
UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le présent mémoire peut être livré à l'impression

Liège, le 12 février 1957.

*Le Secrétaire de la Faculté
de Médecine,
Secrétaire du Jury,
(s) P. MOUREAU*

*Le Doyen de la Faculté
de Médecine,
Président du Jury,
(s) W. ESSER*

*Article 6 de l'Arrêté royal du 10 mars 1931 appliquant la Loi du
21 mai 1929 sur la Collation des Grades académiques et le Programme des
Examens universitaires :*

« En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées
par le fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme
étant celles du Jury ou de l'Université. »

UNIVERSITÉ DE LIÈGE — FACULTÉ DE MÉDECINE
Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur



**ACTIVITÉS BACTÉRIOLYTIQUES
DE L'ACTINOMYCÉTINE
DE *Streptomyces albus* G**

PAR

J. M. GHUYSEN

Laboratoires de Microbiologie générale et médicale.
Directeur : Professeur M. WELSCH

LIÈGE
IMPRIMERIE H. VAILLANT-CARMANNE, S. A.,
4, PLACE SAINT-MICHEL, 4
1957

Ce travail paraîtra dans
 les *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*,
 1957, vol. LXV, fasc. 2.

Sommaire

	Pages
POSITION DE LA QUESTION	174(II)
CHAPITRE I. — HISTORIQUE	175
A. — L'elysozyme	175
B. — L'enzyme streptolytique	177
C. — L'actinomycétine	177
a) L'hypothèse de WELSCH	178
b) L'hypothèse de JONES, SWALLOW, MUGGLETON, WEBB et STACEY	180
D. — Conclusion et Plan de travail	180
CHAPITRE II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES	182
CHAPITRE III. — ACTINOZYME ET STAPHYLOLYSE	199
A. — Influence de divers facteurs sur la staphylolyse et la colilyse	200
a) force ionique	200
b) pH	204
c) ions Mn^{++}	204
B. — Cinétique de la staphylolyse et de la colilyse	206
a) colilyse	206
b) staphylolyse	207
C. — Influence de divers facteurs sur la production des activités staphylolytiques et colilytiques	210
a) Concentration en peptone	210
b) Cations bivalents	211
c) Aération	217
d) Conclusions pratiques	219
D. — Quelques équations de cinétique ou épreuve d'homogénéité enzymatique	220
a) Notions théoriques	220
b) Application pratique	225
c) Conclusions	238
E. — Adsorption des principes colilytiques et staphylolytiques sur substrat microbien	238
a) Etude du phénomène	238
b) Application pratique	243
c) Facteurs favorables à la staphylolyse	246

	Pages
F. — Complexité du système staphylolytique.....	247
a) Défécation à l'hydroxyde de chrome	247
b) Extraction fractionnée	249
G. — Conclusions générales	252
CHAPITRE IV. — FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES AGENTS STAPHY- LOLYTIQUES F ₁ ET F ₂	254
A. — Séparation de F ₁ et F ₂	254
a) Démonstration de la dualité du système staphylolytique par adsorption sur IRC50	255
b) Un calcul de rendement ;	257
c) Obtention de F ₁ et F ₂ séparés, à l'état sec	257
d) Lyse de <i>S. aureus</i> S par F ₁ et F ₂ bruts, isolément ou réunis	259
B. — Purification de F ₁	260
a) Procédé	260
b) Degré de pureté de F ₁ purifié	262
C. — Activité staphylolytique de F ₁ purifié et F ₂ brut	266
a) Cellules staphylococciques vivantes	266
b) Cellules staphylococciques chauffées	266
c) Parois staphylococciques	268
d) Confirmation de l'activité lytique de F ₂ sur les parois staphy- lococciques	269
D. — Purification de l'agent staphylolytique complémentaire F ₂ ...	272
a) Essais d'orientation	272
b) Purification	273
E. — Conclusions	276
CHAPITRE V. — BACTÉRIOLYSE DES GERMES GRAM POSITIFS PAR LES AGENTS STAPHYLOLYTIQUES F ₁ ET F ₂	277
A. — Streptolyse	277
a) Préparation X	278
b) Préparation A	279
c) Fractions F ₁ purifiée et F ₂ brute	280
d) Conclusions	280
B. — Pneumolyse.....	280
a) Comparaison des activités pneumolytiques des fractions C, N et A	280
b) Extraction fractionnée de N.....	285
c) Comparaison des activités de F ₁ purifié et de F ₂ brut sur <i>S. pneumoniae</i> vivant	287
d) Conclusions	288
C. — Distribution des activités staphylolytique, streptolytique et pneumolytique dans les filtrats de culture des streptomycètes	288
D. — Action des agents F ₁ et F ₂ sur les parois cellulaires	290
a) Spectre bactériolytique	290
b) Homogénéité enzymatique de F ₂ brut	293
c) Nature de l'activité enzymatique	293
E. — Conclusions	297
CHAPITRE VI. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES	298
BIBLIOGRAPHIE	302

POSITION DE LA QUESTION

Pendant longtemps, il fut admis sans discussion que les bactéries vivantes résistent aux enzymes.

On sait que, par contre, les bactéries tuées sont sensibles à divers enzymes et notamment aux protéinases : pepsine, trypsine, chymotrypsine. Toutes les bactéries, même tuées, ne présentent cependant pas le même degré de sensibilité aux enzymes. KANTOROWIECZ (1909) observait qu'après chauffage à 80° C., les organismes gram-négatifs sont rendus bien plus sensibles à la digestion tryptique que les bactéries gram-positives.

Ces différences de comportement des espèces bactériennes sont actuellement attribuées aux propriétés de la paroi cellulaire dont la structure rigide assure à la cellule ses caractères morphologiques, mais dont la composition chimique particulière soustrait éventuellement le protoplasme qu'elle renferme aux diverses actions enzymatiques. Ainsi, la plus grande résistance à l'action de la trypsine, témoignée par les bactéries gram-positives chauffées, n'est pas une propriété du protoplasme coagulé de ces organismes. Elle est, au contraire, la traduction d'une plus grande stabilité thermique de leurs parois cellulaires, ainsi que SALTON et HORNE (1951a) l'ont démontré par microscopie électronique.

L'isolement des parois cellulaires dans un état hautement purifié est actuellement réalisable par désintégration mécanique des cellules microbiennes (SALTON et HORNE, 1951b; SALTON, 1952b). La composition chimique des parois qui représentent environ 20 % du poids sec total de la bactérie, révèle deux différences remarquables selon la nature du gram (SALTON, 1952c, 1953a). Les parois des organismes gram-positifs ne contiennent, en effet, qu'un nombre très limité d'acides aminés d'où sont exclus les acides aminés aromatiques et soufrés. Une telle composition n'autorise certainement pas l'application du terme « protéine » à ces parois cellulaires (SALTON, 1956). Au contraire, les parois des germes gram-négatifs ont une composition en acides aminés comparable à celle que l'on trouve communément dans les protéines. Enfin, le contenu en lipides des parois de germes gram-négatifs est significativement plus élevé que celui des parois d'organismes gram-positifs.

Ces considérations montrent que la digestion des germes vivants, phénomène auquel nous réservons le terme de bactériolyse, nécessite, en premier lieu, l'intervention d'un ou de plusieurs enzymes actifs sur les parois cellulaires.

Trois systèmes bactériolytiques, actifs uniquement sur les bactéries gram-positives, sont actuellement connus : le lysozyme découvert en 1922 par FLEMING, l'actinomycétine connue depuis les travaux de GRATIA et DATH en 1925, et l'enzyme streptolytique isolé par McCARTY en 1952.

A ces trois systèmes bien définis, il conviendrait peut-être d'associer certains enzymes autolytiques. Mais l'action directe de ceux-ci sur les parois cellulaires n'a pas été établie et ils apparaissent plutôt comme responsables, au même titre que des enzymes protéolytiques, d'une lyse consécutive à la mort de la cellule par l'intervention d'agents physiques ou chimiques.

Signalons enfin que certains enzymes, quoique non bactériolytiques, peuvent détruire certains constituants bactériens, sans toutefois affecter l'intégrité structurelle et la viabilité du germe. C'est le cas de la digestion de la capsule polysaccharidique des pneumocoques type III par un enzyme adaptatif bactérien (DUBOS et AVERY, 1931) ou de la destruction enzymatique de l'antigène M des streptocoques hémolytiques par la trypsine (LANCIEFIELD, 1943).

Nos propres recherches ont eu pour objet d'élucider le mécanisme enzymatique par lequel se réalise la bactériolyse par l'actinomycétine. Commencées à une période (1951) où plusieurs hypothèses distinctes étaient suggérées, elles ont abouti à une interprétation valable du phénomène, directement basée sur des données expérimentales, grâce à l'isolement des enzymes responsables et à la détermination du genre de substrat qui, dans les bactéries sensibles, est spécifiquement attaqué par eux.

Au début, l'intérêt de nos recherches résidait dans l'espoir d'élucider le mécanisme d'un exemple important d'antagonisme microbien, phénomène dont la signification essentielle est de maintenir l'équilibre biologique de la microflore. Il s'est accru ensuite par l'obtention d'enzymes nouveaux qui, à côté du lysozyme et de l'enzyme streptolytique, seront des outils de recherche précieux pour étudier l'Anatomie microbienne.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

A. — Le lysozyme

Cet enzyme bactériolytique a été particulièrement bien étudié, tant du point de vue de sa composition chimique que de son activité enzymatique, par suite de la facilité avec laquelle il peut être obtenu.

Le lysozyme est répandu dans divers tissus et sécrétions animales. Le blanc d'œuf en constitue la source principale. Il peut être obtenu à l'état cristallisé par divers procédés dont le plus simple est celui proposé par FEVOLD et ALDERTON (1949) (voir aussi ALDERTON et FEVOLD, 1946). C'est une protéine basique, de point isoélectrique de 10.5 à 11, et de poids moléculaire relativement faible. La valeur de celui-ci a été déterminée par divers procédés et est comprise entre 15 000 et 17 500. Sa composition en acides aminés et peptides a été étudiée soit après digestion par la carboxypeptidase (THOMPSON, 1952), soit après hydrolyse chimique (ACHER, JUSTISZ *et alii*, 1952; SCHROEDER, 1952; ACHER, THAUREAUX *et alii*, 1952). Il est homogène à l'électrophorèse (SMITH et STOCKER, 1949; WETTER et DEUTSCH, 1951), de même qu'à la diffusion et à la sédimentation (ALDERTON, WORD et FEVOLD, 1945).

Toutefois, lorsque l'on utilise des procédés d'analyse plus fins ou plus spécifiques, le lysozyme cristallisé manifeste une certaine hétérogénéité. C'est ce que démontre l'analyse par le procédé du « steady state » (ANDERSON et ALBERTY, 1948) et l'application de méthodes immunologiques (WETTER et DEUTSCH, 1951). De même, TALLEN et STEIN (1953) ont pu en séparer trois composants actifs, par chromatographie sur échangeurs cationiques.

L'activité bactériolytique du lysozyme s'est originellement manifestée par la digestion des cellules vivantes de *Micrococcus lysodeikticus*. Après l'observation initiale de FLEMING (1922), MEYER *et alii* (1936) furent les premiers à établir la nature polysaccharidique du substrat sensible au lysozyme, tandis que

EPSTEIN et CHAIN (1940) suggéraient que ce polysaccharide existait dans la cellule sous une forme insoluble et était responsable de son intégrité morphologique. Par après, SALTON (1952a) démontrait l'action directe du lysozyme sur les parois cellulaires isolées de *M. lysodeikticus* et observait une dissolution complète de celles-ci sans qu'aucune structure résiduelle puisse être mise en évidence au microscope électronique. Cette conclusion fut bientôt étendue aux parois cellulaires d'autres germes gram-positifs : *Sarcina lutea* et *Bacillus megaterium* (SALTON, 1953b). Les produits de la dégradation enzymatique de ces parois ont été examinés (SALTON, communication personnelle). Fortement réducteurs, ils ne renferment pas de glucose libre, donnent les réactions des sucres N-acétylaminés (AMINOFF, MORGAN et WATKINS, 1952) et contiennent un petit fragment dialysable, identifié comme un complexe acétylé de glucosamine et d'un sucre aminé inconnu. Sur la base du poids sec, 50 à 70 % des produits de la réaction sont indialysables et constitués de trois ou quatre composants, séparables par électrophorèse. Leur poids moléculaire varie de 10 000 à 20 000.

L'action du lysozyme se situe exclusivement au niveau de la paroi cellulaire. La clarification complète de suspensions de cellules bactériennes vivantes, incubées en présence de lysozyme fait certainement intervenir d'autres agents, les uns de nature osmotique, les autres de nature enzymatique, parmi lesquels certains ferments de la bactérie sensible elle-même. En particulier, si l'incubation est réalisée en présence de stabilisateurs, sucrose ou polyéthylène glycol (WEIBULL, 1953), la clarification des suspensions microbiennes est faible et le trouble résiduel est constitué par le système protoplasmique cellulaire. Chaque bactérie a donné naissance à 2, 3 ou 4 protoplastes sphériques qui ont retenu leurs principales propriétés physiologiques originales (WEIBULL, 1956). C'est ainsi, par exemple, que SALTON et McQUILLEN (1955) ont démontré que les protoplastes de *Bacillus megaterium* KM peuvent assurer la multiplication du bactériophage C, pour autant que l'infection virale précède l'action du lysozyme. De même, les protoplastes d'un *Bacillus megaterium* lysogène assurent le développement du bactériophage si les cellules ont été traitées par l'agent inducteur avant action de l'enzyme.

B. — L'enzyme streptolytique

En étudiant le problème pratique de l'identification des streptocoques, MAXTED (1948), montrait que des extraits de culture de *Streptomyces albus* digéraient certains streptocoques β -hémolytiques, en libérant intact le polysaccharide C responsable de la spécificité de groupe. Il proposait d'utiliser cette propriété particulière des streptomycètes pour la préparation de cet antigène.

McCARTY (1952) utilisa ce procédé dans le but d'obtenir les composants cellulaires des streptocoques du groupe A dans leur état natif. Le complexe enzymatique sécrété par le *Streptomyces* fut soumis à divers fractionnements et purifications et il fut établi que l'activité streptolytique est initialement attribuable à un enzyme spécifique, capable de digérer les parois streptococciques. L'action directe de cet enzyme sur les parois isolées a été vérifiée, et l'analyse des produits de la digestion a démontré sa nature polysaccharidasique. Le substrat spécifiquement attaqué est toutefois différent du substrat sensible au lysozyme. La polysaccharidase de McCARTY est, en effet, inactive sur *Micrococcus lysodeikticus*. Ce comportement laisse prévoir des différences dans la constitution chimique des parois cellulaires respectives des microorganismes sensibles au lysozyme, d'une part, des streptocoques du groupe A, d'autre part. Selon McCARTY et SALTON (1953a, 1954), les unes et les autres sont des mucocomplexes, mais les premières renferment du glucose et de la glucosamine, tandis que les dernières contiennent du rhamnose et de la glucosamine. Après action de l'enzyme streptolytique, les produits de la digestion sont hétérogènes et une partie de la glucosamine se retrouve sous forme complexe, dans une molécule de faible taille, dialysable.

Lysozyme et enzyme streptolytique sont donc deux enzymes distincts quoique s'attaquant l'un et l'autre à des substrats de même nature générale mucoïde.

C. — L'actinomycétine

L'action bactériolytique des streptomycètes était connue bien avant les recherches de McCARTY et de MAXTED. En effet, GRATIA, DATH et ALEXANDER (GRATIA et DATH, 1924a, 1924b,

1925a, 1925b, 1926 ; DATH, 1927 ; GRATIA et ALEXANDER, 1931), après la découverte de l'autophagie staphylococcique (GRATIA et RHODES, 1924, 1926 ; GRATIA, 1926), redécouvraient les activités bactériolytiques des streptomycètes antérieurement observées par LIESKE (1921). Ce n'est toutefois qu'à partir de 1935 que l'aspect enzymatique du phénomène fut suspecté et étudié par WELSCH (1947b). Celui-ci proposa le nom d'actinomycétine (1937), par analogie avec pénicilline, utilisé par FLEMING (1929), pour désigner les filtrats de culture bactériolytiques des streptomycètes.

Le spectre bactériolytique de l'actinomycétine a été déterminé et, parmi les 283 souches examinées, représentant 24 espèces distinctes, mentionnons, comme organismes sensibles, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, les streptocoques, les pneumocoques, les staphylocoques, les corynebactéries et diverses espèces du genre *Bacillus* (WELSCH, 1947b). L'activité de l'actinomycétine sur les staphylocoques, germes résistant au lysozyme, et sur *M. lysodeikticus*, bactérie résistant à l'enzyme streptolytique, est un indice de l'originalité de ce système bactériolytique. Les trois systèmes aujourd'hui connus sont cependant tous inactifs sur les bactéries gram-négatives vivantes.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de la bactériolyse des germes gram-positifs par l'actinomycétine.

a) L'hypothèse de WELSCH (1947b)

Les activités protéolytiques des streptomycètes sont connues depuis longtemps (WAKSMAN, 1918). L'actinomycétine renferme des protéases digérant des substrats tels que la caséine, la gélatine, la peptone, le sérum coagulé, et des enzymes dissolvant les bactéries gram-positives et gram-négatives, préalablement chauffées. Ces activités enzymatiques doivent être attribuées à plusieurs ferments distincts. MUGGLETON et WEBB (1952) ont montré, par fractionnement sur mousse, qu'elles étaient partiellement dues à la présence d'une protéase du type trypsine.

TAI et VAN HEININGEN (1951) ont montré que l'activité caséinolytique n'est pas nécessairement responsable de la digestion des cellules chauffées d'*Escherichia coli*. En effet, le rapport de ces deux activités est profondément modifié après équilibrage, à 0° C., de l'actinomycétine sur les corps microbiens

eux-mêmes. Cette même opinion avait été émise antérieurement par WELSCH. Il observait, en effet, que « des actinomycétines concentrées, mais encore très impures, ont la même activité bactériolytique (sur les cellules microbiennes chauffées) par mg. d'azote protéique que des solutions de trypsine cristallisée, sans posséder cependant leur activité protéolytique (WELSCH, 1947b, p. 115). Il individualisa plus tard ce principe de l'actinomycétine sous le nom d'actinozyme (1947a), démontra sa nature protéinique et enzymatique et précisa les conditions expérimentales dans lesquelles son action lytique sur *Escherichia coli* chauffée se manifeste selon une réaction d'ordre 1. Le choix de ce microorganisme comme substrat type de l'actinozyme a fait que cet enzyme est parfois désigné aussi sous le nom de principe colilytique.

L'actinozyme, quoique isolément inactif sur les bactéries gram-positives vivantes, participerait, selon WELSCH, aux propriétés bactériolytiques de l'actinomycétine.

Cette hypothèse repose sur les observations suivantes. L'actinozyme et le principe bactériolytique apparaissent en même temps, lors de la sporulation du streptomycète. Ils présentent les mêmes photo- et thermo-sensibilités. Ils sont également retenus par les filtres bactériologiques et inhibés par les mêmes substances. Les actinomycétines fortement bactériolytiques contiennent toujours un titre colilytique élevé, bien que, parfois, certaines d'entre elles, quoique fortement actives sur les cellules chauffées d'*Escherichia coli*, soient dépourvues d'activité sur les germes gram-positifs vivants. Ce fait peut être parfois attribué à la présence accidentelle d'agents inhibiteurs, par ailleurs éliminables lors d'un traitement au sulfate ammonique, grâce auquel il est généralement possible de récupérer un précipité possédant des propriétés staphylolytiques.

L'intervention d'un principe supplémentaire, associé à l'actinozyme, permettait d'interpréter les observations précédentes et était de plus en bon accord avec certaines particularités de cinétique présentées par les réactions bactériolytiques. En effet, la lyse des staphylocoques vivants par l'actinomycétine ne se déroule suivant une cinétique d'ordre 1 qu'après une phase initiale de préparation durant laquelle la vitesse de réaction, d'abord très petite, va ensuite en augmentant progressivement.

Pendant un certain temps, l'effet de cet agent supplémentaire hypothétique fut attribué à l'action microbicide d'un antibiotique (WELSCH, 1947b et SMOLIAR, 1949) qui aurait rendu les germes gram-positifs, ainsi tués, directement sensibles à l'actinozyme, et, dans certains cas au moins, au système autolytique du microorganisme lui-même (SALMON, 1949, 1950, 1951, 1952). L'actinomycétine contient, en effet, des lipoïdes microbicides. Mais WELSCH (1947b) abandonna cette hypothèse quand il eut obtenu des actinomycétines bactériolytiques, quoique parfaitement délipoïdées.

L'intervention d'un principe supplémentaire restait postulée, mais les tentatives effectuées pour le mettre directement en évidence restèrent sans succès.

b) *L'hypothèse de JONES, SWALLOW, MUGGLETON, WEBB et STACEY (JONES et alii, 1948, 1949; MUGGLETON et WEBB, 1952)*

La bactériolyse par l'actinomycétine serait due à une nucléase spécifique qui transformerait les bactéries gram-positives, préalablement tuées par un agent bactéricide, en bactéries gram-négatives dont la digestion serait ensuite réalisée par des protéinases.

Cette interprétation ne reçut cependant pas de confirmation expérimentale suffisante démontrant la succession des diverses étapes proposées. De plus, WELSCH (1948) et BORN (1952) ont montré, indépendamment l'un de l'autre, que la bactériolyse des staphylocoques vivants ne s'accompagne pas nécessairement d'une négativation préalable du gram. En outre, selon WELSCH (communication personnelle), les staphylocoques, rendus gram-négatifs par l'action de la bile, ne sont pas plus sensibles à l'action lytique de l'actinomycétine que les germes normaux. Enfin, il obtint des actinomycétines fortement bactériolytiques, quoique dépourvues de toute activité nucléasique.

D. — Conclusions et Plan du travail

Les conclusions que l'on peut tirer de l'exposé historique qui précède suggèrent immédiatement le plan que nous avons suivi dans nos recherches personnelles.

1° Quel est effectivement le rôle joué par l'actinozyme, ou principe colilytique, dans la bactériolyse par l'actinomycétine ?

Pour résoudre cette question, il fallait tout d'abord se limiter à un microorganisme type, gram-positif. Nous avons choisi le staphylocoque. WELSCH, dans ses travaux antérieurs, avait en effet déjà largement utilisé ce substrat microbien. De plus, MITCHELL et MOYLE (1951) venaient de démontrer la nature chimique particulière des parois staphylococciques. Il s'agit, en effet, d'un complexe glycérophosphoprotéinique dont la teneur en substances réductrices, exprimée en glucose, représente seulement 0,5 % du poids sec de la paroi cellulaire. Au contraire, les parois cellulaires de *M. lysodeikticus* (SALTON, 1952b, 1953a, 1956) et de *Streptococcus pyogenes* (Mc CARTY, 1952), germes, par ailleurs, également sensibles respectivement au lysozyme et à l'enzyme streptolytique de McCARTY, contiennent 45 à 60 % (poids sec) de substances réductrices exprimées en glucose. Ce sont de véritables mucocomplexes. Une composition chimique semblable a, de plus, été retrouvée dans les parois cellulaires de *S. lutea*, de *B. subtilis* et *B. megaterium* (SALTON, 1956), ainsi que de *Corynebacterium diphtheriae* (HOLDSWORTH, 1952).

