans la partie B du tableau, sont indiquées les activités relatives correspondantes à la fraction standard de la préparation considérée.

3. On peut voir que l'activité relative de l'épidermine I et II, d'autre part. Ceci indique que la solution d'urée ne modifie, par contre, des substrats à 0° et à 25°.

4. On constate que les activités relatives de l'épidermine III et IV, de grandeur que pour la I et II, l'égard des épidermines I et II, observées pour l'activité épiderminolytique, dont l'attachement semble représenté par la fraction standard.

5. Si nous examinons les résultats obtenus pour les fractions de substrats en solution, en définit cinq : 1) « *E. coli* », 2) « kératine », 3) « épiderme », 4) « épidermine », 5) « caséine ». Il semble de ces constatations que moins cinq enzymes distinctes sont présentes.

Conclusions. — 1) Une enzyme nommée épidermine agit sur la caséine, le mét d'affirmer la présence de cette enzyme respectivement : *E. coli* chauffée, kératine, épidermine, constituant de l'épidermine, épidermine épiderminolytique avec l'épidermine.

2) Le substrat de cette enzyme est constitué des couches superficielles de la fraction de l'épidermine de KCl à la température de 0°.

3) Une autre fraction de l'épidermine, à 0°, paraît être constituée par la fraction de l'épidermine de KCl à la température de 25°.

ée par élution au moyen d'une  
née à pH 9,5 ; elle est ensuite

De l'épiderme de nez de vache  
eau distillée, et, enfin, extrait,  
d'une solution d'urée 6 M, soit  
mine III). Des extractions iden-  
on d'urée, mais renfermant du  
es II et IV. La présence de sel  
de l'extraction.

liquides surnageants soumis à  
jusqu'à élimination totale de  
rs de cette opération ; on la  
serve à l'état congelé à -20°.

Standard fractions	B		
	Activité relative (en pour cent de celle de la fraction N) des fractions		
A	F	C	A
77	23	500	81
289	7,3	225	47
68	7,4	271	38
29	9,3	200	83
130	4	128	80
525			
52	4,3	100	40
24	5,0	100	52
123	2,4	100	7,7
79	1,0	80	5,7

es mesures effectuées avec ce  
centrations standard minimale  
d'essais, d'autre part l'activité  
calculées pour chaque paire

CASÉINOLYTIQUE, KÉRATINOLY-  
e principe est appliqué dans  
nique néphélométrique, nous  
suspensions (*E. coli*, kératine,  
s une solution (caséine) par  
ue), en fonction de la durée  
ration enzymatique étudiée,  
nies (température, pH, sali-  
ntales et les limites de temps  
cinétique d'ordre un, nous  
de préparations diverses en  
concentration minimale qui  
une valeur judicieusement

pp. 795, 799, 1172.

choisie pour le logarithme du rapport trouble initial/trouble final  
(log T<sub>0</sub>/T<sub>t</sub>). Nous désignerons cette valeur, caractéristique pour  
chaque préparation et pour chaque substrat, sous le nom de concen-  
tration standard.

Le dosage de l'activité mucinolytique est décrit ailleurs (8) de même  
que celui de l'activité épilante (9).

*Résultats expérimentaux.* — 1. Les concentrations standard, pour  
chacun des types d'activité étudiés et chacune des quatre préparations  
examinées, sont consignés dans la partie A du tableau. On peut voir  
que le procédé de concentration par distillation, précipitation et  
dialyse, aboutit à une purification notable de tous les agents actifs.

2. Dans la partie B du tableau, nous donnons les chiffres représen-  
tant les activités relatives des préparations F, C et A, en fonction des  
activités correspondantes de la préparation N (100 × concentration  
standard de la préparation N/concentration standard correspondante  
de la préparation considérée).

3. On peut voir que l'activité relative des préparations F et C est  
du même ordre de grandeur pour les épidermes III et IV d'une part,  
I et II, d'autre part. Ceci permet de conclure que d'addition de KCl  
à la solution d'urée ne modifie pas la nature du matériel extrait, mais  
que, par contre, des substances distinctes sont extraites respective-  
ment à 0° et à 25°.

4. On constate que les activités relatives des fractions F et C à  
l'égard des épidermes III et IV, extraites à 0°, sont du même ordre  
de grandeur que pour la kératine. De même, ces activités relatives, à  
l'égard des épidermes I et II, extraites à 25°, sont analogues à celles  
observées pour l'activité épilante. On peut en conclure que le substrat  
épidermique, dont l'attaque enzymatique aboutit à l'épilage, est vrai-  
semblablement représenté par cette fraction de l'épidermine.

5. Si nous examinons les valeurs des activités relatives, respecti-  
vement pour les fractions A, C et F, nous voyons qu'elles permettent  
de diviser les substrats en plusieurs groupes ; la fraction F, en parti-  
culier, en définit cinq : 1) *E. coli*, 2) kératine, épidermines III et IV,  
3) « épiderme », épidermines I et II, 4) mucine et 5) caséine. L'en-  
semble de ces constatations nous permet de conclure qu'il existe au  
moins cinq enzymes distincts responsables des activités étudiées.

*Conclusions.* — 1) Une étude comparative de préparations d'acti-  
nomycétine à divers stades de leur concentration et purification per-  
met d'affirmer la présence de cinq enzymes distincts, attaquant res-  
pectivement : *E. coli* chauffée, la kératine, la mucine, la caséine, un  
constituant de l'épiderme dont la destruction aboutit à la desqua-  
mation épidermique avec épilage.

2) Le substrat de cette dernière activité est un complexe protéinique  
constitutif des couches profondes de l'épiderme, identifiable à la  
fraction de l'épidermine extractible par l'urée (avec ou sans addition  
de KCl) à la température de 25°.

3) Une autre fraction de l'« épidermine », extractible dans les mêmes  
conditions, à 0°, paraît être sensible à l'enzyme kératinolytique.