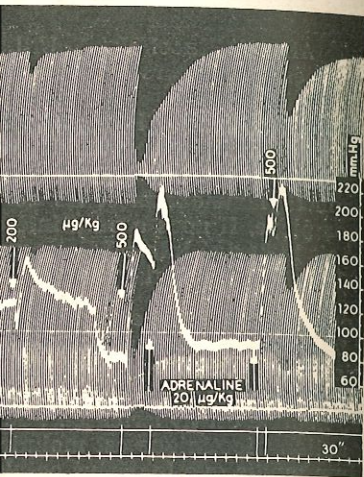


00 µg/kg fait apparaître une diminution des contractions. Cette action déprimante se traduit par des sections (fig. 1).
L'adrénaline diminue nettement son action, mais cette amine pendant le blocage dû à la curarine sans effet notable (fig. 1).



En bas : myogrammes du tibia antérieur de rat, signal et temps (30 sec.). De haut en bas : heptyl-triméthylammonium (200 et 500 µg/kg) et adrénaline (20 µg/kg).

prolonge l'action dépressive du dérivé tubocurarine au niveau du tibia, du moins in vivo. La prostigmine agit de même avec le heptyl-triméthylammonium exception faite du cas de l'adrénaline.

est un antagoniste faible du tubocurarine, mais l'adrénaline, et surtout de rat sont moins sensibles à l'action de l'adrénaline quaternaire.

Les contractions dues à l'excitation directe sont accompagnées d'une contracture.

est nettement inférieure à celle de ses homologues. Dans un essai sur préparation nerf phrénique (nerf phrénique), nous avons relevé, par exemple, que pour 25 cm³ de Tyrode, les pourcen-

tages d'inhibition suivants : 60 p. 100 pour l'amyle, 43 p. 100 pour l'hexyle, 28 p. 100 pour l'heptyle et 14 p. 100 pour l'octyl-triméthylammonium.

Enfin, le dérivé heptyle provoque la contraction du *rectus abdominis* de grenouille (3, 4). Son activité est également moindre que celle des dérivés butyle, amyle et hexyle, mais une dose suffisante permet d'obtenir la contraction maximale. Dans le cas de l'octyl-triméthylammonium, des doses moyennes provoquent seulement une faible contraction tandis que des doses plus fortes paralysent le muscle.

Conclusion. — Des essais qui viennent d'être décrits, il semble bien que l'heptyl-triméthylammonium doit être rangé dans les dérivés à caractère dépolarisant ; il est moins actif que ses homologues inférieurs. L'octyl-triméthylammonium serait donc le premier terme de la série à montrer une action complexe : acétylcholinomimétique ou dépolarisante d'une part ; curarimimétique ou compétitive d'autre part.

(Institut de Thérapeutique expérimentale (Pharmacodynamie) de l'Université de Liège. — Directeur : M. Dallemaigne).

Activité streptolytique de l'actinomycétine,

par MAURICE WELSCH et JEAN-MARIE GHUYSEN.

L'actinomycétine (1*), principe bactériolytique sécrété par divers *Streptomyces* spp., et particulièrement par *S. albus* G (2*), clarifie les suspensions de bactéries tuées par chauffage et les suspensions de nombreux germes gram-positifs vivants. Il est probable qu'un même principe, l'actinozyme (3*), intervient dans la lyse de ces divers microbes.

Toutefois, les activités colilytique (*i.e.* : dissolution d'*Escherichia coli* chauffée) et staphylolytique (*i.e.* : dissolution de *Micrococcus pyogenes aureus* vivant) apparaissent, puis évoluent, indépendamment l'une de l'autre dans les cultures du *Streptomyces* (4*). D'autre part, les conditions optimales pour la production (5*) et l'activité de chacune d'elles sont différentes. La première est bien mise en évidence dans une solution de phosphates M/30 à pH 8,0 (ci-après : solution A), tandis que la seconde exige un milieu plus complexe (ci-après : solution B), contenant K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄ et MnCl₂. On peut ainsi conclure à l'existence, dans l'actinomycétine, d'au moins deux agents distincts, les principes colilytique et staphylolytique, interve-

(1*) M. Welsch, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1937, t. 126, p. 244.