On voit que, mis à part les pneumocoques dont les parois cellulaires n'ont pas encore été analysées, les staphylocoques constituent, parmi les divers germes sensibles à l'actinomycétine, le substrat microbien le plus particulier. Il autorisait l'espoir d'isoler un enzyme nouveau et spécifique.

Nous avons donc restreint volontairement la portée du premier problème que nous désirions résoudre et nous nous sommes d'abord limité à l'étude du rôle joué éventuellement par l'actinozyme dans la staphylolyse par l'actinomycétine.

Colilyse par l'actinozyme et staphylolyse par le principe staphylolytique nous sont ainsi apparus comme étant des processus enzymatiques indépendants.

2° Quelle est la nature de l'agent staphylolytique ?

Le système staphylolytique s'est révélé être un complexe constitué de deux agents distincts. Nous avons, dès lors, concentré nos efforts sur la production, la séparation et la purification de ceux-ci. Nous avons examiné enfin à quel niveau de la cellule staphylococcique ils exercent leur effet lytique.

3° Quelle part prennent ces deux enzymes dans la bactériolyse par l'actinomycétine des germes gram-positifs en général ?

cf. fin

Ce dernier problème a été étudié en examinant tout d'abord avec quelques détails les activités streptolytique et pneumolytique de l'actinomycétine, puis en dressant un spectre bactériolytique limité des deux agents staphylolytiques et en utilisant, en outre, comme substrat, les parois microbiennes isolées et purifiées elles-mêmes.

L'ensemble des recherches que nous allons exposer ont abouti à la conclusion suivante : la bactériolyse par l'actinomycétine de plusieurs germes gram-positifs vivants, en particulier, le staphylocoque, est attribuable à l'action de deux enzymes, distincts de l'actinozyme et des protéases banales. Ces deux enzymes sont des peptidases agissant initialement au niveau de la paroi cellulaire bactérienne dont l'altération est suivie de la lyse du microorganisme. L'actinomycétine renferme cependant d'autres agents bactériolytiques, distincts par leur spécificité, notamment ceux qui sont responsables de la streptolyse et de la pneumolyse.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Par souci de clarté, nous avons réuni dans ce chapitre tous les détails relatifs à la description et à la critique des méthodes et du matériel utilisé. Dans l'exposé des résultats expérimentaux, nous renverrons aux paragraphes de ce chapitre, chaque fois que nécessaire, par des chiffres entre parenthèses.

1) Souches bactériennes sensibles

Les souches suivantes ont été utilisées : *Staphylococcus aureus* H, *Staphylococcus aureus* S, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* (β -hémolytique, groupe A, isolé du rhino-pharynx d'un enfant atteint de scarlatine), *Streptococcus pneumoniae* (de type sérologique non déterminé, isolé du liquide céphalo-rachidien d'un patient atteint de méningite), *Sarcina lutea*, *Sporosarcina ureae* (souche Delft), *Clostridium welchii* BW, *Micrococcus lysodeikticus* NCTC 2665, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* KM, *Bacillus cereus*.

Ces souches ont été cultivées sur bouillon gélosé en boîte de Roux, ou en bouillon liquide, éventuellement avec aération

forcée, sauf *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* qui ont été préparés en infusion cœur-cerveau (Difco).

Les corps bactériens, recueillis par centrifugation et lavés trois fois à l'eau distillée, ont été utilisés soit directement à l'état vif, soit, dans certains cas, après un chauffage de trois minutes par immersion au bain d'eau bouillante.

2) Parois cellulaires sensibles

Les parois cellulaires ont été préparées (SALTON et GHUYSEN, 1957) selon les techniques de SALTON (1952b) (voir aussi SALTON et HORNE, 1951b). Après désintégration mécanique des cellules microbiennes dans l'appareil de MICKLE (1948) (voir aussi HUGO, 1954), les parois ont été purifiées par une série de centrifugations différentielles en NaCl M et eau distillée. Sauf spécification contraire, les parois cellulaires ont été soumises à l'action de la trypsine (1 mg. de trypsine brute par ml., tampon phosphate pH 7.5), pendant 2 heures à 37° C. Les parois cellulaires isolées ont été conservées en suspensions concentrées, en eau distillée, à 0° C. La lyophilisation est à déconseiller car le matériel ainsi obtenu donne des suspensions hétérogènes dont le trouble est instable.

Certaines parois ont été transformées en dérivés dinitro-phénoliques (D. N. P. parois) par réaction de leurs groupes aminés libres avec le 1-fluor 2, 4 dinitrobenzène selon le procédé de SANGER (1945) adapté par SALTON et INGRAM (communication personnelle).

3) Substrats protéiniques sensibles

Nous avons étudié, en relation avec la bactériolyse, l'activité enzymatique de l'actinomycétine sur deux substrats protéiniques : la caséine et la kératine. Ces substrats ont été choisis volontairement très différents l'un de l'autre, tant du point de vue de leur composition chimique que de leurs caractéristiques physico-chimiques.

La caséine est une phosphoprotéine globulaire, soluble dans l'eau à pH légèrement alcalin. Nous avons utilisé un produit commercial : « casein vitamin-free » Labco.

La kératine, au contraire, est une protéine fibreuse, soufrée, insoluble dans l'eau, que nous avons préparée à partir de plumes de poule suivant la procédé de LUNDGREN, STEEN, KOORN et O'CONNEL (1948). Lors d'une étude théorique sur la stabilité des fibres de kératine, ces auteurs ont proposé un solvant des kératines de pH neutre, constitué d'un mélange alcool-eau-électrolytes additionné d'un agent réducteur. La protéine est dissoute à 80° C. par rupture des trois types de liaisons : ponts hydrogène, ponts S-S et forces électrostatiques, qui unissent entre elles les chaînes polypeptidiques du matériel original. Elle peut être ensuite récupérée, soit en diminuant le pouvoir solvant du milieu par addition d'un grand volume d'eau, soit en exprimant le gel que l'on obtient par abaissement de la température en dessous d'une certaine valeur critique. Le matériel ainsi préparé est insoluble dans l'eau et n'est solubilisé par le mélange eau-alcool, à température convenable, que si celui-ci contient suffisamment de réducteur. Ceci indique que, lors de la récupération de la kératine extraite, les groupes sulfhydryles se sont très rapidement réoxydés pour reformer les ponts S-S. Des déterminations de pression osmotique et de diffusion indiquent d'ailleurs que cette méthode de préparation permet d'obtenir la protéine dans un état très comparable à son état natif.

Les plumes de poule, dégraissées et séchées ont été solubilisées par extraction à 80° C. pendant 30 min. par une solution M/10 de bisulfite dans du méthanol à 56 % p/v. Après filtration, la solution est refroidie à 0° C. et le précipité, recueilli et lavé, est séché puis broyé.

4) Souches de streptomycètes

La plus grande partie de nos recherches a été réalisée avec un *Streptomyces albus* isolé par WELSCH et individualisé sous le nom de souche G.

Nous avons également recherché les activités protéolytiques et bactériolytiques d'une centaine de souches différentes de streptomycètes isolées par WELSCH et conservées dans les collections du Service de Microbiologie de l'Université de Liège.

Les *Streptomyces* spp ont été entretenus à l'état sporulé sur

extrait de champignon lactosé et gélosé (WELSCH, 1954) ou sur gélose peptone-asparagine (0.5 p. 1000).

5) Culture des streptomycètes

a) *Culture en shake-flask.* — La production, par ce procédé, d'actinomycétine bactériolytique a été pendant longtemps irréalisable, même en introduisant dans le milieu de culture des substances telles que l'agar et l'amidon qui étaient cependant connues pour exercer un effet favorable dans les cultures stationnaires (WELSCH, 1947a).

Nos premières actinomycétines staphylolytiques ont été obtenues par extraction au moyen de congélations et décongélations successives (MAXTED, 1948) de cultures de *S. albus* G sur milieu de CZAPEK peptoné (1 %) et gélosé.

Le rendement de ce procédé étant médiocre, nous avons recherché d'autres conditions de culture en milieu submergé et mis au point les deux milieux suivants :

1) *Milieu peptoné* : peptone Wilson 1 kg., NaNO₃ 200 g., KCl 50 g., K₂HPO₄ 100 g., Co(NO₃)₂.6H₂O 3 g., MgSO₄.7H₂O 80 g., eau 100 l. Ce milieu assure une production élevée des divers principes protéolytiques et bactériolytiques.

2) *Milieu plumes-caséine.* — Ce milieu, au contraire, est plus spécialement adapté à la production de l'activité staphylolytique et n'assure qu'une faible production des autres agents protéasiques et bactériolytiques de l'actinomycétine. Il a été mis au point dans un but de fabrication et de purification du principe staphylolytique.

y g. de plumes blanches de poule sont, après séchage, traitées à 100° C. pendant 1 heure par 10 y ml. de KOH N/8. On centrifuge, lave et ajoute au liquide surnageant y g. de caséine alimentaire en chauffant à 70° C. jusqu'à dissolution.

Le milieu de culture lui-même est constitué de : K₂HPO₄ 0.1 %, NaNO₃ 0.2 %, MgSO₄ 0.1 %, KCl 0.025 % et une quantité de l'hydrolysât précédent telle que le volume final renferme 0.25 % de plumes hydrolysées et 0.25 % de caséine.

Les cultures sont réalisées en flacons d'Erlenmeyer, de un l. de capacité, contenant 500 ml. de milieu que l'on place sur machine à agiter renfermée dans une enceinte thermostatée

(WELSCH, 1947b). La vitesse de rotation est de 100 tours/minute, la température de 27 à 28° C. et la durée de l'incubation de 48 à 72 heures. Les milieux sontensemencés au moyen d'une culture liquide âgée de 48 h., obtenue elle-même par ensemencement de spores recueillies à partir d'une culture sur gélose-champignon ou gélose-asparagine.

b) *Culture en cuve de plusieurs centaines de litres.* — Des cultures en milieu peptoné ont été réalisées en cuve semi-industrielle à l'usine-pilote du Centre de Recherches pour la Pénicilline et les autres Antibiotiques de Liège, brièvement décrite par WELSCH et DELCAMBE (1954). L'incubation est d'environ 60 heures à 28° C. Un taux d'aération adéquat est maintenu grâce à une surpression d'air égale à 0.5 kg./cm² et à un barbotage de 0.2 volume d'air par volume de culture par minute.

6) *Mesure des activités lytiques*

La mesure de toutes les activités enzymatiques se ramène à une détermination de la quantité de substrat digéré. En pratique, étant donné l'insolubilité des substrats que nous avons utilisés, caséine exceptée, les activités se manifestent par une disparition progressive du trouble des suspensions. Dans tous les cas, l'incubation a été réalisée par immersion en bain d'eau réglé à 37° C.

a) *Lyse des cellules bactériennes.* — 5 ml. de la suspension bactérienne contenant l'enzyme à doser ont été incubés dans des tubes à réaction ordinaires. Les troubles ont été directement mesurés au néphélomètre de PULFRICH. Dans la plupart des cas, nous nous sommes placés dans des conditions telles que la cinétique de la lyse se déroule suivant une réaction pseudomoléculaire. Dans ces conditions, la constante de vitesse

s'exprime par $k = \frac{1}{t} \log \frac{T_0}{T_t}$, où T_0 est le trouble initial et T_t

le trouble mesuré après un certain temps de réaction, ce trouble étant par ailleurs directement proportionnel à la concentration bactérienne. Dans quelques cas, cependant, la cinétique ne concorde pas avec une réaction d'ordre 1 et l'activité a été exprimée en pourcentage de trouble disparu, x , après un temps donné.

Les troubles initiaux étaient tels que la quantité de lumière qu'ils diffusaient dans une direction faisant avec celle du faisceau incident un angle de 45°, était dix fois supérieure à la quantité de lumière diffusée par le verre étalon n° 4 fourni par le constructeur du photomètre. Le trouble absolu de ce verre étalon a été mesuré par comparaison avec le standard absolu, également fourni avec l'appareil. Il est égal à 0.0142.

Les suspensions microbiennes ont été faites, selon les cas : a) en solution de K_2HPO_4 M/30, b) en tampons KH_2PO_4 - K_2HPO_4 de pH 7 et de force ionique contrôlée (GREEN, 1933), c) dans ces mêmes tampons additionnés de divers électrolytes, d) dans les tampons de MILLER et GOLDBER (1950) : NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 - $NaCl$ de pH 7 et de force ionique 0.1.

b) *Activités protéolytiques.* — 1) L'activité kératinolytique a été mesurée de la même façon que les activités bactériolytiques, à partir de kératine finement broyée mise en suspension dans une solution de K_2HPO_4 M/30. La vitesse de réaction est manifestement d'autant plus grande que les particules de la suspension sont plus fines. Les mesures d'activité kératinolytique n'ont donc pas de valeur absolue, étant donné qu'il est impossible d'obtenir un trouble initial parfaitement standardisé.

2) L'activité caséinolytique a été mesurée de la façon suivante : à 0.5 ml. de la solution enzymatique à doser, on ajoute 2 ml. d'une solution de caséine (0.2 %) en K_2HPO_4 0.05 M. Après des temps d'incubation variables, on prélève 0.5 ml. du mélange que l'on ajoute à 4.5 ml. d'acide trichloracétique à 11 pour 1000. Après 15 minutes de repos à la température du laboratoire, on mesure au néphélomètre de PULFRICH le trouble qui est directement proportionnel à la concentration en caséine non hydrolysée.

Les activités kératinolytique et caséinolytique ont été exprimées sous la forme de $\log \frac{T_0}{T_t}$. Dans les conditions décrites, ces protéolyses présentent généralement une cinétique d'ordre 1.

c) *Lyse des parois cellulaires.* — 3 ml. d'une suspension de parois cellulaires ont été incubés dans des tubes de 7 mm. de diamètre. Les lectures de trouble ont été effectuées au spectrophotomètre Unicam, modèle SP600, à 700 m μ . Les

résultats ont été exprimés sous la forme de $\log \frac{\Delta_0}{\Delta_t}$, où Δ_0 et Δ_t sont les densités optiques de la suspension aux temps 0 et t. La valeur de Δ_0 est généralement proche de 0.5, ce qui correspond à 1 mg. de parois cellulaires (poids sec) par ml. Les suspensions ont été faites dans des tampons identiques à ceux utilisés pour la bactériolyse.

7) Variabilité des streptomycètes

WAKSMAN (1927) a montré l'importance de la variabilité chez les streptomycètes lorsqu'ils sont soumis à des cultures répétées sur milieux artificiels. Non seulement ces mutations portent sur des propriétés macroscopiques des colonies, comme la formation de pigments par exemple, mais aussi, ainsi que l'a observé McCARTY (1952), sur la propriété de sécréter certains enzymes. Nous avons observé un phénomène semblable, dans le milieu plumes-caséine particulièrement. En effet, malgré la stricte reproductibilité des conditions de culture, le rendement en principe staphylolytique varie généralement, non seulement d'un lot de fabrication à l'autre, mais même d'un flacon à l'autre, au cours d'une fabrication réalisée sur la même machine à agiter (5). Ces fluctuations doivent être attribuées à des variations de la souche qu'il est possible d'atténuer par sélection. La courbe I de la figure 1 donne la répartition de l'activité staphylolytique dans 25 flacons au cours d'une fabrication donnée. Le *Streptomyces* contenu dans le flacon dont l'actinomycétine est la plus active, est réisolé sur milieu solide et utilisé comme semence pour une deuxième fabrication de 25 flacons. En procédant ainsi, on peut considérablement augmenter le rendement de la souche (courbes I à IV).

Notons, cependant, qu'une souche améliorée peut perdre à nouveau ses propriétés acquises, au cours de sa conservation sur milieu solide à 0° C.

8) Concentration de l'actinomycétine

Le procédé suivant a été appliqué aux actinomycétines obtenues en milieu peptoné. Le filtrat de culture est évaporé jusqu'au 1/10 de son volume original par distillation sous

pression réduite à 35° C., avec barbotage d'azote. Au concentrat, refroidi à 0° C., on ajoute lentement et avec agitation constante, 3 volumes d'une solution saturée de sulfate ammonique, également refroidie à 0° C., et contenant suffisamment de soude pour maintenir le mélange à pH 8. Après addition de 0.25 % de célite, le précipité est recueilli et mis en suspension dans une solution de K_2HPO_4 M/30. Le résidu insoluble est éliminé et le surnageant, ainsi concentré environ 100 fois avec un rendement de 75 à 100 %, est éventuellement dialysé contre eau distillée.

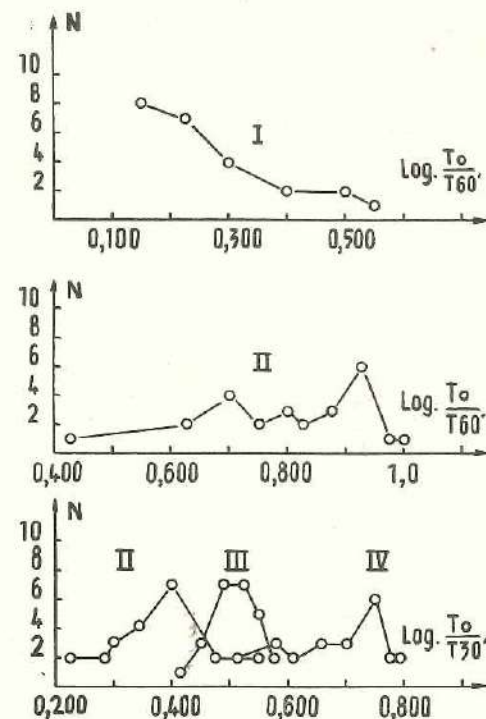


FIGURE 1. — Distribution de l'activité staphylolytique (souche S) dans les actinomycétines provenant de groupes de 25 cultures simultanées, initialement identiques.

En ordonnées : nombre de préparations ayant un même degré d'activité.

En abscisses : activité staphylolytique exprimée par la valeur de $\log T_0/T_t$ mesurée après 60' (2 graphiques supérieurs) ou 30' (graphique inférieur) d'incubation de 0.5 ml. de filtrat de culture non dialysé en présence de 4.5 ml. de la suspension aqueuse staphylococcique.

Les cultures utilisées pour l'expérience représentée par la courbe I ont étéensemencées avec une culture stock; celles utilisées pour les courbes II, III et IV ont étéensemencées chaque fois avec la culture la plus active de l'expérience précédente.

9) *Adsorption et chromatographie sur corps microbiens*

a) *Adsorption en masse.* — A une quantité donnée d'actinomycétine, on ajoute un volume déterminé d'une épaisse suspension microbienne. L'équilibrage est réalisé à 0° C. Après centrifugation, on mesure les activités lytiques du liquide surnageant dialysé. Nous avons utilisé comme substrat microbien *S. aureus* H et *E. coli*, tantôt vivant, tantôt tué par un chauffage de trois minutes à 100° C. L'adsorption est réalisée dans des conditions bien déterminées de pH (de 5.6 à 10.4), et de force ionique (de 0.01 à 0.28) au moyen de divers tampons : acétate, orthophosphates, véronal, glycine. La quantité de substrat microbien utilisée et exprimée en poids sec a varié de 0.04 % à 1.5 %.

b) *Adsorption chromatographique.* — Une suspension épaisse de corps microbiens lavés et chauffés (3 minutes à 100° C. ou 15 minutes à 75° C.) est ajoutée à une quantité donnée d'un support inerte : sable Baker lavé, calciné, moulu et tamisé à 100 meshs. Nous avons utilisé 50 mg. de corps microbiens, exprimés en poids sec, pour 25 g. de sable. Après homogénéisation de la pâte au mortier, le matériel est séché en couche mince, sous courant d'air, pendant 6 heures, puis en étuve à 45° C. pendant 12 heures. Il est ensuite introduit par petites portions dans une colonne de verre contenant une solution de NaCl à 5 % en tampon glycine-NaOH de pH 9. On prend soin de déposer à la base et au sommet de la colonne adsorbante une épaisseur de 2 à 3 cm. de sable vierge. Après lavage de la colonne au moyen de la solution saline, puis d'eau distillée, on fait passer lentement, à 0° C., un volume déterminé d'actinomycétine concentrée (8), dialysée et tamponnée à pH 9, μ 0.05 (glycine-NaOH). La colonne est ensuite lavée à la même vitesse par le même tampon. Des fractions successives sont recueillies séparément au moyen d'un collecteur automatique et leurs activités sont déterminées.

Nous avons utilisé des colonnes à *E. coli*, à *S. aureus* H et à *E. coli* et *S. aureus* H mélangés à parties égales.

c) *Calcul des isothermes d'adsorption.* — Ils ont été calculés graphiquement en portant en ordonnées le log du nombre d'unités enzymatiques adsorbées par mg. de corps microbiens (log q) et en abscisses le log de la concentration enzymatique

dans la phase liquide en équilibre avec l'adsorbant, c'est-à-dire le nombre d'unités contenues dans un ml. de la phase liquide (log c). Avant passage de l'actinomycétine sur la colonne, celle-ci contient de l'eau ; de même, les derniers ml. d'actinomycétine sont suivis par un certain volume de tampon. Par suite de la diffusion, les premiers et les derniers aliquots sont donc dilués. Le taux de dilution a été déterminé, au moyen d'une courbe d'étalonnage, par l'intensité de leur coloration. L'actinomycétine brute contient en effet diverses substances colorées ne subissant aucune adsorption lors du passage au travers de ces colonnes.

10) *Fractionnement par adsorption sur sable*

a) *Principe.* — La purification des protéines par adsorption sur substrats minéraux est un procédé relativement peu répandu. En effet, un des stades de l'adsorption est souvent endothermique et s'accompagne de modifications de structure conduisant à une dénaturation ou à une adsorption irréversible.

Cet inconvénient peut être partiellement évité dans le cas des principes lytiques de l'actinomycétine, moyennant certaines conditions.

Le système staphylolytique et, à un moindre degré, l'enzyme streptolytique et l'actinozyme, présentent, de façon générale, une adsorption de caractère endothermique élevé sur la plupart des substrats minéraux tels que acticarbonés, silicagel, alumine. Il faut, par exemple, huit fois plus d'acticarboné à 0° C. qu'à 30° C. pour adsorber les activités streptolytique et staphylolytique. Si on adsorbe à 30° C. avec un minimum de ce substrat, on ne peut, quelles que soient les conditions d'éluion, y compris un abaissement de la température à 0° C., récupérer les activités. Il y a eu dénaturation, ou fixation irréversible, ou les deux.

En examinant différents types de sable dans le but de trouver un support inerte pour les expériences de chromatographie sur corps microbiens (9), un certain sable technique (sable pour agglutination des combustibles) avait présenté d'intéressantes propriétés. En effet, en faisant passer à 0° C., sur de petites colonnes de ce sable, un volume déterminé d'actinomycétine concentrée et dialysée, soit telle quelle, soit additionnée de

certaines tampons et électrolytes, on observait une certaine spécificité dans l'adsorption des principes lytiques (tableau I). A force ionique nulle, ce sable adsorbe fortement les principes actifs sur *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* et la caséine. Au fur et à mesure que le pH et la force ionique augmentent, ces substrats sont, dans l'ordre cité, de plus en plus faiblement adsorbés. De plus, même à force ionique nulle, on peut, moyennant un choix approprié de la quantité de sable, du volume de l'actinomycétine, et de son taux de concentration, montrer que les diverses activités sont adsorbées avec des rendements différents. Enfin, l'adsorption est, au moins partiellement, réversible.

b) *Technique*. — Une actinomycétine concentrée (8) et dialysée, C., est passée à 0° C. sur une colonne de sable. Le rapport quantité de sable/volume d'actinomycétine a été choisi de telle façon que la fraction recueillie après passage, N, soit dépourvue des principes lytiques actifs sur *S. aureus*, *S. pyogenes* et *E. coli* chauffée. Ces trois types d'activité sont, au moins partiellement, récupérés (fraction A) par élution à pH 10.6 (tampon glycine-NaOH-NaCl), à force ionique de 1.2 et en présence d'éthylhexanol. Les fractions C, N et A ont été dialysées et lyophilisées.

II) Fractionnement par extraction

a) *Principe*. — La substance à purifier est dispersée sur une phase solide et progressivement solubilisée par des liquides dont le pouvoir solvant va croissant.

Cette méthode élimine donc tout d'abord, de l'échantillon à purifier, les molécules à solubilité élevée qui, dans le procédé par précipitation fractionnée, ne sont, au contraire, éliminées qu'en dernier lieu.

Ce procédé de fractionnement est d'une très grande spécificité. Il a été appliqué par DESREUX et ses collaborateurs (DESREUX, 1948, 1949 ; DESREUX et SPIEGELS, 1950 ; DESREUX et OTH, 1952) au fractionnement de certains polymères amorphes et, à cette époque, nous l'avons utilisé pour démontrer l'hétérogénéité de masses moléculaires de l'acide ribonucléique de levure (DESREUX et GHUYSEN, 1951). DERRIEN et REYNAUD (1955)

ont également employé une méthode analogue pour la séparation de deux hémoglobines d'espèces animales différentes.

b) *Techniques*. — 100 mg. des fractions A ou N (10) dissoutes dans un peu de solution physiologique, sont dispersés sur 50 g. de verre Pyrex broyé et tamisé à 100 meshs. Après homogénéisation, la pâte est séchée sous courant d'air à température du laboratoire. Les grains de verre, ainsi enrobés de la substance à fractionner, sont introduits dans une colonne en les laissant sédimenter dans une solution qui renferme 300 g. de sulfate ammonique par litre. On fait ensuite passer la même solution à travers la colonne à la vitesse de 20 ml. par heure. Lorsque

TABLEAU I

Adsorption de quelques activités lytiques de l'actinomycétine par un sable technique (sable pour agglutination des combustibles)

Conditions d'adsorption	Pourcentage d'activité adsorbée			
	caséino-lytique	coli-lytique	strepto-lytique	staphylo-lytique (souche H)
Eau	100	100	100	100
KH ₂ PO ₄ 0.3 M	50	50	100	100
NaAc-HAc-NaCl pH 4.7 μ 1.2	50	50	100	100
K ₂ HPO ₄ 0.3 M	0	0	50	90
NaOH-glycine pH 9.2 μ 0.2	0	0	50	90
NaOH-glycine-NaCl pH 9.2 μ 1.2	0	0	50	75
NaOH-glycine-NaCl pH 10.6 μ 1.2	0	0	30	70
NaOH-glycine-NaCl-éthanol 1 % ; pH 10.6 ; μ 1.2 +éthylhexanol 5 ‰ (1)	0	0	0	30

(1) Même résultat si l'éthylhexanol est remplacé par le méthylisocarinol (1 ‰), l'alcool octalique (0.1 ‰) ou l'alcool laurique (0.1 ‰).

l'extraction par ce solvant est terminée, il est remplacé par un autre ne contenant plus que 250 g. de sulfate ammonique par litre. On continue ainsi en faisant passer des solutions de moins en moins concentrées. Ces expériences ont été réalisées à 0° C., d'une part à pH 5.5 (tampon acétate), d'autre part à pH 9.5 (tampon glycine-NaOH). Après passage au travers de la colonne, les diverses fractions ont été dialysées et leurs activités mesurées.

12) Fractionnement par défécation à l'hydroxyde de chrome

L'actinomycétine est amenée à pH 5.5 ; on y ajoute un volume connu d'une solution concentrée de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$. On précipite l'hydroxyde correspondant par addition lente de soude 0.1 N, sous agitation, à 5° C, et en contrôlant le pH qui ne peut dépasser 7. La concentration en ions Cr^{+++} utilisée a varié de 0.05 à 0.15 M suivant que l'actinomycétine avait subi ou non une défécation antérieure. Le précipité colloïdal est éliminé par centrifugation à 5° C. et les activités sont mesurées dans le liquide surnageant dialysé.

13) Fractionnement et chromatographie sur échangeurs cationiques

L'intérêt de l'amberlite IRC 50, échangeur cationique à fonctions carboxyliques, pour la purification des protéines basiques, douées ou non d'activité enzymatique, a été démontré par les travaux de TALLEN et STEIN (1953) sur le lysozyme cristallisé, de HIRS (1953) sur le chymotrypsinogène, de HIRS, MOGRE et STEIN (1953) sur la ribonucléase pancréatique, de PALÉUS et NEILANDS (1950), ainsi que de MARGOLIASH (1954), sur le cytochrome c. Citons également la séparation de différentes hémoglobines, réussie par BOARDMAN et PARTRIDGE (1953) et par PRINS et HUISMAN (1955).

Nous avons mentionné, dans l'historique, la finesse de séparation qu'il est possible d'obtenir par l'emploi de ces échangeurs ioniques. Rappelons, en effet, la séparation chromatographique du lysozyme en trois composants actifs distincts, alors que l'hétérogénéité de cet enzyme ne pouvait être mise en évidence que par des méthodes immunologiques ou physicochimiques très sensibles.

a) *Choix de l'échangeur.* — Nous avons expérimenté trois échangeurs cationiques à fonctions carboxyliques : les amberlites IRC 50 et 105 G de Rohm et Haas, et la lewatite CNO de Bayer, de même qu'un échangeur anionique à fonctions amines : l'amberlite IR4B de Rohm et Haas. 250 ml. d'un filtrat de culture fortement staphylolytique (milieu plumes-caséine) ont été passés sur de petites colonnes renfermant 10 g. de chacune des résines précédentes. L'activité staphylolytique était retrouvée intacte, voire augmentée, après passage sur l'IR4B. La 105G et la CNO présentaient une certaine capacité de fixation. Toutefois, seule l'IRC50 permettait une adsorption complète des activités lytiques contenues dans l'actinomycétine. L'intérêt de cette résine s'est encore accru du fait qu'elle présentait une certaine spécificité dans l'adsorption des divers principes lytiques, suivant le pH auquel on effectuait l'échange ionique. Le pH de cet échange peut être réglé par une neutralisation partielle et préalable de l'amberlite par de la potasse. Le tableau II montre le degré d'adsorption de quelques activités lytiques de l'actinomycétine, lorsque le pH, mesuré après passage au travers de la colonne, varie de 5 à 7.5. On constate que l'activité staphylolytique est entièrement retenue aux pH compris entre 6.7 et 7.1, tandis que les autres activités ne le sont qu'à pH plus faible, de 5.5.

L'activité staphylolytique est donc due, au moins partiellement, à un enzyme dont le caractère nettement basique laisse prévoir une séparation relativement aisée des autres principes lytiques.

b) *Coefficient de distribution.* — La vitesse avec laquelle une substance se déplace le long d'un chromatogramme, que l'adsorption se fasse par échange ionique ou par tout autre processus, est une fonction du coefficient de distribution de celle-ci entre les phases stationnaire et mobile. Le coefficient de distribution est défini par le rapport de la concentration de la substance dans la phase solide à sa concentration dans la phase liquide. Le résultat d'une chromatographie peut être prévu en déterminant le coefficient de distribution par des expériences d'adsorption en masse, et en vérifiant, par rééquilibrage, la réversibilité du phénomène.

Nous avons recherché les coefficients de distribution et vérifié

la réversibilité de l'adsorption dans des tampons de pH et de force ionique variés. Pour l'étude de chaque condition particulière, l'amberlite doit au préalable être équilibrée contre le tampon choisi. Dans ce but, une quantité donnée de résine, sous forme COOH, purifiée ainsi qu'il est indiqué en c, 2, est suspendue dans le tampon et agitée. Le pH est maintenu à sa valeur initiale par addition de soude. Lorsque le pH reste stable pendant au moins 15 minutes, l'amberlite est essorée. Elle est ensuite introduite dans une colonne à travers laquelle on fait lentement passer le tampon choisi. Après 15 heures d'écoulement, la résine est lavée à l'eau et séchée.

TABLEAU II

Influence du pH sur l'adsorption par l'amberlite IRC50 de quelques activités lytiques de l'actinomycétine

pH	Intensité de l'adsorption des activités			
	staphylolytique (souche S)	colilytique	caséinolytique	kératinolytique
5	+++	+++	+++	+++
5.4	+++	+++	+++	+++
5.7	+++	+++	++	++
6	+++	+	+	+
6.2	+++	±	±	±
6.7	+++	0	0	0
7.1	++	0	0	0
7.3	+	0	0	0
7.5	0	0	0	0

Les adsorptions en masse sont réalisées dans des tubes à réaction ordinaires, à température du laboratoire. Résine et solution enzymatique sont agitées pendant trois minutes et les activités résiduelles de la phase liquide sont mesurées après élimination de la résine. Un nouvel équilibre est alors réalisé en resuspendant celle-ci dans le tampon initial ou dans un solvant présentant d'autres caractéristiques. Si le rééquilibrage est effectué à un pH notablement différent du pH original,

on provoque des variations de volume de la phase solide d'autant plus importantes que les écarts de pH sont plus grands. De telles variations dans le volume d'une colonne chromatographique perturbent évidemment les résultats. Aussi, les essais chromatographiques proprement dits ont-ils toujours été réalisés à pH constant, mais à force ionique éventuellement variable.

c) *Préparation de la résine.* — L'amberlite IRC50 a été utilisée dans deux buts.

1) Concentration de l'actinomycétine. 100 g. et 300 g. d'IRC50 technique sont préalablement neutralisés respectivement par 250 et 100 ml. de KOH normale. Les colonnes réalisées au moyen de ces résines peuvent adsorber respectivement l'activité staphylolytique et les autres activités lytiques contenues dans 10 l. d'actinomycétine (milieu plumes-caséine). Ceux-ci sont, à 10° C., et en 15 heures, passés successivement sur les deux colonnes. La première colonne contient l'amberlite dont le degré de neutralisation est le plus élevé.

2) Purification chromatographique. Nous avons utilisé l'IRC50 XE64. Celle-ci nous a été fournie par Rohm et Haas, mais nous l'avons aussi préparée nous-même, à partir de l'IRC50 technique, selon le procédé de MARGOLIASH (1954). Avant d'être équilibrée, comme indiqué ci-dessus, l'XE64 a été complètement neutralisée par addition de soude et ramenée sous sa forme acide. Abondamment lavée à l'eau, elle a ensuite été suspendue dans de l'acide chlorhydrique 3N que l'on a porté à 100° C. pendant 3 heures. Cette amberlite, après un nouveau lavage à l'eau, a été réservée, après séchage, pour les essais chromatographiques.

d) *Tampons choisis.* — L'XE64 ainsi préparée a été équilibrée à 0° C. contre les tampons suivants : 1) véronal sodique (0.05 M) -HCl de pH 7. 2) tampons acide citrique-Na₂HPO₄ de pH et de force ionique différents : pH 7.2-0.2 M en Na; pH 6.1-0.2 M en Na; pH 5.5-0.05 M en Na.

e) *Technique chromatographique.* — Après équilibrage, l'XE64 est introduite dans une colonne contenant le tampon choisi. Le remplissage est réalisé par petites fractions, en ayant soin d'expulser chaque fois les bulles d'air. Le tampon est ensuite passé à 0° C. au travers de la colonne pendant 15 heures avec, éventuellement, l'aide d'une légère pression. Après cela, on dépose

sur la surface supérieure de l'amberlite une certaine quantité de la préparation à chromatographier, dissoute dans un minimum de tampon. Le chromatogramme est enfin développé au moyen de ce même tampon, avec une vitesse d'écoulement de 10 ml./heure. Dans certains cas, la force ionique du tampon est, après le passage d'un certain volume, augmentée par addition de NaCl. Les fractions sont recueillies au moyen d'un collecteur automatique. On dose leurs activités lytiques ainsi que leur teneur en protéines.

f) *Dosage des protéines.* — Nous avons utilisé la microméthode de FOLIN et CIICALTEU, modifiée par LOWRY *et alii* (1951). A 0.5 ml. de la solution à doser, on ajoute 5 ml. de la solution « microprotein reagent », préparée extemporanément en mélangeant 100 ml. de Na_2CO_3 à 4 %, 1 ml. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 2 % et 1 ml. de tartrate sodico-potassique à 4.5 %. On porte à 37° C. pendant 30 minutes et on ajoute 0.5 ml. du réactif de Folin et Ciocalteu. Après 30 minutes de repos à 30° C., l'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre Beckman à 735 m μ . La teneur en protéines est évaluée en se rapportant à une courbe d'étalonnage préalablement dressée au moyen de sérum-albumine Armour.

14) *Composition chimique des parois cellulaires sensibles et analyse des produits obtenus après leur digestion par l'actinomycétine* (SALTON et GHUYSEN, 1957)

a) *Composition des parois cellulaires.* — Après hydrolyse chimique par HCl 6 N pendant 24 heures à 105° C., les acides aminés et les hexosamines ont été caractérisés par chromatographie bidimensionnelle (phénol- NH_3 ou pyridine-eau 8:2 (v/v) d'une part et n-butanol-acide acétique-eau 6:1:2 (v/v/v) d'autre part) sur papier Whatman et révélation à la ninhydrine. La tache correspondant aux hexosamines a été découpée et extraite à l'eau. Les sucres provenant de la dégradation des hexosamines par l'action de la ninhydrine, (GARDELL, HEIJKENSKJÖLD et ROCH-NORLUND, 1950; STOFFYN et JEANLOZ, 1954), ont été séparés par le procédé de JERMYN et ISHERWORD (1949).

b) *Digestion des parois cellulaires.* — 50 mg. de parois cellulaires ont été digérés à 37° C. pendant 24 heures par 100 $\mu\text{g./ml.}$

de nos préparations enzymatiques, dissoutes dans 5 ml. d'une solution d'acétate ammonique de force ionique optimale. La solution clarifiée, sauf exception, a été centrifugée et dialysée contre 50 ml. d'eau. Dialysats et indialysats ont été lyophilisés.

c) *Analyse des dialysats.* — Les résidus dialysables ont été dissous dans 0.2 ml. d'eau et soumis aux mêmes analyses que l'hydrolysate acide des parois cellulaires. On a, en plus, procédé aux recherches suivantes : 1° caractérisation spécifique de l'acide α - ϵ diaminopimélique par le procédé chromatographique de RHULAND, WORK, DEAMAN et HOARE (1955). 2° Identification des acides aminés dinitrophénoliques (2) libérés des DNP parois, par le procédé de BLACKBURN et LOWTHER (1951). 3° Identification de la D-alanine par sa transformation en acide pyruvique, au moyen de D-aminoacide oxydase, après sa séparation chromatographique. L'acide pyruvique a été décelé par le réactif de AUCLAIR et PATTON (1950). 4° Mise en évidence des sucres et sucres aminés par chromatographie unidimensionnelle en pyridine-eau 8:2 (v/v) et révélation par la réaction de PARTRIDGE (1949).

d) *Analyse des indialysats :*

1° *Electrophorèse sur papier.* Les électrophorèses ont été réalisées à pH 7 (tampon de MILLER et GOLDBER, 1950, μ 0.1 ou 0.2), à pH 9.2 (borax M/20) et pH 6.4 (pyridine, acide acétique, eau). Après migration, les divers composants ont été indifféremment révélés à la ninhydrine ou selon le procédé de RYDON et SMITH (1953).

2° *Ultracentrifugation.* Les expériences ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse Spinco équipée du système optique de PHILPOT-SVENSON, par la méthode de la « synthetic boundary », en tampon pH 7, μ 0.1 de MILLER et GOLDBER (1950) et à la concentration de 0.5 %.

CHAPITRE III

ACTINOZYME ET STAPHYLOLYSE

Dans ce chapitre, nous avons rassemblé les arguments qui, progressivement, nous ont amené à considérer que la colilyse et la staphylolyse sont des manifestations lytiques complètement indépendantes.

A. — Influence de divers facteurs sur la staphylolyse et la colilyse

a) Force ionique

1) *Staphylolyse*. — Lorsque une actinomycétine a été longuement dialysée contre eau distillée, elle est sans effet sur le trouble des suspensions aqueuses staphylococciques. Toutefois, l'activité lytique peut être restaurée, à pH voisin de 7, par l'addition d'électrolytes en concentration convenable. Additionnée de divers sels, isolément ou associés, la solution dialysée manifeste toujours une activité maximale pour une valeur de force ionique comprise entre 0.015 et 0.025.

L'action activatrice des divers sels est cependant, au moins partiellement, spécifique (GHUYSEN, 1952). C'est ainsi que la staphylolyse est meilleure en solution d'orthophosphates potassiques qu'en solution de sulfate ammonique amenée à pH 7 par neutralisation à la soude (tableau III). L'effet spécifique

TABLEAU III

Influence de l'orthophosphate et du sulfate ammonique (pH 7) sur la staphylolyse (souche H)

Force ionique	% de trouble disparu, après 6 heures d'incubation en	
	orthophosphates potassiques	sulfate ammonique
0.0000	5	5
0.0014	20	—
0.0025	30	—
0.0051	41	20
0.0077	50	—
0.0100	58	—
0.013	67	35
0.016	66	—
0.021	60	40
0.026	55	32
0.040	44	28
0.054	10	22
0.082	5	—

favorable du phosphate est bien mis en évidence si l'on examine l'influence de mélanges de phosphates potassiques et de sulfate ammonique. La figure 2 montre que la staphylolyse est vraiment optimale lorsque la force ionique totale est, dans le cas de l'actinomycétine utilisée, de 0.015, la contribution des phosphates pouvant être réduite à 0.0014 et peut-être moins. En présence de cette minime quantité d'orthophosphates, les sels utilisés pour compléter la force ionique se classent dans l'ordre suivant en fonction de leur effet activateur : $\text{NaCl} < \text{NH}_4\text{Cl} < \text{Na}_2\text{SO}_4 < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (tableau IV).

Par ailleurs, le métaphosphate ne paraît pas pouvoir remplacer l'orthophosphate comme effecteur de la staphylolyse. Le pyrophosphate, au contraire, peut jouer ce rôle (tableau V)

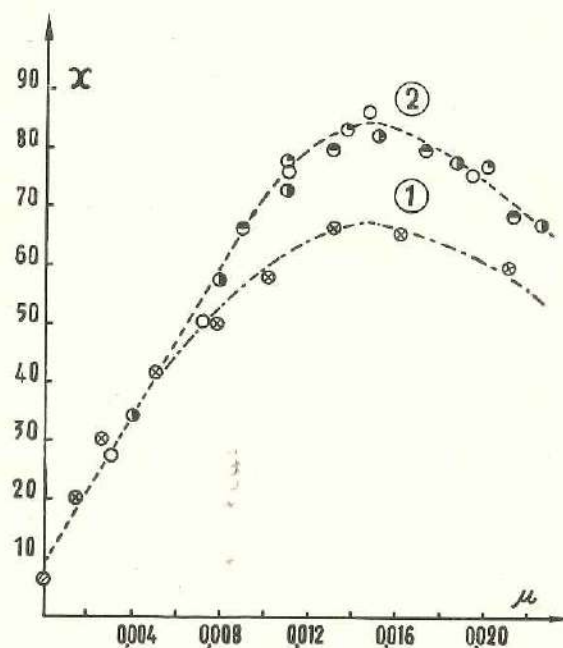


FIGURE 2. — Influence de la force ionique et de la nature des électrolytes sur la staphylolyse (souche H) par l'actinomycétine.

En ordonnées : pourcentage de trouble disparu après 180 minutes.

En abscisses : force ionique.

Courbe 1 : tampon d'orthophosphates potassiques, pH 7.0.

Courbe 2 : sulfate ammonique associé à des quantités d'orthophosphates potassiques telles qu'elles apportent une force ionique de 0.0077, 0.0051, 0.0025 ou 0.0014 (pH 7).

à condition d'être utilisé à concentration suffisamment réduite pour éviter une trop forte alcalinisation du milieu, incompatible avec la staphylolyse.

TABLEAU IV

Influence de divers électrolytes (pH 7) sur la staphylolyse (souche H) en présence d'orthophosphates potassiques (μ 0.0014)

Force ionique totale	% de trouble disparu, après 6 heures d'incubation en			
	NaCl	NH ₄ Cl	Na ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.0014	20	20	—	—
0.0044	29	—	20	20
0.0054	—	45	—	40
0.0094	32	50	—	45
0.014	33	49	75	70
0.016	28	—	—	85
0.017	—	46	—	83
0.021	—	37	68	80
0.031	4	—	48	75
			12	—

TABLEAU V

Influence du pyrophosphate et du métaphosphate sur la staphylolyse (souche H)

Molarité	Métaphosphate		Pyrophosphate	
	x ⁽¹⁾	pH	x ⁽¹⁾	pH
0.0005	15	7.3	57	7.6
0.001	15	—	73	7.6
0.004	19	—	0	8.7
0.010	20	—	0	9.0
0.020	20	—	0	—
0.040	8	—	0	—
0.100	4	7.3	0	9.5

(¹) % de trouble disparu après 6 heures d'incubation.

2) Colilyse. — L'effet comparé de la force ionique sur la colilyse et la staphylolyse à pH 7 est montré dans la figure 3. L'augmentation de force ionique est obtenue par addition de sulfate ammonique neutralisé à une concentration fixe d'orthophosphates (μ 0.0014). La lyse des deux substrats est activée par addition de sulfate ammonique jusqu'à obtention d'une force ionique optimale (0.025); mais, la colilyse, contrairement à la staphylolyse, n'est que faiblement inhibée aux forces ioniques supérieures.