(2*) M. Welsch, *Rev. belge Pathol. Méd. expérim.*, 1947, t. 13, suppl. 2.

(3*) M. Welsch, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, t. 29, p. 362 ; *J. Bact.*, 1947, t. 63, p. 101.

(4*) J. M. Ghuyssen, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1952, t. 146, p. 1268.

(5*) J. M. Ghuyssen, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1953, t. 147, p. 1502.

nant, isolément ou ensemble, pour assurer la dissolution des divers substrats microbiens. Ces deux principes se comportent d'ailleurs de façons différentes lors des essais d'adsorption et de désorption (6*).

La lyse des bactéries par les Actinomycètes (7*) ou l'actinomycétine (8*) libère, sans les altérer, divers antigènes. Maxted (9*) utilise cette propriété pour effectuer le typage sérologique des streptocoques. D'après McCarty (10*), un des éléments responsables de la streptolyse par les filtrats de culture d'Actinomycètes serait une polysaccharidase, qui agirait électivement sur la membrane cellulaire des streptocoques. Nous nous sommes demandé si l'activité streptolytique de nos actinomycétines devait être attribuée au principe colilytique, au principe staphylolytique, à leur action conjointe ou à un troisième élément encore.

Souches et techniques. — Outre les souches d'*E. coli* et *M. pyogenes aureus* utilisées pour nos recherches antérieures, nous avons employé un *Streptococcus pyogenes*, du groupe A, germe très hémolytique, fraîchement isolé du rhino-pharynx d'un enfant atteint de scarlatine.

La bactériolyse de ces trois germes, chauffés ou vivants (sauf *E. coli* qui, dans cet état, est toujours réfractaire à la lyse) a été suivie par nos techniques néphélométriques usuelles, en utilisant les solutions A et B définies plus haut. Les suspensions microbiennes étaient ajustées de manière à présenter un trouble initial toujours identique.

La cinétique de la clarification est généralement d'ordre un, au moins au début de la réaction. L'activité des préparations étudiées sera évaluée, dans cette note, par le temps de « demi-lyse » ; c'est le temps nécessaire pour amener le trouble des suspensions bactériennes à 50 p. 100 de sa valeur de départ, calculé, par extrapolation, en supposant que la vitesse initiale de lyse reste constante.

Nous avons utilisé une préparation d'actinomycétine, concentrée par distillation *in vacuo*, puis purifiée par adsorption et désorption spécifique sur corps microbiens. Cette préparation, titrant 30 mg de matières sèches par ml, était fortement caséinolytique. Aussi, avons-nous tenté de séparer l'une de l'autre les activités caséinolytique et bactériolytique par la méthode de McCarty. Dans ce but, 5 ml d'actinomycétine ont été dialysés, à 2°, pendant 24 heures, contre une solution N/10.000 d'HCl. Dans ces conditions, il se forme un abondant précipité, légèrement coloré en jaune. La fraction liquide restée dans le boyau dialyseur (L.S.) a été recueillie, d'une part, et le précipité a été redissous dans 5 ml de solution B, d'autre part (P.).

Observations expérimentales. — 1. Contrairement à ce qu'avait obtenu McCarty avec sa préparation, nous retrouvons toute l'activité caséinolytique dans P, où elle reste associée à la majeure fraction des activités bactériolytiques.

(6*) J. M. Ghuysen, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1952, t. 146, p. 1812 ; *Arch. intern. Physiol.*, 1953, t. 61, p. 259 ; J. M. Ghuysen et M. Welsch, 6^e Congr. intern. Microbiol., Rome, 1953, Res. commun., p. 261.

(7*) A. Gratia et S. Dath, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1925, t. 92, p. 1125 ; 1926, t. 94, p. 1267.

(8*) A. Castermans, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1950, t. 144, pp. 428 et 1250 ; 1951, t. 145, p. 156 ; 1953, t. 147, p. 720.

(9*) W. R. Maxted, *Lancet*, 1948, t. 255, p. 255.

(10*) M. McCarty, *J. exp. Med.*, 1952, t. 96, pp. 555 et 559.