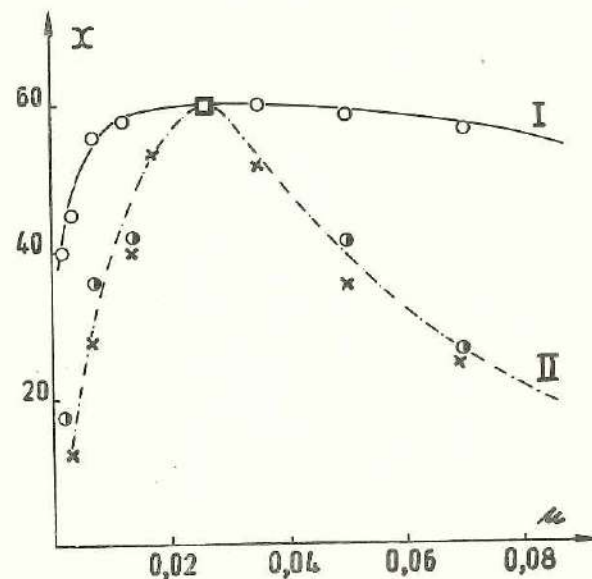


FIGURE 3. — Influence de la force ionique sur la colilyse (courbe 1) et la staphylolyse (courbe 2) par une même actinomycétine.

En ordonnées : pourcentage de trouble disparu après 20 minutes (courbe 1, *E. coli*) ou après 120 minutes (courbe 2, *S. aureus* H) d'incubation.

En abscisses : force ionique (sulfate ammonique associé à une quantité d'orthophosphates potassiques, apportant une force ionique de 0.0014; pH 7).

Les ions peuvent jouer le rôle d'activateur dans un grand nombre de réactions enzymatiques et l'on considère généralement que l'ion activant fait partie de l'enzyme même. Nous citerons quelques exemples typiques. L'amylase, le premier enzyme isolé en 1833 par PAYEN et PERSOZ, est activé spécifiquement par l'ion chlore et, à un moindre degré, par d'autres

anions. Selon GORINI (1951), GORINI et AUDRAIN (1952a, 1952b, 1953) et GORINI et FÉLIX (1953), la trypsine aurait besoin de calcium pour exercer son activité. Les ions potassium inhibent la cholinestérase mais activent la choline-acétylase, tandis que les ions Mg^{++} et Ca^{++} ont un effet inverse. Le ferment malique effectue la décarboxylation oxydante de l'acide malique en acide pyruvique en présence d'ions Mn^{++} (OCHOA *et alii*, 1950; OCHOA, 1951). Enfin, l'ion Co^{++} participe à l'activité de la glycyglycine dipeptidase, et l'ion Zn^{++} est un constituant essentiel de l'anhydrase carbonique (SMITH, 1948a, 1948b, 1949a, 1949b).

Le rôle effecteur des électrolytes dans la staphylolyse peut également être comparé à celui qu'ils jouent dans l'autophagie et l'autolyse du staphylocoque (WELSCH et DELCAMBE, 1951; WELSCH et SALMON, 1949, 1950; SMOLIAR, 1952). Dans ce cas, l'orthophosphate est indispensable et ne peut être remplacé que par quelques autres sels minéraux (métaphosphate et pyrophosphate) ou par certains composés organiques (glycérophosphate de soude, acide nucléique) à partir desquels *S. aureus* est d'ailleurs capable de libérer de l'orthophosphate. Le phosphate n'interviendrait pas dans la synthèse du système autolytique et ne serait pas nécessaire à son activité. Il permettrait la sécrétion de l'autolysine par les staphylocoques vivants.

b) pH

La figure 4 montre qu'un pH neutre est favorable à la staphylolyse. Celle-ci est pratiquement inhibée à pH 8.2. C'est, au contraire, aux environs de ce pH que la vitesse de colilyse est maximale.

c) Ion Mn^{++}

BORN (1952) a montré l'effet dépressif de l'ion Mn^{++} sur l'activité colilytique. La figure 5 montre l'action exercée par cet ion sur la staphylolyse et la colilyse, lorsqu'il est introduit dans un milieu contenant une quantité fixe d'orthophosphates ($\mu = 0.0014$) et des quantités variables de sulfate ammonique (pH 7).

A la concentration de 2.10^{-3} M, l'ion Mn^{++} exalte la staphylolyse si la force ionique due à l'association orthophosphates-sulfate ammonique est inférieure à la force ionique optimale. L'addition d'ions Mn^{++} ne provoque cependant pas une bactériolyse plus rapide que celle observée en son absence, à force ionique optimale. Si les conditions de force ionique et de concentration en ions Mn^{++} ne sont pas adéquates, celui-ci inhibe l'activité staphylolytique.

La colilyse est, au contraire, toujours inhibée, quelle que soit la concentration des ions Mn^{++} et la force ionique du milieu.

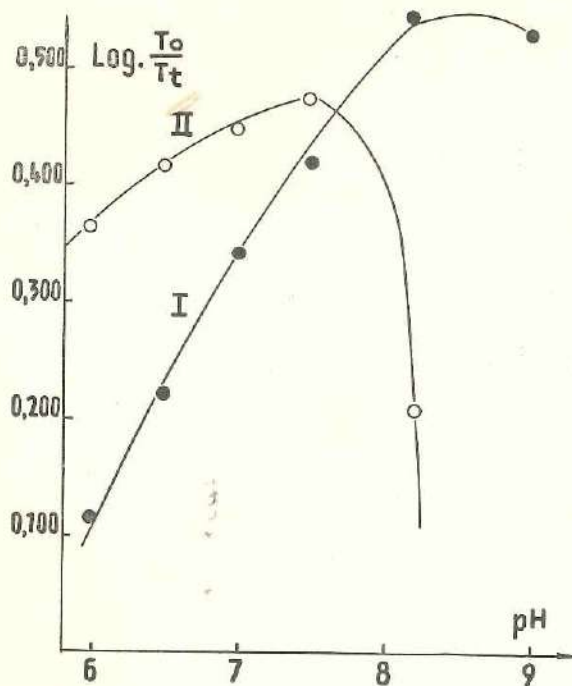


FIGURE 4. — Influence du pH sur la colilyse (courbe 1) et la staphylolyse (courbe 2) par une même actinomycétine.

En ordonnées : valeur de $\log (T_0/T_t)$ après 5 minutes (courbe 1; *E. coli*) ou après 150 minutes (courbe 2; *S. aureus* H) d'incubation.

En abscisses : valeur du pH (orthophosphates potassiques, force ionique 0.020).

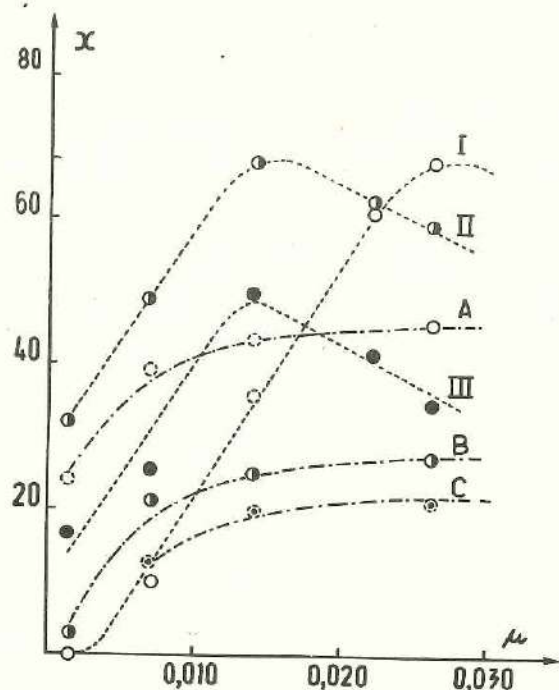


FIGURE 5. — Influence de l'ion Mn^{++} sur la colilyse (courbes A, B et C) et la staphylolyse (courbes I, II et III) par une même actinomycétine à différentes forces ioniques.

En ordonnées : pourcentage de trouble disparu après 30 minutes (courbes A, B et C; *E. coli*) ou après 200 minutes (courbes I, II et III; *S. aureus* H) d'incubation.

En abscisses : force ionique (sulfate ammonique associé à une quantité d'orthophosphates potassiques apportant une force ionique de 0.0014; pH 7).

Courbes : A et I : pas de Mn^{++} ; B et II : $Mn^{++} 2 \times 10^{-3}M$; C et III : $Mn^{++} 4 \times 10^{-3}M$.

B. — Cinétique de la staphylolyse et de la colilyse

a) Colilyse

WELSCH a montré que la lyse par l'actinomycétine d'*E. coli* chauffée se déroule à pH 8.2, en K_2HPO_4 M/30, et à 37° C., selon une réaction d'ordre 1. D'autres cinétiques peuvent cependant être exceptionnellement observées lorsque la lyse est réalisée dans des conditions expérimentales différentes, ou lorsque l'actinomycétine a subi certains traitements, ou a été préparée par culture du *Streptomyces* dans des conditions particulières. Nous reviendrons plus loin avec quelques détails sur ces cinétiques anormales.

Une unité colilytique a été définie de la façon suivante (WELSCH, 1947b) : « Une actinomycétine contient 100 unités colilytiques par ml. lorsque, à 37° C. et en 20 minutes, un volume de cette préparation réduit à 50 % de sa valeur primitive le trouble de 9 volumes d'une suspension d'*E. coli* chauffée, faite en tampon de phosphates M/30 de pH 8.2 et d'un trouble absolu de 0.142 ».

b) Staphylolyse

La staphylolyse peut se dérouler suivant des cinétiques très variables, même si les conditions de pH et de force ionique du milieu sont optimales. Nous nous limiterons ici à un seul exemple.

Dans une réaction d'ordre 1, la quantité de substrat détruite est reliée à la concentration en enzyme (e) et à la durée de la réaction (t) par l'équation $\ln \frac{a_0}{a_t} = q \cdot (e) \cdot t$ où a_0 et a_t sont les concentrations en substrat aux temps 0 et t , q le coefficient catalytique et (e) la concentration en enzyme. En utilisant les logarithmes décimaux, et en remplaçant la concentration en substrat par le trouble (T) de la suspension, qui lui est directement proportionnel, et la concentration absolue en enzyme par une concentration relative (c), l'équation précédente devient en pratique $\log \frac{T_0}{T_t} = A \cdot c \cdot t$.

La figure 6 montre la cinétique de la staphylolyse par une actinomycétine dans le milieu phosphates-sulfate ammonique de force ionique optimale. $\log \frac{T_0}{T_t}$ est directement proportionnel à la concentration relative de l'actinomycétine. Mais les coefficients angulaires des droites s'accroissent, en fonction du temps, proportionnellement plus vite, ainsi qu'en témoignent les différentes valeurs de $\frac{1}{A}$ respectivement égales à 120 après 15 min., 92 après 30 min., 72 après 45 min., 55 après 60 min., 45 après 75 min. et 37.5 après 90 min. Pour une concentration donnée, la vitesse de réaction augmente avec le temps.

Il est cependant possible d'exprimer les résultats de telle façon que les progrès de la lyse soient liés à la concentration

$q = \frac{k_1}{(e)}$

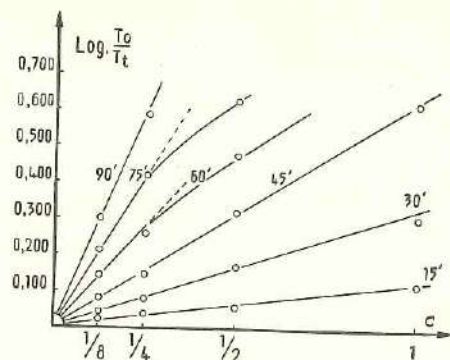


FIGURE 6. — Type usuel de la cinétique de la staphylolyse (souche H) par l'actinomycétine (orthophosphates-sulfate ammonique; force ionique optimale 0.025; pH 7).

En ordonnées : valeur de $\log T_0/T_t$ mesurée après une incubation de la durée indiquée pour chaque courbe.

En abscisses : concentration relative de l'actinomycétine.

Le phénomène s'exprime par l'équation $T_0/T_t = A. c. t.$

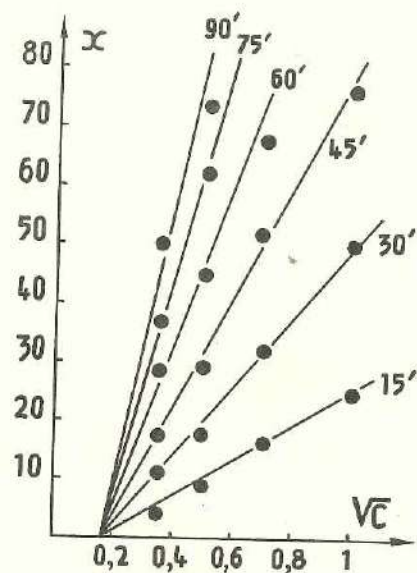


FIGURE 7. — Type usuel de la cinétique de la staphylolyse (souche H) par l'actinomycétine (orthophosphates-sulfate ammonique; force ionique optimale 0.025; pH 7). Autre représentation graphique des résultats expérimentaux de la figure 6.

En ordonnées : pourcentage du trouble disparu après une incubation de la durée indiquée pour chaque courbe.

En abscisses : racine carrée de la concentration relative de l'actinomycétine.

Le phénomène s'exprime par l'équation $x = A'. (\sqrt{c} - b). t.$

et au temps par un facteur de proportionnalité constant. Le résultat de cet artifice de calcul est montré par la figure 7 où l'on porte en ordonnées le pourcentage du trouble disparu (x) et en abscisses la racine carrée de la concentration relative en principe actif. Dans ces conditions, l'équation de la réaction est de la forme $x = A' (\sqrt{c} - b)t$ où b , qui représente la valeur de l'abscisse interceptée, est un facteur constant, indépendant de x et de t , et caractéristique de l'actinomycétine utilisée. Dans l'exemple choisi, sa valeur est de 0.16. Les différentes

valeurs de $\frac{1}{A'}$ sont respectivement égales à 0.50 après 15 min., 0.45 après 30 min., 0.48 après 45 min., 0.47 après 60 min., 0.42 après 75 min. et 0.40 après 90 min. La valeur moyenne est de 0.45.

La constante b a la signification d'une concentration. C'est la concentration minimale nécessaire pour que la lyse présente le type de cinétique décrit. Ce n'est pas, en effet, la concentration minimale pour que la lyse soit réalisable, car il est possible d'observer une faible activité lytique pour des valeurs de c , telles que \sqrt{c} soit inférieure à b .

Il est également possible d'observer, du moins dans un certain domaine, une cinétique pseudo-monomoléculaire en modifiant la composition du milieu où la staphylolyse est réalisée. La figure 8 montre la cinétique de la staphylolyse par la même actinomycétine dans un milieu où l'association phosphates-sulfate ammonique est inférieure à la concentration optimale, mais auquel on a ajouté du $MnCl_2$ (2.10^{-3} M). On retrouve alors une équation de la forme $\log \frac{T_0}{T_t} = A.c.t.$ pour laquelle

les différentes valeurs de $\frac{1}{A}$ sont respectivement égales à 83 après 30 min., 62 après 45 min., 52 après 60 min., 49 après 75 min., 45 après 90 min. et 49 après 150 min.

L'addition d'ions Mn^{++} a donc eu pour effet de stabiliser assez rapidement la vitesse de la réaction. Pendant les 45 premières minutes, la vitesse croît progressivement; ensuite, la cinétique est celle d'une réaction d'ordre 1.

Les exemples que nous venons de voir ne sont pas limitatifs, et les cinétiques sont parfois représentées par des équations

plus compliquées ainsi que nous le verrons ultérieurement. La nature de la peptone utilisée semble jouer un rôle. C'est ainsi que l'activité staphylolytique de certaines actinomycétines élaborées à partir de divers lots de peptone Wilson, s'exprime, même en présence d'ions Mn^{++} , par une équation du type $x = A' \cdot \sqrt{c \cdot t}$. On observe simplement que le facteur b est pratiquement égal à 0.

Nous avons défini une unité staphylolytique par analogie avec l'unité colilytique. Une actinomycétine titre 100 unités staphylolytiques par ml. lorsque, à 37° C., et en 6 heures, un volume de cette préparation réduit à 50 % de sa valeur primitive le trouble de 9 volumes d'une suspension de *S. aureus* H vivant, d'un trouble absolu de 0.142. Cette unité n'a pas de valeur absolue. Les titres staphylolytiques de deux actinomycétines ne peuvent en effet être comparés que si les préparations agissent conformément à un même type de cinétique.

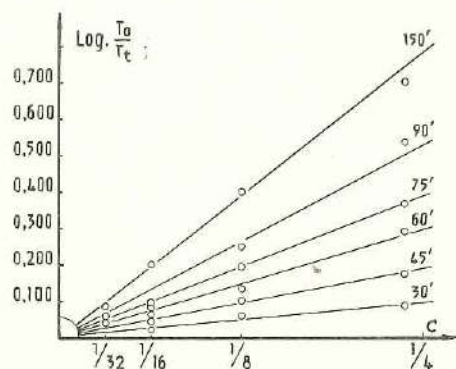


FIGURE 8. — Influence régulatrice de l'ion Mn^{++} ($2 \times 10^{-3}M$) sur la cinétique de la staphylolyse (souche H) par l'actinomycétine en milieu orthophosphates-sulfate ammonique de force ionique 0.015, inférieure à la valeur optimale (pH 7).

Même représentation que pour la figure 6.

L'actinomycétine est la même que celle utilisée pour les expériences rapportées aux figures 6 et 7.

C. — Influence de divers facteurs sur la production des activités staphylolytique et colilytique

a) Concentration en peptone

En utilisant comme base la solution minérale complète de CZAPEK, on observe que, par culture en shake flasks (5a) de *Streptomyces albus* G, l'activité staphylolytique n'apparaît que

si le milieu est enrichi par addition d'au moins 0.5 % de peptone et atteint son titre maximum pour une concentration de 1 %. Après un certain temps de latence, l'activité staphylolytique apparaît, puis augmente progressivement. Elle atteint son maximum après un temps d'incubation indépendant de la concentration en peptone. Elle diminue ensuite progressivement et disparaît de façon complète après quelques jours.

L'activité colilytique atteint également un titre maximum pour une concentration en peptone de 1 %, mais apparaît déjà pour une concentration de 0.1 %. Après avoir atteint son maximum, après un temps d'incubation différent de celui observé pour l'activité staphylolytique, elle diminue légèrement, puis se maintient longtemps inchangée.

Les activités colilytique et staphylolytique évoluent indépendamment l'une de l'autre au cours de l'incubation de *S. albus* G et ne sont apparemment liées entre elles par aucun facteur constant de proportionnalité (GHUYSEN, 1952).

b) Cations bivalents

Les cations bivalents jouent un rôle important dans la biosynthèse de nombreuses substances, soit qu'ils entrent dans la constitution même de celles-ci, le cobalt dans la vitamine B12, le cuivre, le fer et le magnésium dans les protéines métalloporphyriniques, soit qu'ils interviennent comme activateur ou inhibiteur d'un des stades de l'élaboration de la substance désirée. Nous avons donné p. 203 quelques exemples de cations qui sont des constituants essentiels de divers enzymes. ALBERT (1951) a magnifiquement passé en revue la signification des traces de métal dans la matière vivante. Les recherches sur l'influence des ions métalliques dans la biochimie microbienne sont légion. Citons, par exemple, les travaux de WEBB (1948, 1949, 1951a, b, 1953) sur le rôle du magnésium dans la division bactérienne, de GALE et MITCHELL (1949) sur l'influence des traces métalliques dans l'assimilation de l'acide glutamique par diverses espèces de bactéries, de SHANKAR et BARD (1955) sur l'effet du magnésium et du cobalt sur la croissance, la morphologie et le métabolisme de *Clostridium perfringens*, et de GORINI (1950) sur le rôle du calcium dans l'activité et la stabilité de quelques protéinases bactériennes.

Les cations métalliques se combinent à certaines molécules organiques suivant un processus particulier, dénommé chélation par MORGAN et DREW (1920), dans lequel une liaison ionique et une liaison covalentielle unissent un cation avec deux groupes distincts d'une même molécule organique. Les cations bivalents sont classés suivant la stabilité des complexes qu'ils forment avec la majorité des agents de chélation, dans un ordre déterminé appelé série de MELLOR-MALEY (1948) (voir aussi IRVING et WILLIAMS, 1948) : Cu, Ni, Co, Zn, Cd, Fe, Mn, Mg et Ca. Les antagonismes qui, dans la nature, existent entre plusieurs cations pour une même substance organique, ou entre plusieurs substances organiques pour un même cation, sont régis par les constantes de dissociations des divers complexes possibles. De nombreuses preuves expérimentales ont été données, avec parfois des conséquences pratiques intéressantes. Par exemple, l'augmentation de la production de riboflavine par *Clostridium acetobutylicum* par addition au milieu de culture de 2,2' dipyridyle, est interprétée comme la conséquence d'une diminution de la teneur en ions ferreux (HICKEY, 1945).

Nous avons examiné l'influence éventuelle de chacun des ions de la série de MELLOR-MALEY sur la production des activités staphylolytique et colilytique, lorsqu'ils sont ajoutés à des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-2} M, à un « milieu de base » dont la composition est la suivante : peptone Wilson 1 % ; KCl 7.10^{-3} M ; NaNO_3 24.10^{-3} M ; K_2HPO_4 8.10^{-3} M (GHUYSEN, 1953b).

Les ions bivalents étudiés ont été utilisés sous la forme des sels suivants : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Il convient de remarquer immédiatement que la peptone et les sels du milieu de base sont susceptibles de renfermer certains ions bivalents à l'état de trace à titre d'impuretés.

Les diverses cultures ont été incubées sur machine à agiter, à des températures constantes variant entre 27 et 38° C. Les activités colilytique et staphylolytique ont été titrées sur des échantillons dialysés ; la première, à pH 8.2 en K_2HPO_4 M/30, la seconde, à pH 7, en solution de phosphates-sulfate ammonique et MnCl_2 .

1) *Activité colilytique.* — 1) Le principe colilytique, obtenu après culture dans le milieu de base, à une température supérieure à 28° C., n'agit selon une cinétique d'ordre 1 que pour des temps de réaction d'autant plus courts que la température a été plus élevée. Lorsque celle-ci atteint 37° C., la cinétique est exprimée par l'équation $\log \frac{T_0}{T_t} = A'' \cdot \sqrt{c} \cdot t$ d'ailleurs retrouvée également, ainsi que nous le verrons, lorsque l'actinomycétine obtenue à 28° C., agit dans des solutions autres que le tampon phosphate usuel.

2) L'allure de la cinétique est d'autre part influencée par l'addition au milieu de base d'ions bivalents. Ainsi, les actinomycétines élaborées en présence de Cu^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} ou Fe^{++} , même à 28° C., donnent une cinétique anormale. Inversement, le principe obtenu en présence de Ca^{++} donne une cinétique normale, même si la température a été portée jusqu'à 32° C. En présence de Mn^{++} , Mg^{++} ou Zn^{++} , celle-ci peut être élevée, jusqu'à 36° C. environ et en présence de Co^{++} , jusqu'à 38° C., température maximale compatible avec un développement convenable du *Streptomyces*, sans que la cinétique prenne le type anormal.

3) Le rôle de protection joué par le cobalt vis-à-vis d'une élévation de la température de la culture du *Streptomyces*, peut également se manifester vis-à-vis d'autres cations bivalents qui induisent la production d'une activité colilytique anormale. Par exemple, après culture à 32° C. et en présence d'ions Mg^{++} (15.10^{-3} M) et Fe^{++} (8.10^{-7} M), l'activité colilytique obtenue est anormale. Si l'on supprime le fer ou si l'on remplace une partie du magnésium par une égale quantité de cobalt (10^{-4} M), l'activité colilytique redevient normale et, dans ce dernier cas, reste telle, même si la culture a été réalisée à 37° C.

4) Ce même effet de protection peut s'exercer vis-à-vis de substances de nature complètement différente. C'est ainsi que, par addition d'agar à la concentration de 2 p. 10 000 au milieu de base contenant l'ion Mg^{++} à la concentration de 5.10^{-4} M, on obtient, même à 27° C., une activité colilytique à cinétique anormale. Pour obtenir une cinétique normale, il suffit d'ajouter au milieu de base précité, du Co^{++} à la concentration de 10^{-4} M.

5) Que l'on utilise le milieu de base tel quel, ou enrichi en cations bivalents, isolément ou associés, l'optimum thermique correspondant à la production maximale du principe colilytique est toujours de 27 à 29° C. C'est ainsi qu'en présence de l'association $\text{Co}^{++}(10^{-4} \text{ M}) - \text{Mg}^{++}(10^{-3} \text{ M})$, le titre maximum obtenu est de 86 unités à 37° C., 240 unités à 32° C. et 430 unités à 28° C.

6) A cette température de 28° C., l'addition de certains cations au milieu de culture augmente la production du principe colilytique. Il existe une concentration optimale, comprise entre 10^{-5} et 10^{-2} M , pour chacun des cations bivalents étudiés, isolément ajoutés au milieu de base. Cette concentration optimale varie si l'on associe deux cations bivalents ou davantage (tableau VI) ou si l'on modifie la quantité des électrolytes du milieu de base (tableau VII).

7) Il est difficile de classer les cations bivalents d'après l'intensité de leur effet sur la production du principe colilytique. En effet, ce classement serait différent suivant les conditions expérimentales choisies. Il dépendrait, entre autres, de la concentration des électrolytes constitutifs du milieu de base et de la présence d'autres cations introduits dans le milieu, volontairement ou à titre d'impuretés (tableaux VI et VII). De plus,

TABLEAU VI

Influence du Mg^{++} et du Co^{++}

sur la production des activités colilytique et staphylolytique (souche H ; 28° C.)

Concentration molaire en Mg^{++}	Sans Co^{++}	$\text{Co}^{++} : 10^{-4} \text{ M}$	Sans Co^{++}	$\text{Co}^{++} : 10^{-4} \text{ M}$
	Activité colilytique en unités/ml.		Activité staphylolytique en unités/ml.	
0	240	340	200	250
10^{-4}	240	340	—	—
10^{-3}	280	430	325	750
$2.5 \cdot 10^{-3}$	380	430	900	800
$5 \cdot 10^{-3}$	430	400	800	800
10^{-2}	400	330	650	800

TABLEAU VII

Influence de la concentration des électrolytes de base et des ions Mg^{++} sur la production des activités colilytique et staphylolytique (souche H ; 28° C.)

Concentration relative des électrolytes de base	Concentration molaire en Mg^{++} (1)	Activité colilytique relative	Concentration molaire en Mg^{++} (1)	Activité staphylolytique relative
2	0	1.25	0	1.3
2	10^{-4}	1.65	10^{-3}	3.0
1	0	1.00	0	1.0
1	$5 \cdot 10^{-3}$	1.90	$2.5 \cdot 10^{-3}$	3.5
0.5	0	0.80	0	0.4
0.5	10^{-2}	1.80	10^{-2}	3.0

(1) Outre le témoin sans Mg^{++} , on n'a retenu que la concentration en Mg^{++} donnant, dans chaque cas, le rendement maximal.

la production du principe colilytique présente des irrégularités imprévisibles, attribuables, sans doute, à la présence d'impuretés dans les réactifs, peut-être aussi à des variations de la souche (7). Toutefois, l'addition de Co^{++} au milieu de base, enrichi ou non en Mg^{++} , permet d'obtenir un rendement en activité colilytique, reproductible et maximum, de 350 à 450 unités/ml.

2) *Activité staphylolytique.* — 1) Ni les variations de la température lors de la culture du *Streptomyces*, ni l'addition de cations bivalents (Zn^{++} excepté) au milieu de base, ne modifient la cinétique régissant l'activité staphylolytique qui, étant donné la nature de la peptone utilisée, est du type $x = A' \cdot \sqrt{c \cdot t}$.

2) Après culture en présence d'ions Zn^{++} , l'activité de l'actinomycétine dialysée augmente lorsque celle-ci est progressivement diluée.

3) L'optimum thermique correspondant à la production maximale du principe staphylolytique est toujours de 27 à 29° C. quel que soit le milieu choisi. C'est ainsi que, en présence de l'association $\text{Co}^{++}(10^{-4} \text{ M})$ et $\text{Mg}^{++}(10^{-3} \text{ M})$, le titre maximum

atteint. est de 200 unités à 37° C. et de 750 unités entre 32 et 27° C. En présence de l'association $\text{Co}^{++}(10^{-4} \text{ M})$ et $\text{Mg}^{++}(10^{-2} \text{ M})$, il est de 0 à 37° C., 400 unités à 32° C. et 800 unités à 23° C.

4) A l'exception de l'ion Ca^{++} , et peut-être Zn^{++} , qui n'a pas été examiné à ce point de vue, chaque cation bivalent, isolément ajouté au milieu de base à concentration convenable, peut augmenter le rendement en activité staphylolytique. Mais sa concentration optimale varie également si l'on modifie les quantités d'électrolytes de base ou si l'on associe deux cations bivalents ou davantage (tableaux VI et VII).

5) Des irrégularités, analogues à celles que nous avons signalées à propos de l'activité colilytique, ont été également observées. Il est cependant certain que l'addition d'ions Mg^{++} , en concentration appropriée, au milieu de base enrichi ou non en Co^{++} , permet d'obtenir une production régulière et maximale de principe staphylolytique, celle-ci se situant entre 750 et 950 unités/ml. ($x = A \cdot \sqrt{c \cdot t}$) après le même temps d'incubation que pour l'activité colilytique (70 heures environ).

3) *Conclusions.* — 1) L'addition au milieu de culture d'ions Co^{++} assure l'obtention d'une activité colilytique présentant une cinétique d'ordre 1. Elle est susceptible d'antagoniser les anomalies dues à une élévation de la température, à la présence de traces de certains cations (Cd^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , Cu^{++}) ou d'autres substances chimiquement non apparentées (agar) qui, en son absence, induisent l'élaboration d'une activité colilytique obéissant à une cinétique inhabituelle. De plus, seul ou en association avec Mg^{++} , l'ion Co^{++} exalte régulièrement la production du principe colilytique.

2) L'ion Mg^{++} apparaît comme un élément extrêmement favorable à la production de l'activité staphylolytique. Ce cation peut être partiellement remplacé par une quantité équivalente de cobalt sans grande modification du titre staphylolytique obtenu.

3) Les considérations précédentes expliquent la composition du milieu finalement adopté et qui est décrit dans « Matériel et Méthodes » (5, a, 1).

c) Aération

Trois cultures ont été simultanément réalisées à 28° C., en milieu peptoné, en cuves de 100 litres. Ensemencées de façon identique au moyen d'une même culture, elles ont ensuite été soumises à des conditions différentes d'aération.

Débit d'air	Pression d'air constante
0.5 vol. d'air/minute/vol. de culture	0
0.5 vol. d'air/minute/vol. de culture	1.6 kg./cm ²
0.2 vol. d'air/minute/vol. de culture	0.50 kg./cm ²

Les figures 9 et 10 montrent que le rendement des activités colilytique et staphylolytique est différemment influencé par le degré d'aération. Plus celui-ci est intense, plus la production du principe colilytique est élevée, tout au moins dans les limites expérimentales étudiées. Au contraire, la production maximale de l'activité staphylolytique est observée pour un taux moyen d'aération.

La cinétique présentée par l'activité colilytique est d'ordre 1. Le titre maximum obtenu varie entre 200 et 440 unités suivant le degré d'aération. Il est pratiquement le même avant ou après dialyse et reste longtemps inchangé lors d'un stockage à 0° C.

L'activité staphylolytique se manifeste également, dans l'expérience présente, selon une cinétique pseudomonomoléculaire, lorsque 9 volumes d'une suspension aqueuse de *S. aureus* H sont ajoutés à 1 volume d'actinomycétine non dialysée, dont les dilutions successives sont faites dans la même actinomycétine inactivée par chauffage, ou lorsque le staphylocoque est incubé dans le milieu phosphates-sulfate ammonique- MnCl_2 en présence d'actinomycétine dialysée. Toutefois, les titres staphylolytiques sont différents selon que le dosage est réalisé par l'un ou l'autre procédé. C'est ainsi que les titres des actinomycétines varient, selon l'aération, de 320 à 920 unités avant dialyse, et de 150 à 310 unités après dialyse. Cette différence s'atténue progressivement lors de la conservation aseptique des cultures, à 0° C., mycélium présent, et s'annule après trois à quatre semaines. Ce phénomène qui peut être attribué à la production d'un activateur instable et dialysable, n'est pas toujours observé. Dans certains cas, la

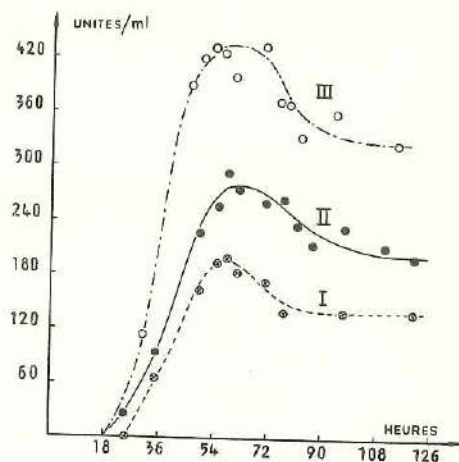


FIGURE 9. — Production de l'agent colilytique par *Streptomyces albus* G en cuves de 100 litres. Influence des conditions d'aération.

En ordonnées : unités colilytiques/ml.

En abscisses : durée d'incubation en heures.

Courbe I : 50 litres air/min. ; sans surpression.

Courbe II : 20 litres air/min. ; surpression : 0.5 kg./cm².

Courbe III : 50 litres air/min. ; surpression : 1.6 kg./cm².

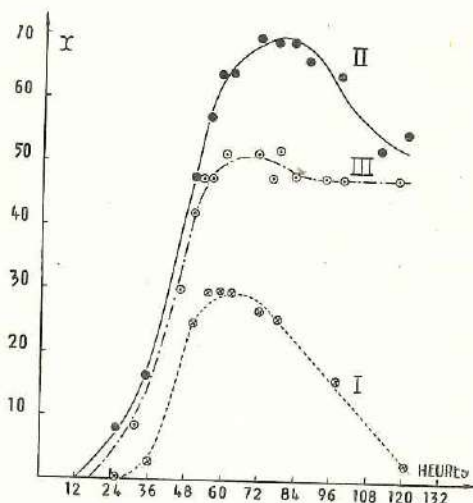


FIGURE 10. — Production de l'agent staphylolytique par *Streptomyces albus* G en cuves de 100 litres. Influence des conditions d'aération.

En ordonnées : activité staphylolytique exprimée par le pourcentage de trouble disparu, après incubation pendant 1 heure, de 9 volumes de suspension staphylococcique (souche H) et 1 volume de filtrat de culture non dialysé.

En abscisses : durée d'incubation en heures.

Débites d'air et surpressions, comme pour la figure 9.

dialyse est sans effet sur l'activité staphylolytique d'une culture fraîche.

d) Conclusions pratiques

Le tableau VIII montre l'évolution des activités lytiques de l'actinomycétine au cours d'une culture de *S. albus* G en cuve de 500 litres (5b). Les rendements sont excellents et les titres maxima sont obtenus après un temps d'incubation de 60 heures environ.

TABLEAU VIII

Evolution des activités lytiques au cours de l'incubation de *S. albus* G en cuves de 500 litres

Age de la culture en heures	% de trouble disparu pour chaque substrat					
	<i>S. aureus</i> H	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> chauffée	kératine	caséine
12	0	0	0	20	0	0
17	0	0	0	26	0	16
34	0	14	19	44	18	49
41	15	37	39	56	37	70
49	60	73	71	64	45	70
56	77	82	85	66	50	70
68	68	80	82	66	48	70
t ⁽¹⁾	150	20	60	5	90	5
v ⁽²⁾	10	10	10	10	20	25
m ⁽³⁾	eau	eau	eau	K ₂ HPO ₄ M/30	K ₂ HPO ₄ M/30	K ₂ HPO ₄ 0.05 M

Conditions de dosage :

(1) t : temps après lequel le pourcentage de trouble disparu a été déterminé, en min.

(2) v : volume en % d'actinomycétine non dialysée ajoutée à la suspension ou à la solution de substrat sensible.

(3) m : milieu dans lequel se déroule la réaction enzymatique.

D. — Quelques équations de cinétique ou épreuve d'homogénéité enzymatique

a) Notions théoriques

Un grand nombre de réactions enzymatiques se déroulent conformément à l'équation de MICHAELIS-MENTEN (1913), basée sur l'hypothèse de la formation intermédiaire d'un complexe ES entre l'enzyme E et le substrat S. Elle s'exprime par la formule $[v] = \frac{V}{\frac{K_m}{(a)} + 1}$, dans laquelle $[v]$ représente la

vitesse initiale, (a) la concentration initiale en substrat et V la vitesse maximale de la réaction, théoriquement atteinte pour une concentration infinie en substrat. K_m , dénommée constante de MICHAELIS-MENTEN, a pour valeur numérique celle de la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale. Plus la valeur de cette constante est élevée, plus l'affinité enzyme-substrat est faible.

La fonction $[v] = f(a)$ est une hyperbole équilatère (fig. 11) dont les asymptotes rectangulaires ont pour équation $[v] = V$ et $(a) = -K_m$. Les portions de l'hyperbole qui correspondent aux concentrations extrêmes en substrat, sont pratiquement assimilables à des droites.

Aux très faibles concentrations en substrat, on peut admettre $[v] = k_1(a)$. Pour une quantité donnée en enzyme, la vitesse initiale de chaque réaction est directement proportionnelle à la concentration initiale en substrat. C'est l'expression d'une réaction d'ordre I qui se caractérise par le fait qu'une fraction constante de substrat est décomposée par unité de temps.

Aux très fortes concentrations en substrat, on peut admettre $[v] = k_0$. Pour une quantité fixe d'enzyme, la vitesse initiale de la réaction est indépendante de la concentration initiale en substrat. C'est l'expression d'une réaction d'ordre zéro : une quantité constante de substrat est décomposée par unité de temps.

Les variations de cinétique présentées par les réactions enzymatiques peuvent s'interpréter par des variations dans le

degré de saturation de l'enzyme par le substrat. Selon VAN SLYKE (1942), la décomposition enzymatique d'une molécule de substrat se ferait en deux temps. La molécule de substrat est d'abord fixée par les groupes actifs libres d'une molécule d'enzyme, ensuite seulement s'opèrent la transformation du substrat et la libération des produits de la réaction. Seul, le temps requis pour la réalisation de la première partie de ce cycle dépend de la concentration en substrat. Si les molécules du substrat sont en très grand nombre, le temps pendant lequel l'enzyme est laissé non combiné est très court, et cet intervalle de « temps perdu » peut même devenir négligeable par rapport au temps nécessaire à la réalisation de la seconde phase du cycle. Dans ces conditions, l'enzyme travaille avec un rendement maximum. Une augmentation de la concentration en substrat est, dès lors, sans effet. C'est une réaction d'ordre 0.

La démonstration de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité enzymatique peut être résolue par divers procédés qui reposent sur les cinétiques présentées par les réactions.

1° Un premier procédé est une application du coefficient catalytique. Le coefficient catalytique est donné par le rapport $\frac{k_1}{(e)}$,

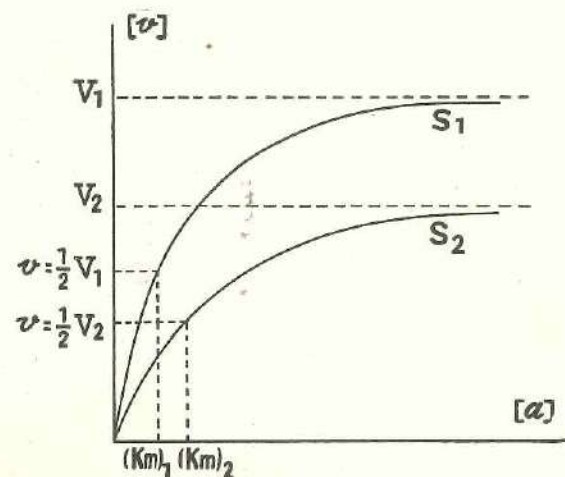


FIGURE 11. — Influence de la concentration initiale en substrat sur la vitesse initiale des réactions enzymatiques. Equation de MICHAELIS-MENTEN.

En ordonnées : vitesse initiale de réaction.

En abscisses : concentration initiale en substrat.

où k_1 est la constante de vitesse d'ordre 1 et (e) la concentration (en poids sec ou en mg. d'azote par exemple) de la préparation enzymatique utilisée.

Soit C_{S_1} et C_{S_2} les coefficients catalytiques correspondant à deux substrats S_1 et S_2 soumis, séparément, à l'action d'une même préparation enzymatique P. Si, quels que soient les procédés d'individualisation appliqués à la préparation P, fractionnement, inactivation, inhibition, dénaturation, le rapport $\frac{C_{S_1}}{C_{S_2}}$, dénommé quotient catalytique, reste inchangé, on est en droit de postuler l'homogénéité enzymatique de P. Les exemples d'application de ce procédé sont nombreux. Citons, entre autres, la caractérisation des cathepsines I, II, III et IV de la rate de bœuf par FRUTON, IRVING et BERGMANN (1941a, b).

Le même procédé est applicable si les réactions sont d'ordre 0.

Le coefficient catalytique sera remplacé par $\frac{Q}{(e)}$ où Q est la quantité de substrat détruite par unité de temps.

Il importe, toutefois, que les diverses activités de chaque « fraction » provenant de la préparation à l'étude, soient comparées entre elles sur la base d'une même cinétique de réaction.

Lorsque la préparation P n'est active que sur un seul substrat S, il est également du plus haut intérêt de déterminer les coefficients catalytiques des diverses fractions $P_1, P_2 \dots P_n$. Supposons, en effet, que ceux-ci soient déterminés en divisant k_1 par la teneur en protéines. Si les coefficients catalytiques ne sont pas identiques, c'est que la préparation P, bien qu'elle ne contienne qu'un seul enzyme, est cependant contaminée par des protéines étrangères.

2° Un deuxième procédé est basé sur l'action compétitive exercée par les deux substrats, S_1 et S_2 , lorsqu'ils sont soumis, simultanément, à l'action de la même préparation P. Soit Q_1 et Q_2 les quantités des substrats S_1 et S_2 décomposées par unité de temps sous l'action de la préparation P lorsque celle-ci agit séparément sur chacun d'eux. Et soit Q_{1+2} la quantité globale des substrats S_1 et S_2 décomposés par unité de temps par la préparation P, celle-ci agissant simultanément sur les deux substrats.

L'obtention de l'égalité $Q_{1+2} = Q_1 + Q_2$ peut signifier que la préparation P contient deux enzymes respectivement actifs sur S_1 et S_2 . Cette conclusion n'est toutefois valable que si les conditions expérimentales sont telles que l'attaque enzymatique de chaque substrat se déroule isolément suivant une réaction d'ordre 0. C'est-à-dire que l'enzyme doit être saturé par chacun des substrats individuellement.

Cette condition de saturation individuelle n'est cependant pas toujours réalisable, par exemple si la constante de MICHAELIS-MENTEN est très grande, ou si la solubilité du substrat est trop faible.

Au contraire, l'obtention de l'équation $Q_{1+2} \leq Q_1$, avec $Q_1 > Q_2$, signifie que la préparation P ne contient qu'un seul enzyme. Cette conclusion est valable quelles que soient les cinétiques de chacune des réactions enzymatiques individuelles.

Un remarquable exemple de l'application de cette méthode qui ne nécessite aucun procédé d'individualisation a été donné par ZELLER (1949) et ZELLER et UTZ (1949) pour l'analyse des cholinestérases des venins de serpents élapides.

3° Nous avons utilisé un troisième procédé basé sur les considérations suivantes.

On sait que les réactions enzymatiques peuvent être conduites de telle sorte qu'elles se déroulent suivant l'une ou l'autre des deux cinétiques : $k_1 E = \frac{2.303}{t} \log \frac{a}{a-H}$ (ordre 1) et $k_0 E = \frac{1}{t} H$ (ordre 0) où E représente la concentration en enzyme, a la concentration initiale en substrat et H la concentration des produits de la réaction au temps t.

Toutefois, l'attaque d'un substrat déterminé par plusieurs préparations enzymatiques différentes, ou l'attaque de plusieurs substrats différents par une préparation enzymatique déterminée, peuvent, quel que soit l'ordre de chacune des réactions particulières, être comparées entre elles en exprimant les cinétiques de réaction par une équation de la forme $KE = \frac{x}{t}$ où

x représente le pourcentage de substrat ayant été utilisé au cours de la réaction. En effet, si, d'une part, la concentration initiale a est la même pour chacune des réactions envisagées, x est relié

à H par un facteur de proportionnalité constant : $x = \frac{100 H}{a}$ et

on peut, dans l'équation d'une réaction d'ordre zéro, remplacer H par x en multipliant k_0 par $\frac{100}{a}$. D'autre part, x est relié à

$\log \frac{a}{a - H}$ par un facteur de proportionnalité dont la valeur diminue lorsque x ou H augmente. Cependant, si l'on ne considère que de faibles valeurs de x, représentant au maximum 25 % de la concentration initiale en substrat, on peut, dans l'équation

d'une réaction d'ordre 1, remplacer $\log \frac{a}{a - H}$ par x en multipliant k_1 par un coefficient qui, avec une approximation qu'autorisent les erreurs de mesure, peut être considéré comme étant égal à 210. Les valeurs exactes de ce coefficient sont égales à 225 pour $x = 5$ ou moins et à 200 pour $x = 25$.