2. Le liquide surnageant (L.S.) à la dilution de 1/30 (v/v), il assure la demi-lyse (100°, 3 minutes), en solution A, la demi-lyse est portée à 360 minutes dans solution B. L'inhibition très nette en solution B montre que le principe colilytique est le plus actif ici. D'ailleurs, le temps de demi-lyse dans les mêmes conditions, est de plus de 600 minutes en solution A, principe staphylolytique. Son activité (65°, 30 minutes) ou vivant, est à la lyse, dans les deux cas, et en solution B, 600 minutes. Ces observations perçoivent, mort ou vif, est peu sensible.

3. Le précipité redissous (P) à la dilution de 1/100 (v/v), il assure la demi-lyse en solution A, en 6 minutes ; mais en solution B, l'on emploie la solution B. Il est

4. La lyse du staphylocoque ou streptocoque, dans les mêmes conditions cinétique d'ordre un, après un temps de 15 minutes pour le premier germe, de 15 minutes pour la lyse, pour ces deux substrats, sont en solution A, mais de 40 et 145 minutes constatées en solution B indiquent le principe colilytique.

On remarquera que le streptocoque est très analogue au staphylocoque, bien plus nettement entravée que le streptocoque passe du milieu A au milieu B. Cette sensibilité du streptocoque caractérise cette interprétation est démentie par le liquide surnageant (voir paragraphe 2).

5. Le précipité redissous est à la lyse, il assure la demi-lyse du staphylocoque (v/v), en solution B, en 70 minutes suivie pendant 120 minutes au milieu A, le temps de demi-lyse passe à 90 minutes d'ordre un n'est obéie que pendant 120 minutes.

En solution B, la dissolution du streptocoque est exactement comme celle du staphylocoque, son temps de demi-lyse n'est qu'un peu plus long d'ordre un se maintient pendant 120 minutes.

La dissolution du streptocoque est moins exclusivement, par le principe colilytique, se déroule de la même manière que le staphylocoque.

Conclusions. — Ces observations confirment l'actinomycétine renferme, en J

pour assurer la dissolution des divers principes se comportent d'ailleurs de façon différente : l'adsorption et de désorption (6*), l'actinomycètes (7*) ou l'actinomycètes divers antigènes. Maxted (9*) utilise le principe sérologique des streptocoques responsables de la streptolyse. Le principe responsable serait une polysaccharide de la membrane cellulaire des streptocoques. L'activité streptolytique de nos principes est due au principe colilytique, au principe staphylolytique ou à un troisième élément.

Les souches d'*E. coli* et *M. pyogenes* étudiées antérieurement, nous avons employé la souche A, germe très hémolytique, issu d'un enfant atteint de scarlatine. Les germes, chauffés ou vivants (sauf *E. coli* réfractaire à la lyse) ont été suivies dans les suspensions usuelles, en utilisant les solutions de suspension microbiennes. Le trouble initial toujours identique. L'activité est généralement d'ordre un, au moins pour les préparations étudiées. Le temps de « demi-lyse » ; c'est le temps de trouble des suspensions bactériennes, calculé, par extrapolation, en supposant que la lyse reste constante.

La préparation d'actinomycétine, concentrée et purifiée par adsorption et désorption. Cette préparation, titrant 30 mg de principe par ml, est caséinolytique. Aussi, avons-nous étudié les activités caséinolytique et streptolytique. Dans ce but, 5 ml d'actinomycétine, pendant 24 heures, contre une solution de caséine, il se forme un abaissement de pH. La fraction liquide restée après centrifugation a été recueillie, d'une part, et le précipité, d'autre part (P).

1. Contrairement à ce qu'avait observé Maxted, nous retrouvons toute l'activité streptolytique associée à la majeure fraction

de Biol., 1952, t. 146, p. 1812 ; *Arch. Microbiol.*, M. Gluysen et M. Welsch, 6^e Congr. Internat. Microbiol., p. 261.

la Soc. de Biol., 1925, t. 92, p. 1125 ;

de Biol., 1950, t. 144, pp. 428 et 1250 ;

1951, t. 145, p. 255.

1952, t. 96, pp. 555 et 559.

2. Le liquide surnageant (L.S.) titre 400 unités colilytiques/ml. A la dilution de 1/30 (v/v), il assure la demi-lyse d'*E. coli* chauffée (100°, 3 minutes), en solution A, en 15 minutes ; mais le temps de demi-lyse est porté à 360 minutes si l'on utilise la solution B. Pour *M. pyogenes aureus* chauffé, dans les mêmes conditions, le temps de demi-lyse est de 85 minutes en solution A, mais de 260 minutes en solution B. L'inhibition très nette de la lyse du staphylocoque chauffé en solution B montre que le principe colilytique est surtout en cause ici. D'ailleurs, le temps de demi-lyse pour le staphylocoque vivant, dans les mêmes conditions, est de 450 minutes en solution B, mais de plus de 600 minutes en solution A. L.S. est donc plutôt pauvre en principe staphylolytique. Son activité sur le streptocoque, chauffé (65°, 30 minutes) ou vivant, est à peu près nulle, le temps de demi-lyse, dans les deux cas, et en solution A comme en solution B, dépasse 600 minutes. Ces observations permettent de conclure que le streptocoque, mort ou vif, est peu sensible au principe colilytique.

3. Le précipité redissous (P) titre 3830 unités colilytiques/ml. A la dilution de 1/100 (v/v), il assure la demi-lyse d'*E. coli* chauffée, en solution A, en 6 minutes ; mais ce temps passe à 70 minutes lorsque l'on emploie la solution B. Il est donc riche en principe colilytique.

4. La lyse du staphylocoque ou du streptocoque chauffés qu'il provoque, dans les mêmes conditions, obéit de façon parfaite à une cinétique d'ordre un, après un temps de latence de 5 minutes pour le premier germe, de 15 minutes pour le second. Les temps de demi-lyse, pour ces deux substrats, sont respectivement de 14 et 18 minutes en solution A, mais de 40 et 145 minutes en solution B. L'inhibition constatée en solution B indique une intervention vraisemblable du principe colilytique.

On remarquera que le streptocoque chauffé se comporte de façon très analogue au staphylocoque chauffé. Toutefois, sa dissolution est bien plus nettement entravée que celle du staphylocoque lorsque l'on passe du milieu A au milieu B. Ceci pourrait indiquer une plus grande sensibilité du streptocoque chauffé au principe colilytique ; mais cette interprétation est démentie par les observations faites avec le liquide surnageant (voir paragraphe 2).

5. Le précipité redissous est riche en principe staphylolytique ; il assure la demi-lyse du staphylocoque vivant, à la dilution de 1/100 (v/v), en solution B, en 70 minutes, la cinétique d'ordre un étant suivie pendant 120 minutes au moins. Au contraire, en solution A, le temps de demi-lyse passe à 90 minutes, et, de plus, la cinétique d'ordre un n'est obéie que pendant les 60 premières minutes.

En solution B, la dissolution du streptocoque vivant se déroule très exactement comme celle du staphylocoque. Par contre, en solution A, son temps de demi-lyse n'est que 60 minutes, et, surtout, la cinétique d'ordre un se maintient pendant au moins 120 minutes.

La dissolution du streptocoque vivant n'est donc pas assurée, au moins exclusivement, par le principe staphylolytique, puisque sa lyse se déroule de la même manière que ce soit en milieu A ou en milieu B.

Conclusions. — Ces observations nous conduisent à admettre que l'actinomycétine renferme, en plus des principes colilytique et sta-

phylolytique, un agent qui, vraisemblablement en association avec eux, intervient pour assurer la dissolution du streptocoque. Cet agent est peut-être identique à la polysaccharidase de McCarty, ce que de futures expériences tenteront d'établir.

(Laboratoires de Microbiologie générale et médicale de l'Université de Liège et du C.R.P.A. ; Directeur : M. Welsch).

Recherches sur la streptomycino-résistance dans des conditions qui excluent la sélection de mutants.

Note de BENIGNA BLONDEL,
présentée par MAURICE WELSCH.