Soit une préparation enzymatique P active sur les substrats S_1 et S_2 . Grâce à un procédé adéquat d'« individualisation », on obtient deux fractions P_1 et P_2 . Si c représente la concentration de chacune des fractions, x le pourcentage de substrat utilisé et t la durée de la réaction enzymatique, on peut schématiquement représenter les quatre équations de cinétique de la façon suivante :

- | | | |
|-----|-----------------|--|
| (1) | P_1 sur S_1 | $c_1 = f(x_1, t_1)$ ou $t_1 = f(c_1, x_1)$ |
| (2) | P_1 sur S_2 | $c_2 = f(x_2, t_2)$ ou $t_2 = f(c_2, x_2)$ |
| (3) | P_2 sur S_1 | $c_3 = f(x_3, t_3)$ ou $t_3 = f(c_3, x_3)$ |
| (4) | P_2 sur S_2 | $c_4 = f(x_4, t_4)$ ou $t_4 = f(c_4, x_4)$ |

Donnons à x, dans chacune des équations, une même valeur arbitraire, égale à 50 % par exemple.

L'égalité $c_1 = c_2$ peut être obtenue en donnant à t_1 et t_2 des valeurs adéquates. Si la valeur de t_1 introduite à la place de t_3 dans l'équation 3, et la valeur de t_2 introduite à la place de t_4 dans l'équation 4, permettent d'obtenir $c_3 = c_4$, c'est que les attaques de S_1 et de S_2 sont réalisées par un même enzyme ou deux enzymes indissociables par le procédé de fractionnement utilisé.

L'égalité $t_1 = t_3$ peut être obtenue en donnant à c_1 et c_3

des valeurs adéquates. Si la valeur de c_1 introduite à la place de c_3 dans l'équation 2, et la valeur de c_3 introduite à la place de c_4 dans l'équation 4 permettent d'obtenir $t_2 = t_4$, on est également en droit de conclure, sous la même réserve que ci-dessus, à l'homogénéité enzymatique de P.

L'application de ce procédé est générale. Elle est valable quelles que soient les cinétiques des diverses réactions et les conditions physico-chimiques dans lesquelles celles-ci se sont déroulées.

b) Application pratique

Soit trois préparations distinctes d'actinomycétine N_1 , N_2 et A. N_1 et N_2 ont été préparées selon la technique habituelle, (5, n, 1) mais récoltées après des temps d'incubation différents. A a été préparée dans un milieu dépourvu de cobalt et à 34° C. Ces trois actinomycétines ont été concentrées (8) et dialysées.

L'activité lytique a été recherchée sur les substrats suivants : *S. aureus* H vivant, *S. aureus* H chauffé, *S. aureus* H chauffé puis abandonné en suspension aqueuse épaisse pendant quatre mois à 2° C., *E. coli* chauffée. Elle a été exprimée sous forme de pourcentage du trouble disparu x. Le trouble initial était identique dans chaque cas et a été posé arbitrairement égal à 100.

1) *Influence du pH.* — Les activités des préparations N_1 , N_2 et A ont été déterminées à pH 8.2 (K_2HPO_4 M/30) sur *E. coli* chauffée, et à pH 7 (phosphates-sulfate ammonique; μ optimal 0.025) sur *E. coli* chauffée et les divers substrats staphylococciques.

Les cinétiques de réaction sont rassemblées dans le tableau IX.

1) L'actinomycétine A présente, à pH 8.2, un type d'activité colilytique anormal (équation 3).

2) Le facteur b qui intervient dans la cinétique de la lyse par les actinomycétines N_1 et A de *S. aureus* vivant (équation 13 et 15), est indépendant de t et de x. Il se retrouve avec la même valeur lors de la lyse de *S. aureus* chauffé et non vieilli par séjour de plusieurs mois en glacière (équations 10 et 12). Toutefois, il disparaît de l'équation de cinétique lorsque le substrat staphylococcique chauffé est vieux de plusieurs mois (équations 7, 8, 9).

Substrat et pH	Préparation d'actinomycétine utilisée	Equation représentant la cinétique de la lyse
<i>E. coli</i> chauffée pH 8.2	N ₁	$c = \frac{0.008}{t} \cdot x$ (1)
	N ₂	$c = \frac{0.037}{t} \cdot x$ (2)
	A	$\sqrt{c} = \frac{0.023}{\sqrt{t}} \cdot x$ (3)
<i>E. coli</i> chauffée pH 7 μ 0.025	N ₁	$\sqrt{c} = \frac{0.0111}{\sqrt{t}} \cdot x$ (4)
	N ₂	$\sqrt{c} = \frac{0.0214}{\sqrt{t}} \cdot x$ (5)
	A	$\sqrt{c} = \frac{0.020}{\sqrt{t}} \cdot x$ (6)
<i>S. aureus</i> H chauffé et vieilli pH 7 μ 0.025	N ₁	$\sqrt{c} = \frac{0.0192}{\sqrt{t}} \cdot x$ (7)
	N ₂	$\sqrt{c} = \frac{0.0365}{\sqrt{t}} \cdot x$ (8)
	A	$\sqrt{c} = \frac{0.035}{\sqrt{t}} \cdot x$ (9)
<i>S. aureus</i> H chauffé, frais pH 7 μ 0.025	N ₁	$\sqrt{c} = \frac{0.160}{t} \cdot x + 0.10$ (10)
	N ₂	$\sqrt{c} = \frac{0.049}{\sqrt{t}} \cdot x + \frac{\log \frac{1000}{t} - 1.3}{0.75}$ (11)
	A	$\sqrt{c} = \frac{0.312}{t} \cdot x + 0.10$ (12)
<i>S. aureus</i> H vivant pH 7 μ 0.025	N ₁	$\sqrt{c} = \frac{1.78}{t} \cdot x + 0.10$ (13)
	N ₂	$\sqrt{c} = \frac{0.695}{\sqrt{t}} \cdot x + \frac{\log \frac{1000}{t} - 1.3}{0.75}$ (14)
	A	$\sqrt{c} = \frac{2.00}{t} \cdot x + 0.10$ (15)

3) L'actinomycétine N₂ est très peu active sur le staphylocoque fraîchement récolté, qu'il ait subi ou non un chauffage préalable. Dans ce cas, b n'est plus une constante; il diminue lorsque t augmente (équations 11 et 14, figures 12 et 13).

4) Annulons les valeurs de b dans les équations 10, 11 et 12. Les équations 1, 4, 7, 10, relatives à la préparation N₁ peuvent être résolues, pour x = 50, par exemple, de façon à obtenir une même valeur de c. Il suffit de donner à t les valeurs de 20, 14, 43 et 60 respectivement. Remplaçons t des équations 2 et 3 par 20, des équations 5 et 6 par 14, des équations 8 et 9 par 43 et des équations 11 et 12 par 60. Le tableau X montre que, dans ces conditions, on obtient une valeur de c caractéristique de la préparation utilisée et indépendante du substrat.

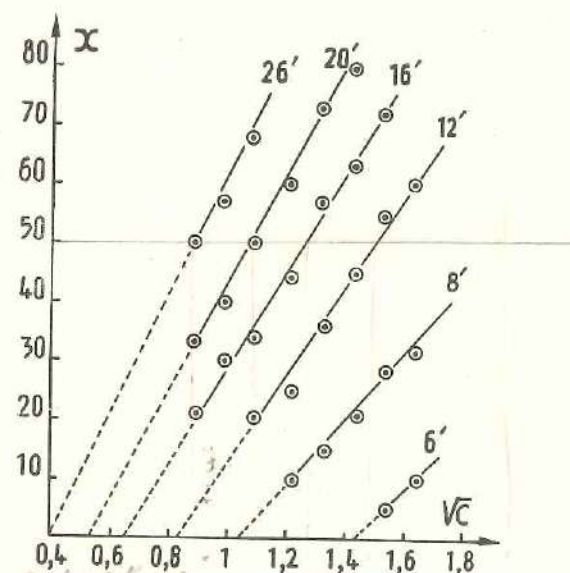


FIGURE 12. — Cinétique de la staphylolyse (souche H) de bactéries fraîchement récoltées puis chauffées, par la préparation d'actinomycétine N₂ (orthophosphates-sulfate ammonique; force ionique optimale 0.025).

En ordonnées : pourcentage de trouble disparu après une incubation de la durée indiquée pour chaque courbe.

En abscisses : racine carrée de la concentration relative en enzyme.

Pour chaque courbe, on calcule, par extrapolation, la constante b : valeur de \sqrt{c} pour x = 0.

Ce résultat montre que la lyse d'*E. coli* chauffée (pH 8.2 ou 7) et de *S. aureus*, chauffé puis abandonné plusieurs mois en glacière, est réalisée par un seul et même principe : le principe colilytique.

Celui-ci est également responsable de la lyse de *S. aureus* soumis à l'action de l'actinomycétine immédiatement après avoir été récolté et chauffé. Toutefois, on remarque l'introduction dans l'équation de cinétique d'un facteur supplémentaire b que l'on retrouve lors de la lyse de *S. aureus* vivant.

5) Si, après avoir annulé les valeurs de b, on remplace les valeurs de c dans les équations 13, 14, 15 respectivement par 0.0205, 0.090 et 0.068 (voir tableau X), on obtient, pour $x = 50$, les valeurs de t du tableau XI.

Cette discordance montre que la lyse de *S. aureus* vivant ne peut être attribuée au principe colilytique. Le second principe ainsi mis en évidence est désigné sous le nom de principe staphylolytique.

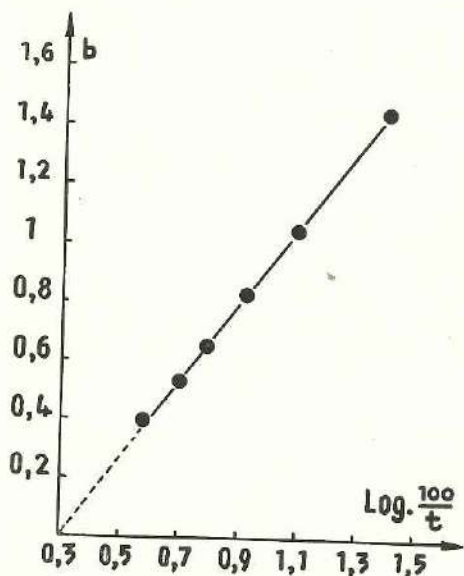


FIGURE 13. — Variation de la constante b selon la durée de l'incubation lors de la lyse de staphylocoques (souche H) fraîchement récoltée, puis chauffée, par la préparation d'actinomycétine N2.

En ordonnées : valeur de la constante b.

En abscisses : $\log \frac{100}{t}$ où t est le temps d'incubation en minutes.

TABLEAU X
Première épreuve d'homogénéité enzymatique appliquée au principe colilytique.
Base : variation du pH

Substrat et pH	Préparation d'actinomycétine utilisée						Temps en minutes
	N ₁		N ₂		A		
	Equation (1)	c (2)	Equation (1)	c (2)	Equation (1)	c (2)	
<i>E. coli</i> chauffée, pH 8.2	1	0.020	2	0.0925	3	0.0635	20
<i>E. coli</i> chauffée, pH 7	4	0.023	5	0.090	6	0.070	14
<i>S. aureus</i> H, chauffé et vieilli, pH 7	7	0.021	8	0.076	9	0.070	43
<i>S. aureus</i> H chauffé, frais, pH 7	10	0.018	11	0.102	12	0.068	60
Valeur moyenne de c		0.0205		0.090		0.068	

(1) Voir tableau IX.

(2) Valeur calculée de c qui résout l'équation correspondante, pour $x = 50$, t ayant la valeur indiquée dans la dernière colonne.

TABLEAU XI

Première épreuve d'homogénéité enzymatique appliquée au principe staphylolytique. Base : variation du pH

Préparation d'actinomycétine	Equation (1)	c (2)	t (3)
N ₁	13	0.0205	635
N ₂	14	0.090	13.000
A	15	0.068	385

(1) Voir tableau IX.

(2) Voir tableau X.

(3) Valeur calculée de t, en minutes, qui résout l'équation correspondante, pour x = 50, c ayant la valeur indiquée dans la troisième colonne.

2) Influence de la force ionique. — Nous avons également calculé les équations de cinétique lors de la lyse des divers substrats, à pH 7, par l'actinomycétine N₁, dans des conditions variables de force ionique (concentration fixe en orthophosphates correspondant à une force ionique de 0.0014 et concentration variable en sulfate ammonique).

Les résultats sont consignés dans le tableau XII.

1) L'augmentation du rapport $R = \frac{c \cdot t}{x}$ dans les équations 17 et 18 montre que la lyse de *E. coli* chauffée est légèrement inhibée par augmentation de la force ionique de 0.025 à 0.10. Lorsque la force ionique est diminuée de 0.025 à 0.007, x devient proportionnel à la racine quatrième de c (équation 16).

2) L'influence de la force ionique sur la lyse de *S. aureus* chauffé se traduit par des variations du rapport R et de la constante b. La valeur de cette dernière est minimale à force ionique optimale (équation 19, 20, 21). Le rapport R augmente lorsque la force ionique passe de 0.025 à 0.100 (équation 20 et 21). A la force ionique de 0.007, x est relié à c par une fonction où 1/t intervient en exposant (équation 19) (figures 14 et 15).

TABLEAU XII

Influence de la force ionique (pH 7) sur la cinétique de la lyse par l'actinomycétine N₁

Substrat	Force ionique	Equation représentant la cinétique de la lyse
<i>E. coli</i> chauffée	0.007	$\sqrt[4]{c} = \frac{0.025}{\sqrt{t}} \cdot x$ (16)
	0.025	$\sqrt{c} = \frac{0.012}{\sqrt{t}} \cdot x$ (17)
	0.100	$\sqrt{c} = \frac{0.017}{\sqrt{t}} \cdot x$ (18)
<i>S. aureus</i> H chauffé, frais	0.007	$\sqrt{c} = \frac{10^{\left(\frac{9.25}{t} + 1.06\right)}}{10\ 000} \cdot x + 0.15$ (19)
	0.025	$\sqrt{c} = \frac{0.128}{t} \cdot x + 0.10$ (20)
	0.100	$\sqrt{c} = \frac{0.165}{t} \cdot x + 0.20$ (21)
<i>S. aureus</i> H vivant	0.007	$\sqrt{c} = \frac{1.28}{t} \cdot x + 0.15$ (22)
	0.025	$\sqrt{c} = \frac{1.78}{t} \cdot x + 0.10$ (23)
	0.100	$\sqrt{c} = \frac{7.75}{t} \cdot x + 0.20$ (24)

3) Annulons les valeurs de b dans les équations 19, 20 et 21. Les équations 16 et 19, correspondant à la force ionique 0.007, peuvent être résolues, pour x = 50, de façon à obtenir une même valeur de c. Il suffit de donner à t les valeurs de 18 et 44 respectivement. Remplaçons t des équations 17 et 18 par 18 et des équations 20 et 21 par 44, le tableau XIII montre que, dans ces conditions, on obtient une valeur de c caractéristique de la force ionique du milieu et indépendante du substrat.

Des modifications apportées à la force ionique du milieu

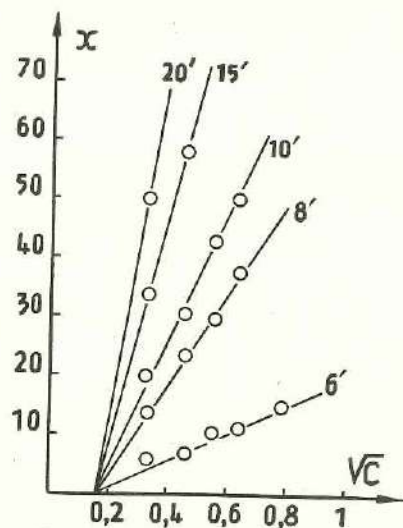


FIGURE 14. — Cinétique de la staphylolyse (souche H) de bactéries fraîchement récoltées puis chauffées, par la préparation d'actinomycétine N1 (orthophosphates-sulfate ammonique; force ionique 0.007, inférieure à la valeur optimale; pH 7.0).

En ordonnées : pourcentage de trouble disparu après une incubation de la durée indiquée pour chaque courbe.

En abscisses : racine carrée de la concentration relative en enzyme.

Pour chaque courbe, on calcule la valeur du rapport $R' = \frac{\sqrt{c} - 0.15}{x}$.

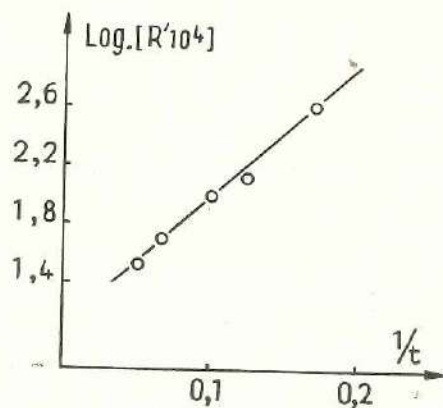


FIGURE 15. — Variation du rapport R' selon la durée de l'incubation lors de la lyse de staphylocoques (souche H) fraîchement récoltés puis chauffés, par la préparation d'actinomycétine N1, en milieu de force ionique 0.007.

En ordonnées : $\log (R' \cdot 10^4)$.

En abscisses : temps d'incubation en minutes⁻¹.

TABLEAU XIII

Deuxième épreuve d'homogénéité enzymatique
appliquée au principe colilytique
Base : variation de force ionique

Substrat	Force ionique						Temps en minutes
	0.007		0.025		0.100		
	Equation (1)	c (2)	Equation (1)	c (2)	Equation (1)	c (2)	
<i>E. coli</i> chauffée	16	0.0081	17	0.0196	18	0.040	18
<i>S. aureus</i> H chauffé	19	0.0086	20	0.0225	21	0.036	44
Valeur moyenne de c		0.0083		0.0210		0.038	—

(1) Voir tableau XII.

(2) Valeur calculée de c qui résout l'équation correspondante, pour $x = 50$, t ayant la valeur indiquée dans la dernière colonne.

influencent donc d'une façon identique la lyse d'*E. coli* et de *S. aureus* chauffés.

Ce résultat confirme à nouveau l'intervention du même principe, colilytique, dans la digestion de ces deux substrats.

4) L'influence de la force ionique sur la lyse de *S. aureus* vivant se traduit également par des modifications de R et de b (équations 22, 23, 24 du tableau XII). Les variations de b sont identiques à celles observées lors de la lyse de *S. aureus* chauffé. Les valeurs de R, au contraire, augmentent régulièrement lorsque la force ionique passe de 0.007 à 0.100.

Si, après avoir annulé les valeurs de b, c est remplacé dans les équations 22, 23 et 24, respectivement par 0.0083, 0.021 et

0.038 (tableau XIII), on obtient, pour $x = 50$, les valeurs de t du tableau XIV.

La discordance observée aux deux forces ioniques supérieures montre à nouveau que la lyse de *S. aureus* vivant est réalisée par un principe spécifique, le principe staphylolytique, dont l'activité est plus fortement influencée que celle du principe colilytique par l'augmentation de la force ionique.

TABLEAU XIV

Deuxième épreuve d'homogénéité enzymatique
appliquée au principe staphylolytique.
Base : variation de force ionique

Force ionique	Equation (¹)	c (²)	t (³)
0.007	22	0.0083	700
0.026	23	0.0210	610
0.100	24	0.038	2000

(¹) Voir tableau XII.

(²) Voir tableau XIII.

(³) Valeur calculée de t en minutes, qui résout l'équation correspondante, pour $x = 50$, c ayant la valeur indiquée dans la troisième colonne.

3) *Influence de l'ion Mn⁺⁺*. — Nous avons enfin calculé les équations de cinétique lorsque la lyse des divers substrats microbiens est réalisée à pH 7, par les actinomycétines N_1 et N_2 , dans des conditions variables de force ionique (quantité fixe en orthophosphates donnant une force ionique de 0.0014 et quantités variables en sulfate ammonique) et de concentration en ions Mn^{++} .

Les résultats sont consignés dans le tableau XV.

1) La comparaison des équations 16 (tableau XII) et 25 confirment l'inhibition du principe colilytique par l'ion Mn^{++} .

2) L'addition d'ions Mn^{++} au milieu fait pratiquement disparaître le terme b , des équations de cinétique relatives à la lyse de *S. aureus* vivant ou chauffé.

TABLEAU XV

Influence de l'ion Mn^{++} sur la cinétique de la lyse
par les actinomycétines N_1 et N_2

Préparation d'actino- mycétine utilisée	Substrat	Force ionique	Concen- tration en ions Mn^{++} (10^{-3} M)	Equation représentant la cinétique de la lyse
N_1	<i>E. coli</i> chauffée	0.007	2	$\sqrt[4]{c} = \frac{0.042}{\sqrt{t}}$ (25)
	<i>S. aureus</i> H chauffé	0.007	2	$\sqrt{c} = \frac{0.134}{t} \cdot x$ (26)
		0.014	2	$\sqrt{c} = \frac{0.136}{t} \cdot x$ (27)
		0.025	4	$\sqrt{c} = \frac{0.144}{t} \cdot x$ (28)
	<i>S. aureus</i> H vivant	0.014	2	$\sqrt{c} = \frac{2.28}{t} \cdot x$ (29)
		0.025	4	$\sqrt[4]{c} = \frac{6.2}{t} \cdot x$ (30)
N_2	<i>S. aureus</i> H chauffé	0.014	2	$\sqrt{c} = \frac{0.3}{t} \cdot x$ (31)
	<i>S. aureus</i> H vivant	0.014	2	$\sqrt{c} = \frac{6.6}{t} \cdot x$ (32)

3) Nous avons vu qu'il suffit de donner à t les valeurs respectives de 18 et 14 pour que, à force ionique 0.007, les équations 16 et 19 relatives à la lyse par N_1 d'*E. coli* et *S. aureus* chauffés soient résolues, pour $x = 50$ et une même valeur de c égale à 0.0083 (tableau XIII). Si, dans les équations 25 et 26, on remplace t par ces mêmes valeurs 18 et 44, les valeurs de c ,

TABLEAU XVI

Troisième épreuve d'homogénéité enzymatique
appliquée au principe colilytique.
Base : addition d'ions Mn^{++} (milieu de pH 7, μ 0.007)

Substrat	Concentration en ions Mn^{++}				Temps en minutes ⁽⁴⁾
	0		2.10^{-3} M		
	Equation ⁽¹⁾	c ⁽²⁾	Equation ⁽³⁾	c	
<i>E. coli</i> chauffée	16	0.0081	25	0.0625	18
<i>S. aureus</i> H chauffé	19	0.0086	26	0.0225	44

⁽¹⁾ Voir tableau XII.