Il est bien établi que les populations staphylococciques normales sont très hétérogènes en ce qui concerne les degrés de résistance à la streptomycine de leurs individus constitutifs (1). En particulier, elles renferment certainement une faible proportion ($1/10^8$) d'individus mutés, dits « totalement résistants », dont la sélection par l'antibiotique aboutit aisément à la constitution de souches hautement résistantes (2).

Par contraste avec ce processus de sélection de mutants pré-existants (préadaptation), on peut envisager la possibilité d'une véritable adaptation individuelle, d'une induction de résistance par l'antibiotique lui-même. L'intervention de pareil mécanisme n'a toutefois pas été démontrée de façon satisfaisante ; c'est-à-dire, dans des conditions qui éliminent toute possibilité de sélection et réduisent à une valeur négligeable la probabilité de rencontrer un mutant.

Nos présentes recherches constituent une tentative pour tâcher de mettre en évidence une éventuelle streptomycino-résistance par une authentique adaptation physiologique de l'individu bactérien. Disons immédiatement qu'elle nous a donné des résultats exclusivement négatifs.

Technique générale. — Nous avons utilisé des cultures de *Micrococcus pyogenes aureus* (souche 126) réalisées dans de telles conditions que la concentration bactérienne n'y dépassait jamais 10^5 /ml ; la présence d'un mutant, dans une population de cette taille, est très peu probable. D'autre part, nous avons employé des concentrations de streptomycine suffisamment faibles pour que le développement des germes en leur présence reste exactement comparable à celui des témoins ; l'intervention d'un effet sélecteur de l'antibiotique est ainsi réduit au minimum.

(1) M. Welsch, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1949, t. 143, p. 1401.

(2) M. Welsch, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1949, t. 143, p. 1141 ; 1950, t. 144, p. 981 ; *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.*, 1950, t. 15, p. 454 ; *Bull. W.H.O.*, 1952, t. 6, p. 173

Observations expérimentales. — 1. mycine de 0,16 γ /ml dans la gélose ment normal de 100 p. 100 de germe concentration de streptomycine comprise le bouillon cœur-cerveau, inoculé avec permet des cultures (agitées) dont la celle des témoins sans antibiotique, p en tout cas.

2. Des portions de 10 ml de bouillon streptomycine, les autres renfermant antibiotique, sont inoculées de façon de germes par ml. Elles sont ensuite Après 3 heures d'incubation, une fraction ces cultures est prélevée et diluée dans dant, de manière à ramener la concentration centaines de germes par ml. Ces portions incubation sur agitateur pendant trois processus est ensuite répété à nouveau, qui se sont multipliées pendant 3, 6, 9 l'absence d'antibiotique, soit en présence mycine, mais sans que la taille des portions de grandeur de 10^5 individus/ml.

La distribution des sensibilités à la streptomycine de ces populations est alors déterminée par numération des colonies qui peuvent être même inoculés, en gélose simple d'absence streptomycinée d'autre part. De nos jours, jamais la proportion de germes capables l'antibiotique n'a été significativement différente de celle provenant des bouillons streptomycinés du bouillon simple. Les résultats numériques sont donnés dans le tableau.

3. Après numération des colonies, on trouve un grand nombre d'entre elles ont des sensibilités à la gélose normale que sur les géloses streptomycinées venant du bouillon normal comme témoins streptomycinés. Elles ont été suspectées de leur contribution des sensibilités à la streptomycine. La distribution des sensibilités a été analysée par des cultures de témoins ou streptomycinée. Aucune différence n'a été constatée.

4. Une culture en bouillon cœur-cerveau renferme de 30 à 50 bactéries dans un bouillon gélose nutritive qui est ensuite mise en culture à 6 heures. A partir de cette culture, des répliques de Lederberg (3), quatre répliques de gélose ordinaire et deux autres (S1 et S2) à 0,16 γ /ml.

Les répliques T1 et S1 sont placées sur gélose ordinaire.

(3) J. Lederberg et E. M. Lederberg, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1949, t. 143, p. 1141 ; 1950, t. 144, p. 981 ; *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.*, 1950, t. 15, p. 454 ; *Bull. W.H.O.*, 1952, t. 6, p. 173