⁽²⁾ Voir tableau XIII.

⁽³⁾ Voir tableau XV.

⁽⁴⁾ Valeurs calculées de t en minutes qui permettent de résoudre les équations 16 et 19 obtenues en l'absence d'ions Mn^{++} , pour $x = 50$ et $c = 0.0083$.

pour $x = 50$, sont respectivement égales à 0.0625 et 0.0225 (tableau XVI). Puisque l'ion Mn^{++} inhibe le principe colilytique, les observations impliquent nécessairement qu'il active un autre principe, actif sur *S. aureus* chauffé.

4) Ce principe actif sur *S. aureus* chauffé et activable par l'ion Mn^{++} est-il identique au principe staphylolytique ?

Les équations 27 et 29 peuvent être résolues, pour $x = 50$, de façon à obtenir une même valeur de c. Il suffit de donner à t les valeurs de 44 et 835 respectivement. Remplaçons t par 44 dans les équations 28 et 31, et par 835 dans les équations 30 et 32 ; on obtient une valeur de c caractéristique de l'actinomycétine utilisée et des conditions physico-chimiques du milieu, et indépendante de la nature du substrat microbien (tableau XVII).

TABLEAU XVII
Troisième épreuve d'homogénéité enzymatique appliquée au principe staphylolytique
Base : addition d'ions Mn^{++}

Substrat	Préparation d'actinomycétine utilisée				Temps en minutes								
	N_1		N_2										
	Force ionique et concentration en ions Mn^{++}												
<i>S. aureus</i> H chauffé	$\mu : 0.014$ $Mn^{++} : 2.10^{-3}$ M	Equation ⁽¹⁾	c ⁽²⁾	$\mu : 0.014$ $Mn^{++} : 2.10^{-3}$ M	Equation ⁽¹⁾	c ⁽²⁾	27	0.0225	28	0.0269	31	0.116	44
								29	0.0185	30	0.0188	32	0.156
Valeur moyenne de c	0.0205				0.0228				0.136				

⁽¹⁾ Voir tableau XV.

⁽²⁾ Valeur calculée de c qui résout l'équation correspondante pour $x = 50$, t ayant la valeur indiquée dans la dernière colonne.

On voit que, après addition d'ions Mn^{++} au milieu, le principe staphylolytique assure, au moins en ordre principal, la lyse de *S. aureus* vivant ou chauffé.

d) *Conclusions* :

1) La lyse d'*E. coli* chauffée et celle de *S. aureus* vivant sont attribuables à deux principes distincts.

2) *S. aureus* chauffé est sensible aux deux principes lytiques. En l'absence d'ions Mn^{++} , le principe colilytique assure pratiquement à lui seul la digestion de ce substrat. La lyse de *S. aureus* chauffé reste cependant sous la dépendance d'un phénomène supplémentaire qui se traduit par l'introduction, dans les équations de cinétique, d'un terme additionnel b que l'on retrouve, avec une valeur identique, lors de la lyse de *S. aureus* vivant. Après inhibition du principe colilytique par l'ion Mn^{++} , l'intervention du principe staphylolytique dans la lyse de *S. aureus* chauffé peut être clairement mise en évidence.

3) Après un vieillissement prolongé en glacière, les suspensions de *S. aureus* chauffé se comportent comme celles d'*E. coli* chauffée.

E. — Adsorption des principes colilytique et staphylolytique sur substrat microbien

a) *Etude du phénomène* (9) (GHUYSEN, 1953a, 1954b)

E. coli et *S. aureus* adsorbent l'un et l'autre l'activité colilytique comme l'activité staphylolytique. L'adsorption peut cependant n'être efficacement réalisée qu'à faible force ionique. A pH 7.3, en tampon orthophosphates, l'adsorption du principe colilytique est indépendante de la force ionique, entre 0.01 et 0.28, pour autant qu'on utilise une grande quantité de corps microbiens (1,5 %). Au contraire, dans les mêmes conditions, l'adsorption du principe staphylolytique, appréciable à force ionique très faible, est pratiquement nulle à μ 0.28. C'est pour cette raison que les isothermes d'adsorption de la figure 16 ont été obtenus à μ 0.02 (pH 7.3). De même, les résultats des trois adsorptions successives des figures 17 et 18 ont été obtenus à μ 0,05 environ.

Ces expériences d'adsorption en masse (9a) nous permettent de tirer les conclusions suivantes.

1) Contrairement aux résultats rapportés par TAI et VAN HEYNINGEN (1951), à propos de l'adsorption de l'activité colilytique par *E. coli*, les corps microbiens vivants présentent un pouvoir d'adsorption non négligeable, mais cependant plus faible qu'après un chauffage de 3 min. à 100° C. (figure 16).

2) L'adsorption des deux types d'activité est optimale pour un pH voisin de 9 (figures 17 et 18).

3) Chaque substrat présente une capacité d'adsorption plus grande pour le principe lytique homologue et atteint un état

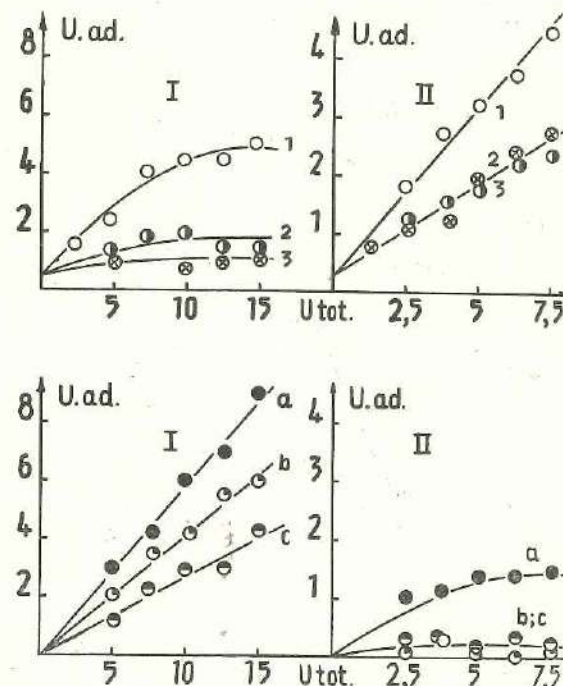


FIGURE 16. — Adsorption des activités staphylolytique (souche H; I) et colilytique (II) de l'actinomycétine par les corps bactériens.

En ordonnées : nombre d'unités $\times 10^8$ absorbées.

En abscisses : nombre d'unités $\times 10^8$ initialement présentes.

Courbes 1 : adsorption par *E. coli* chauffée, 0.3 % en poids; 2 : par *E. coli* chauffée, 0.04 %; 3 : par *E. coli* vivante, 0.16 %.

Courbes a : adsorption par *S. aureus* H chauffé, 0.3 % en poids; b : par *S. aureus* chauffé, 0.04 %; c : par *S. aureus* vivant, 0.04 %.

proche de la saturation avec une moindre quantité de principe hétérologue (figures 16, 17, 18). En utilisant des actinomycétines possédant des rapports activité colilytique/activité staphylo-lytique différents, on constate que, plus le titre colilytique est élevé, plus l'adsorption du principe staphylo-lytique par *E. coli* est faible. Cette observation, illustrée également par les expériences d'adsorptions successives, montre qu'en réalité, le principe colilytique est préférentiellement adsorbé sur le substrat homologue. Il en est de même également du principe staphylo-lytique.

Nous avons étudié le mécanisme de cette adsorption de façon plus précise et, dans ce but, une actinomycétine titrant 1.320 unités colilytiques et 530 unités staphylo-lytiques ($x = A' \cdot \sqrt{c \cdot t}$) a été chromatographiée sur des colonnes dont l'ad-

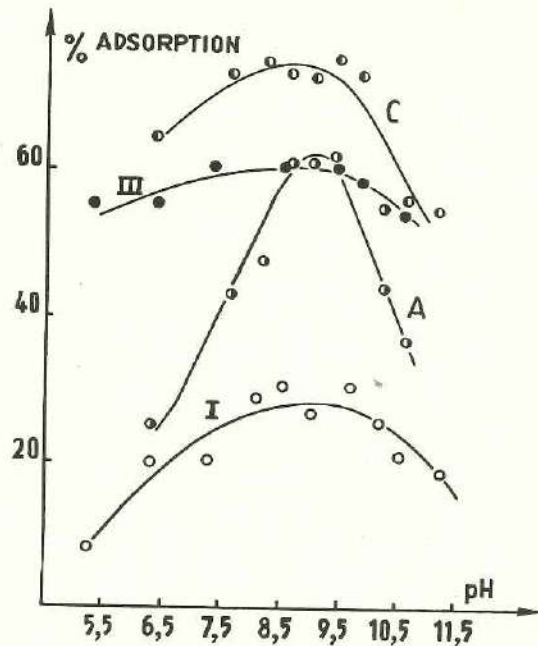


FIGURE 17. — Influence du pH sur l'adsorption des activités colilytique (courbes I et III) et staphylo-lytique (souche H, courbes A et C) de l'actinomycétine par *S. aureus* H chauffé (0,3 % en poids sec) à force ionique 0,05.

En ordonnées : pourcentage d'activité lytique adsorbée.

En abscisses : pH.

Courbes I et A : mesures faites après une adsorption ; courbes III et C : après 3 adsorptions successives.

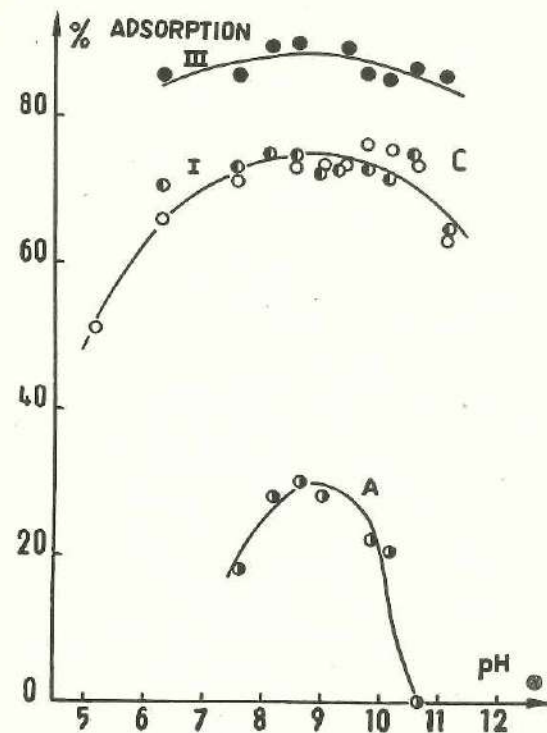


FIGURE 18. — Influence du pH sur l'adsorption des activités colilytique (courbes I et III) et staphylo-lytique (souche H, courbes A et C) de l'actinomycétine par *E. coli* chauffée (0,3 % en poids sec) à force ionique 0,05.

Même représentation que pour la figure 17.

sorbant est constitué par des corps microbiens chauffés et fixés sur un support inerte (9b). A partir des titres lytiques de chacune des fractions successivement recueillies après passage au travers de la colonne, nous avons calculé les isothermes d'adsorption des figures 19 et 20.

1) Que l'adsorbant soit *E. coli*, *S. aureus* H ou un mélange de ces deux germes (figure 19), l'équation d'adsorption du principe colilytique est de la forme $q = k \cdot c^n$, où l'exposant n , qui traduit l'état de saturation de l'adsorbant, est supérieur à l'unité (1,145) et indépendant de la nature du substrat. La plus grande efficacité d'absorption que manifeste *E. coli* se traduit uniquement par une valeur plus élevée du coefficient k . Celui-ci est égal à 0,204 avec *E. coli*, 0,076 avec *S. aureus* H,

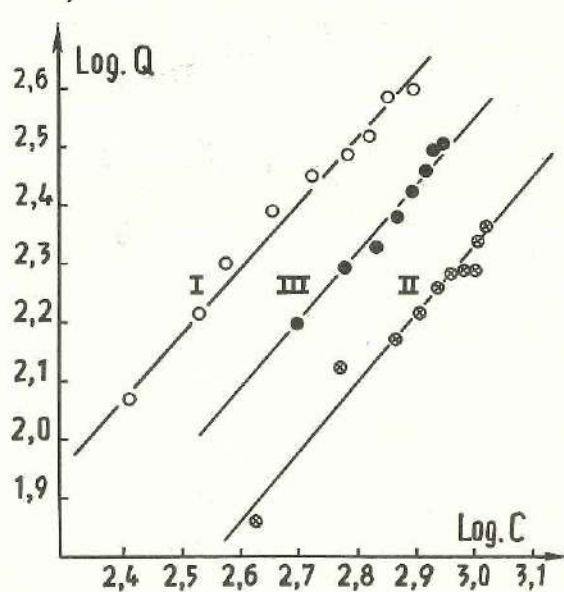


FIGURE 19. — Isothermes d'adsorption de l'activité colilytique par des colonnes de corps microbiens.

En ordonnées : log nombre d'unités adsorbées par mg. d'adsorbant.

En abscisses : log nombre d'unités/ml. de la phase liquide en équilibre avec l'adsorbant.

Adsorbants : *E. coli* chauffée (courbe I), *S. aureus* H chauffé (courbe II), mélange à parties égales des deux germes (courbes III).

0.126 avec le mélange des deux bactéries. Ces valeurs montrent que 1 mg. d'*E. coli* possède la même capacité d'adsorption pour le principe colilytique que 3 mg. environ de staphylocoques.

2) Les caractères de l'adsorption du principe staphylolytique (figure 20) varient, par contre, selon la nature de l'adsorbant utilisé.

Avec les staphylocoques, son adsorption est particulièrement intense, à tel point que sa concentration dans la phase liquide diminue au fur et à mesure que des volumes croissants d'actinomycétine traversent la colonne, au moins dans les limites de concentrations étudiées.

Au contraire, avec *E. coli*, une faible quantité seulement de principe staphylolytique est initialement adsorbée, en même temps que le principe colilytique ; mais il est ensuite élué,

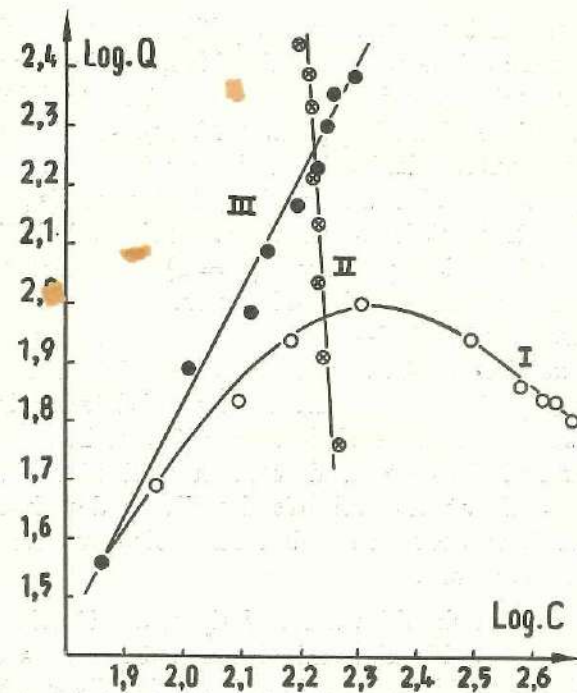


FIGURE 20. — Isothermes d'adsorption de l'activité staphylolytique (souche H) par des colonnes de corps microbiens.

Même représentation que pour la figure 19.

ce qui traduit l'existence d'une adsorption typiquement préférentielle du principe homologue.

Quant au pouvoir adsorbant du mélange des deux germes, il est compris entre ceux des deux substrats isolément considérés.

3) Une plus grande dispersion des staphylocoques sur le support (rapport pondéral de 1 p. 1000 au lieu de 1 p. 100) augmente leur capacité d'adsorption. Dans le cas du principe staphylolytique, les constantes k et n dépendent du taux de dispersion ; au contraire, dans le cas du principe colilytique, le coefficient k est seul affecté.

b) Application pratique

Les observations précédentes confirment évidemment l'individualité des principes colilytique et staphylolytique. Elles permettent de plus d'imaginer un procédé rapide et efficace de concentration et de purification.

Il est en effet possible, par équilibrages successifs à 0° C., de fixer sur un même substrat microbien, préalablement chauffé 3 min. à 100° C., les activités colilytique et staphylolytique avec un rendement de 75 à 90 % (figures 17, 18). Lors de cette opération, les substances colorées de l'actinomycétine ne sont pratiquement pas adsorbées. Par ailleurs, les principes actifs peuvent être désorbés en traitant les substrats microbiens, à 0° C., par des solutions de force ionique élevée ($\mu = 1$) obtenues par addition de NaCl à des tampons de pH divers.

Nous avons réalisé des adsorptions successives sur *E. coli* et *S. aureus* H chauffés. Chaque substrat a été ensuite divisé en différents aliquots dont on a désorbé les activités par des volumes égaux d'une solution de NaCl M à pH variable.

Les particularités de la désorption sont résumées dans le tableau XVIII, où les activités des divers désorbats dialysés sont exprimés en pourcentage du trouble disparu après un temps de réaction constant.

1) Incolores et limpides avant dialyse, les désorbats dialysés présentent un trouble d'autant plus accentué que la désorption a été réalisée en milieu plus acide. Ce trouble disparaît d'ailleurs par addition d'électrolytes. Après désorption en milieu neutre ou alcalin, les désorbats restent limpides après dialyse.

2) L'activité colilytique du désorbat est la même que la désorption ait été faite à pH 3.5 ou à pH 10.6. Par contre, l'activité staphylolytique désorbée n'est appréciable que si l'opération est effectuée en milieu neutre ou alcalin.

3) Ce procédé de purification n'est toutefois pas applicable tel quel. En effet, le produit concentré ainsi obtenu présente un spectre ultra-violet caractéristique des acides nucléiques, avec une intense absorption à 258 m μ . De plus, si on soumet une suspension microbienne chauffée aux diverses opérations de lavage et d'éluion, sans adsorption préalable des principes lytiques de l'actinomycétine, on obtient un produit, évidemment dépourvu des activités enzymatiques caractéristiques de l'actinomycétine, mais avec un rendement pondéral pratiquement égal à celui que l'on obtient lors des essais de purification eux-mêmes.

Il convient donc d'utiliser la plus faible quantité possible de substrat microbien, et de développer au maximum la capacité d'adsorption de celui-ci. Dans ce but, les actinomycétines doivent être suffisamment concentrées et adsorbées sur des colonnes staphylococciques pour lesquelles la quantité de bactéries et leur taux de dispersion sur le support ont été choisis judicieusement. De plus, le staphylocoque, préalablement à sa fixation sur le support, n'est chauffé qu'à 75° C. pendant 15 min. Ce chauffage, tout en n'altérant pas la capacité d'adsorption,

TABLEAU XVIII

Influence du pH sur l'éluion des activités colilytique et staphylolytique adsorbées par *E. coli* ou *S. aureus* H chauffés

Nature de l'adsorbant	Nature de l'éluant		Aspect de l'éluat dialysé	Activité lytique ⁽¹⁾ de l'éluat dialysé sur	
	pH	Composition		<i>E. coli</i> chauffée	<i>S. aureus</i> H vivant
<i>E. coli</i>	3.5	NaAc-HAc-NaCl	Trouble	53	5
	4.5	<i>Idem</i>	Trouble	50	13
	5.5	K ₂ HPO ₄ ⁻ KH ₂ PO ₄ ⁻ NaCl	Louche	50	36
	6.3	<i>Idem</i>	Louche	54	44
<i>S. aureus</i> H	3.5	NaAc-HAc-NaCl	Trouble	47	4
	5.5	K ₂ HPO ₄ ⁻ KH ₂ PO ₄ ⁻ NaCl	Louche	45	18
	7.7	<i>Idem</i>	Limpide	45	60
	9.8	NaOH-glycine-NaCl	<i>Idem</i>	45	64
	10.6	<i>Idem</i>	<i>Idem</i>	48	56

⁽¹⁾ Exprimée en pourcentage de trouble disparu après 10 minutes (*E. coli*) et 150 minutes (*S. aureus* H) d'incubation.

endommagement moins la structure cellulaire (CALIFANO, 1952) et permet une plus faible libération de substance à partir des corps microbiens, lors de l'opération d'éluat. Enfin, avant d'effectuer l'adsorption, la colonne à *S. aureus* H est maintenue en contact pendant 15 heures, à 0° C., avec une solution de NaCl à 5 % dans un tampon glycine-NaOH de pH 9.2. Par un lavage ultérieur à l'eau, on entraîne une substance légèrement colorée en brun. Le lavage est terminé lorsque l'eau, devenue incolore, n'abandonne plus de résidu après évaporation de 10 ml.

4) 90 ml. d'une actinomycétine titrant 9500 unités colilytiques et 24 000 unités staphylolytiques, ont été adsorbés sur une colonne de 500 g. de sable portant 1 g. de staphylocoques chauffés (poids sec), et préparée comme indiqué ci-dessus. Après adsorption, la colonne a été lavée au moyen d'un tampon glycine-NaOH de pH 9, μ 0,05, et l'éluat a été obtenu par addition au tampon précédent de NaCl à 5 %. L'éluat dialysé puis concentré à sec *in vacuo*, a donné 75 mg. d'une poudre blanche n'adsorbant presque plus à $\lambda = 258 \mu\mu$ et dont l'activité pondérale sur *E. coli* chauffée et *S. aureus* H vivant était 50 fois supérieure à celle donnée par les filtrats de culture bruts. Cette préparation, que nous avons utilisée dans d'autres recherches décrites plus loin, est désignée par X.

c) Facteurs favorables à la staphylolyse

Par adsorption en masse de l'actinomycétine sur *E. coli* ou *S. aureus* H chauffés, puis éluat à pH 3,5, le désorbat dialysé est dépourvu d'activité staphylolytique (tableau XVIII).

Toutefois, après adsorption sur *S. aureus* H, le désorbat récolté exalte l'activité staphylolytique des actinomycétines, purifiées par adsorption sur le même substrat et éluat en milieu alcalin.

Au contraire, si, toutes conditions restant égales, l'adsorption est réalisée sur *E. coli*, le désorbat, tout en possédant le même titre colilytique, ne provoque aucune exaltation de la staphylolyse.

Cette observation, illustrée par le tableau XIX, peut s'interpréter facilement. Le système staphylolytique devrait, en réalité,

être un complexe de deux agents au moins, distincts l'un de l'autre, et de l'actinozyme.

C'est ce que nous confirmerons dans les paragraphes suivants.

TABLEAU XIX

Complexité du système staphylolytique
Adsorption sur substrats microbiens chauffés

N°	Eluat		Activité staphylolytique (souche H) de l'éluat, exprimée en pourcentage de trouble disparu après 150 minutes d'incubation
	Mode de préparation		
	Adsorbant	pH de l'éluat	
1	<i>S. aureus</i> H chauffé	10.6	47
2	<i>Idem</i>	3.5	5
1 et 2	—	—	80 (synergie)
3	<i>S. aureus</i> H chauffé	10.6	60
4	<i>E. coli</i> chauffée	3.5	10
3 et 4	—	—	60

F. — Complexité du système staphylolytique

a) Défécation à l'hydroxyde de chrome

Une actinomycétine a été soumise à trois défécations successives à l'hydroxyde de chrome dans les conditions décrites en (12). Les activités colilytique et staphylolytique ont été mesurées à partir de chacun des liquides surnageants successifs. Les trois litres initiaux d'actinomycétine représentaient 27 g. de produit sec. Après défécations, on a obtenu respectivement 0.687, 0.110, et 0.035 g. de produit actif.

1) Après chaque défécation, l'activité colilytique agit selon une cinétique d'ordre 1 à pH 8.2 ($K_2 HPO_4$ M/30). Pour chacune de ces préparations, 100 unités colilytiques sont représentées en poids sec par 291, 39, 21 et 13 $\mu\text{g.}$, c'est-à-dire que ces quantités, dissoutes par ml. de suspension microbienne, provoquent en 20 minutes une disparition de trouble égale à 50 % du trouble initial.

2) L'activité staphylolytique de l'actinomycétine utilisée se manifeste également selon une cinétique d'ordre 1, lorsque les différentes dilutions sont réalisées dans la même actinomycétine, non dialysée, inactivée thermiquement, ou lorsque, après dialyse, le dosage est réalisé dans le milieu phosphates-sulfate ammonique- $MnCl_2$.

3) Au fur et à mesure de leur purification, les actinomycétines déféquées manifestent une activité staphylolytique qui n'obéit à une cinétique d'ordre 1 que pour des vitesses de réaction

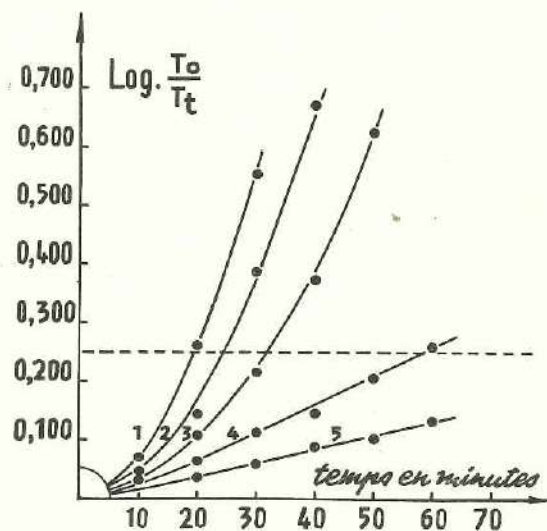


FIGURE 21. — Cinétique de la staphylolyse (souche H) par une actinomycétine ayant subi une défécation à l'hydroxyde de chrome (orthophosphates-sulfate ammonique- $MnCl_2$; pH 7.0).

En ordonnées : $\log (T_0/T_t)$.

En abscisses : temps en minutes.

Courbe 1 : la suspension staphylococcique renfermait 1100 $\mu\text{g./ml.}$ d'actinomycétine en poids sec; cette concentration décroît successivement de moitié pour les courbes 2, 3, 4 et 5.

de plus en plus petites. Les figures 21 et 22 montrent, par exemple, qu'après la première et la troisième défécation, la cinétique d'ordre 1 se vérifie pour des concentrations en principe actives telles que $\log \frac{T_0}{T_t}$ atteigne, au maximum, la valeur de 0.25 respectivement après 60 et 290 minutes.

En effectuant le dosage par calcul de la constante de réaction pour des vitesses suffisamment faibles, on voit que 100 unités staphylolytiques sont contenues respectivement dans 230, 27, 14 et 20 $\mu\text{g.}$ de chacune des préparations.

Tout se passe donc comme si « un régulateur de la staphylolyse » était progressivement entraîné avec le précipité colloïdal d'hydroxyde de chrome.

b) Extraction fractionnée

La fraction A contient les activités lytiques de l'actinomycétine adsorbables sur sable (10). Elle est riche en principes

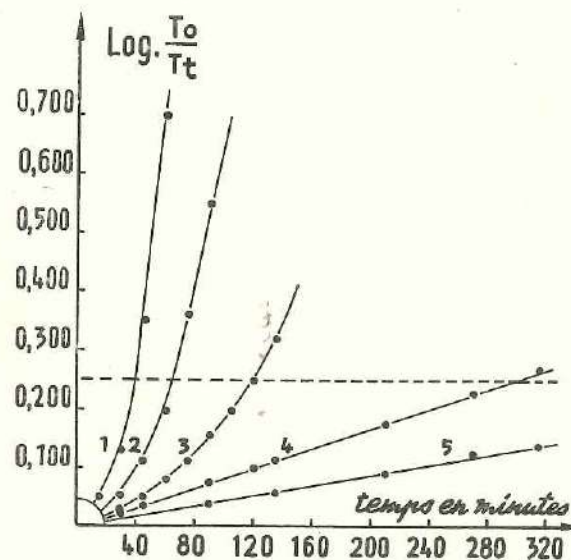


FIGURE 22. — Cinétique de la staphylolyse (souche H) par une actinomycétine ayant subi trois défécations à l'hydroxyde de chrome.

Mêmes conditions et même représentation que pour la figure 21. Toutefois, la concentration maximale d'actinomycétine utilisée est ici de 160 $\mu\text{g./ml.}$ (courbe 1).

collytique (100 unités dans 5 $\mu\text{g.}$) et staphylolytique (100 unités dans 15 $\mu\text{g.}$), et a été soumise à un fractionnement par extraction fractionnée au sulfate ammonique selon les techniques décrites en (11).

Les résultats sont exprimés graphiquement dans les figures 23 et 24 où l'on a porté en ordonnées les pourcentages cumulés des activités de chaque liquide d'extraction successif, et, en abscisses, la concentration en sulfate ammonique de ceux-ci. Les activités

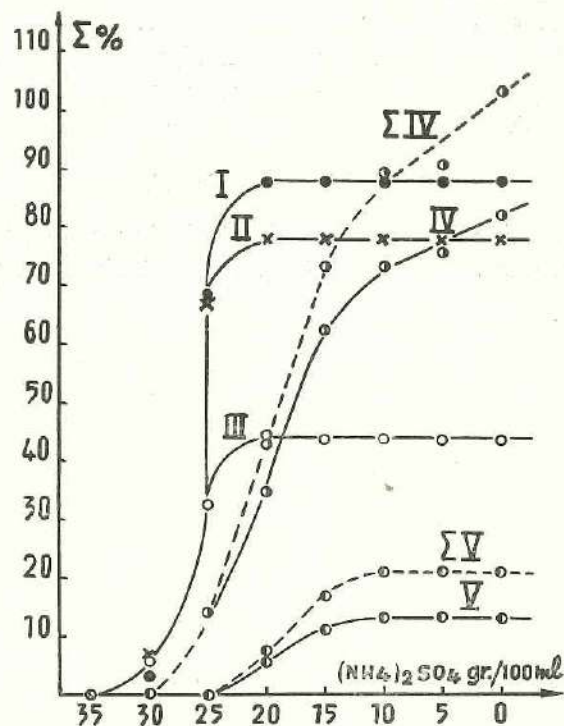


FIGURE 23. — Extraction fractionnée au sulfate ammonique, à pH 9,5, de divers agents présents dans la fraction A de l'actinomycétine.

En ordonnées : pourcentages cumulés de l'activité récupérée.

En abscisses : concentration en sulfate ammonique de la solution utilisée pour l'extraction, en g./100 ml.

Courbes : I : activité kératinolytique ; II : activité collytique ; III : activité caséinolytique ; IV : activité staphylolytique (souche H) ; V : activité streptolytique. Les courbes ΣIV et ΣV ont été obtenues en associant à chaque fraction soumise au titrage des activités staphylolytique (ΣIV) et streptolytique (ΣV), la fraction recueillie après extraction par la solution de sulfate ammonique à 30 g./100 ml.

ont été mesurées après dialyse sur : *S. aureus* H vivant, *E. coli* chauffée, ainsi que sur les deux substrats protéiniques types : la caséine et la kératine (3), (6b). Signalons que 100 $\mu\text{g.}$ de A par ml. réduisent en 20 minutes le trouble d'une suspension de kératine à 50 % de sa valeur primitive, et que 10 $\mu\text{g.}$ par ml. hydrolysent 50 % de la solution de caséine en 10 minutes.

1) Les principes protéolytiques actifs sur la caséine, la kératine et *E. coli* chauffée, sont extraits aux deux pH de 5,5 et 9,5, avec des rendements différents, mais entre les mêmes valeurs de concentration en sulfate ammonique (de 30 à 20 g./100 ml).

2) L'activité staphylolytique est extraite, aux deux pH, par des concentrations en sulfate ammonique comprises entre 25 et 0 g./100 ml. cette fois. Le rendement de l'extraction

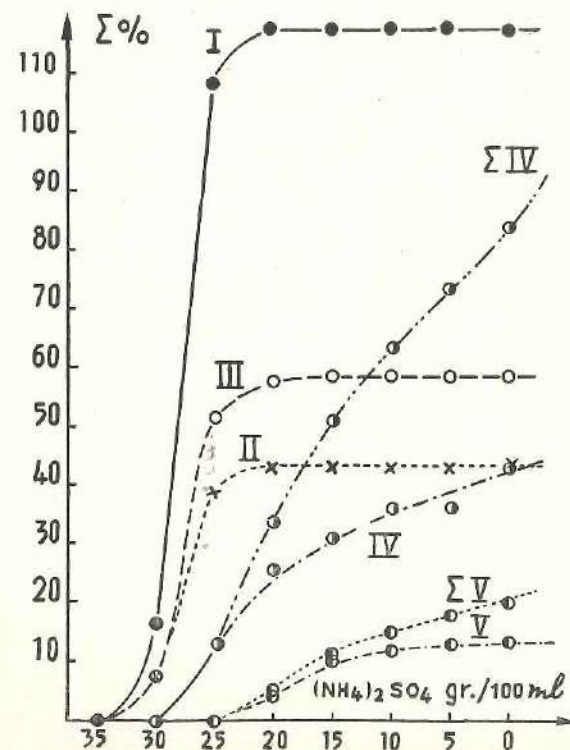


FIGURE 24. — Extraction fractionnée au sulfate ammonique, à pH 5,5, de divers agents présents dans la fraction A de l'actinomycétine.

Même représentation que pour la figure 23.

est de 80 % à pH 9.5, mais de 45 % seulement à pH 5.5. On ne peut toutefois attribuer cette diminution de rendement à une perte du principe staphylolytique. En effet, si le dosage est réalisé sur les fractions obtenues entre 25 et 0 g./100 ml. réunies, le rendement de l'extraction reste inchangé ; mais, si le dosage est réalisé sur les fractions obtenues entre 30 et 0 g./100 ml. réunies, le rendement de l'extraction est de 100 %. De même, les courbes ΣIV ont été obtenues en combinant chacune des fractions successives avec celle recueillie à 30 g./100 ml.

Il existe donc dans l'actinomycétine deux agents non dialysables, distincts des principes protéolytiques, et par ailleurs thermolabiles, dont l'association lui confère son activité staphylolytique. Lors de l'extraction à pH 9.5, ils sont pratiquement extraits ensemble aux faibles concentrations en sulfate ammonique. A pH 5.5, ils sont dissociés : un premier, que nous appellerons F_1 , s'extrait dans les mêmes limites de concentration qu'à pH 9.5 ; un second, que nous appellerons F_2 , est solubilisé aux fortes concentrations en sulfate ammonique, et, à ce pH, présente une solubilité analogue à celle des activités protéolytiques de l'actinomycétine. La zone d'extraction de ces dernières étant indifférente au pH, F_2 est donc manifestement distinct des principes actifs sur la caséine, la kératine et *E. coli* chauffée.

G. — Conclusions générales

1) La staphylolyse ne se manifeste qu'à pH neutre ou légèrement acide dans des conditions bien précises de force ionique. Celle-ci présente un optimum net (0.01 à 0.03) et indépendant de la nature des électrolytes. Certains sels, les orthophosphates et le sulfate ammonique notamment, exercent en outre un effet activateur spécifique et additif. L'ion Mn^{++} , utilisé dans certaines conditions bien précises, favorise la staphylolyse. Le type de cinétique est très variable suivant le mode de dosage et les conditions de culture dans lesquelles l'actinomycétine a été produite par le *Streptomyces*. Nous avons développé certaines équations typiques.

2) La colilyse, au contraire, se manifeste le mieux à pH 8 à 9. Elle n'est que relativement peu influencée par des variations de

force ionique. L'ion Mn^{++} exerce toujours à son égard un effet dépressif. La cinétique est, assez généralement, celle d'une réaction d'ordre 1.

3) Colilyse et staphylolyse évoluent indépendamment lors de la culture de *S. albus* G. Température de l'incubation, concentration en peptone, taux d'aération, addition de cations bivalents, sont autant de facteurs dont les répercussions sur le rendement sont différentes pour chacune des activités considérées. Parmi les cations essayés, le cobalt et le magnésium sont particulièrement favorables à la production du principe colilytique et du principe staphylolytique respectivement.

4) L'indépendance de ces deux manifestations lytiques, que les considérations précédentes permettent de postuler, a été ensuite démontrée par l'application d'un test d'homogénéité enzymatique basé sur le calcul des équations de cinétique que présente la lyse des deux substrats microbiens dans des conditions variables de pH, de force ionique et d'addition d'ions Mn^{++} . L'actinomycétine renferme un principe colilytique actif sur *E. coli* chauffée et un principe staphylolytique actif sur *S. aureus* H vivant. La lyse de *S. aureus* H chauffé est, suivant les conditions du substrat et les caractéristiques du milieu, réalisée par l'un ou l'autre des principes précédents, ou par les deux ensembles.

5) L'adsorption des principes colilytique et staphylolytique sur les substrats microbiens a été étudiée. Un procédé de chromatographie sur corps microbiens a été mis au point. Il a permis d'interpréter le phénomène par le calcul des isothermes d'adsorption. Chacun des principes est préférentiellement adsorbé sur le substrat homologue. C'est également au cours d'expériences analogues que l'on a observé un premier indice de la complexité du système staphylolytique.

6) Cette complexité a été bientôt confirmée par des expériences de défécation à l'hydroxyde de chrome, et ensuite démontrée par extraction fractionnée au sulfate ammonique.

Le système staphylolytique de l'actinomycétine est constitué de deux agents, thermolabiles et non dialysables, complètement distincts de l'actinozyme, ainsi d'ailleurs que des enzymes protéolytiques, respectivement actifs sur la caséine et la kératine.

CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION
DES AGENTS STAPHYLOLYTIQUES F₁ ET F₂A. — Séparation de F₁ et F₂

L'extraction fractionnée, grâce à laquelle nous avons pu démontrer la complexité du système staphylolytique, est un procédé uniquement analytique. Il exige, en effet, que l'on dispose de la substance à purifier sous forme solide ou, tout au moins, en solution très concentrée. Il est nécessaire d'extraire à une vitesse suffisamment faible, par chacun des solvants successifs, pour permettre l'établissement d'un état proche de l'équilibre entre les phases solide et liquide; le procédé est par conséquent très long. L'extraction par un solvant donné doit être poursuivie jusqu'à épuisement le plus complet possible de la colonne, si bien que les principes actifs, séparés, sont à nouveau dilués à un taux comparable à celui des cultures initiales.

En recherchant d'autres procédés de fractionnement, et instruit de l'intérêt croissant des échangeurs cationiques dans la purification des protéines (13), nous avons constaté que l'amberlite IRC50 technique fixait les divers principes lytiques de l'actinomycétine avec une certaine spécificité suivant le pH auquel l'échange ionique s'effectuait (13a). Nous avons donc examiné les avantages présentés par ce procédé.

Ces recherches ont été entreprises uniquement au moyen d'actinomycétines élaborées dans le milieu plumes-caséine, spécialement favorable à la production de l'activité staphylolytique (5a, 2). De plus, afin d'augmenter la rapidité de nos mesures, nous avons utilisé une autre souche de staphylocoque plus sensible que *S. aureus* H, et désignée par *S. aureus* S. Il s'agit d'une souche fraîchement isolée du sang d'un patient, résistante à la pénicilline, à la streptomycine, à l'Auréomycine, à la Chloromycétine, à la Terramycine, ainsi qu'au Sulfathiazol. Le comportement comparatif de ces deux souches, vis-à-vis de l'actinomycétine, sera donné plus loin.

a) Démonstration de la dualité du système staphylolytique
par adsorption sur IRC50

Lorsqu'une actinomycétine est passée au travers d'une colonne d'IRC50 dont le degré de neutralisation est tel qu'après passage, le pH du liquide effluent est de 7, seule l'activité staphylolytique n'y est pas retrouvée. Quatre litres de filtrat de culture sont passés, en 20 heures, à 10° C., sur 150 g. d'IRC50, préalablement neutralisés par 0.34 mole de KOH. L'effluent, dialysé ou non, ne présente aucune activité staphylolytique, mais contient 95 % des activités protéolytiques, y compris l'activité colilytique. La colonne est ensuite lavée par 1 litre d'une solution d'éthylhexanol à 0.5 p. 1000 dans un mélange eau-éthanol 99 : 1, v/v, puis traitée par une solution de KOH 0.6 M — acide borique 0.6 M — KCl 0.4 M. On recueille divers aliquots de 100 ml. numérotés de 1 à 15.

1) Parmi les fractions 1 à 15, la fraction 4 présente une activité staphylolytique appréciable. Après 90 min. d'incubation (10 % v/v), la valeur de $\log \frac{T_0}{T_t}$ est égale à 0.550. Or, le filtrat de culture dont on a utilisé un volume de 4 litres, donne, après 40 min. d'incubation, dans les mêmes conditions, une valeur de $\log \frac{T_0}{T_t}$ égale à 0.900. L'activité retrouvée dans la fraction 4 ne représente donc qu'une infime partie de l'activité originale.

2) Le tableau XX a été obtenu en associant 0.5 ml. de la fraction 4, diluée au quart, à des quantités variables de l'effluent dialysé, respectivement chauffé et non chauffé. L'effluent, quoique inactif à lui seul, contient un agent thermostable responsable d'un effet d'inhibition ou d'inactivation de la staphylolyse par la fraction 4, selon la concentration à laquelle il est utilisé. Mais il renferme également un activateur thermolabile non dialysable. En effet, l'inhibition est moindre, et l'activation est supérieure, lorsque, les autres conditions étant égales, l'effluent associé à la fraction 4 n'est pas chauffé.

3) Les effets thermostables d'activation et d'inhibition peuvent être reproduits par addition à la fraction 4 de quantités variables de milieu de culture vierge dialysé, ou encore, plus

simplement, par addition d'électrolytes comme NaCl. Ils peuvent être attribués à des modifications de force ionique du milieu et ne sont pas spécifiques.

4) L'agent thermolabile et indialysable, retenu par IRC50 technique à pH 7, présente donc un caractère nettement plus basique que l'actinozyme et les principes protéolytiques. Au contraire, le second agent staphylolytique, également thermolabile et indialysable, mais non fixé par l'amberlite à pH 7, se comporte à ce point de vue comme les principes protéolytiques. Ces propriétés sont à rapprocher de celles que les deux constituants du système staphylolytique ont présentées lors des extractions fractionnées au sulfate ammonique. Rappelons, en effet, qu'à pH 5.5 l'agent staphylolytique désigné par F_2 s'extrait dans une même zone de concentration en sulfate ammonique que les activités protéolytiques. Par simple analogie, nous continuerons à désigner par F_1 l'agent staphylolytique fixé sur l'amberlite à pH 7, et par F_2 le second agent staphylolytique non fixé dans ces conditions.

TABLEAU XX

Potentiation de la staphylolyse (souche S) par un agent non lytique qui traverse l'amberlite IRC50 à pH 7 (effluent)

Quantité, en ml., d'effluent dialysé ajouté à 0.5 ml. de l'agent staphylolytique (fraction 4) (volume final de la suspension microbienne : 5 ml.)	Activité staphylolytique exprimée par $\log (T_0/T_{120}')$	
	Effluent chauffé	Effluent non chauffé
2	0	0.180
1	0.114	0.650
0.5	0.430	0.860
0.25	0.430	0.740
0.125	0.500	0.613
0.0625	0.340	0.340
0.0312	0.250	0.250
0	0.205	0.205

b) Un calcul de rendement

5.600 ml. de filtrat de culture sont fixés sur 50 g. d'IRC50 technique neutralisée par 125 ml. de KOH. L'amberlite est lavée par le mélange eau-alcool-éthylhexanol que l'on ajoute à l'effluent; le volume total est 7400 ml.

On élue par une solution : KOH 0.08 M — acide borique 0.08 M — KCl 0.12 M; on recueille 1260 ml.

0.5 ml. du filtrat de culture original correspond à 0.66 ml. de l'effluent et à 0.11 ml. de l'éluat.

Les valeurs de $\log \frac{T_0}{T_t}$, obtenues après 60 min. d'incubation de la suspension staphylococcique en présence de 0.5 ml. de filtrat ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.990$), de 0.66 ml. de l'effluent ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.142$), de 0.11 ml. de l'éluat ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0$) et de l'association [effluent 0.66 ml. + éluat 0.11 ml.] ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.700$), montrent que le rendement de l'opération est d'environ 75 %.

c) Obtention de F_1 et F_2 séparés, à l'état sec

Le schéma de l'opération peut se résumer de la façon suivante.

1) *Adsorption*. — 5 l. de filtrat de culture sont successivement passés, à 10° C. et en 15 heures, sur deux colonnes séparées contenant respectivement 50 g. d'IRC50 neutralisés par 125 ml. de KOH N (colonne I) et 100 g. d'IRC50 neutralisés par 50 ml. de KOH N.

2) *Elution de F_1* . — La colonne I est lavée par le mélange eau-alcool-éthylhexanol et éluee, à 0° C., par une solution de KOH 0.08 M — acide borique 0.08 M — KCl 0.42 M. Les fractions sont recueillies par portions de 50 ml. au moyen d'un collecteur automatique. 0.1 ml. de chacune de celles-ci est additionné de 0.5 ml. de la solution avant son entrée dans la colonne II et dont on a prélevé un aliquot. Les activités sont mesurées après incubation en présence de 4.5 ml. d'une suspension aqueuse de *S. aureus* S. Les fractions actives sont réunies, dialysées et lyophilisées.

Nous pouvons aussi réaliser l'élution par une solution KOH — acide borique (0.08 M) et KCl (0.12 M). Dans ce cas, les fractions recueillies et réunies peuvent être à nouveau adsorbées par 15 g. d'IRC50 neutralisés par 37.5 ml. de KOH N, sans devoir être dialysées au préalable, mais à condition d'amener leur pH à 8.5, ce qui est aisément réalisé en les faisant passer sur 75 g. d'amberlite IR4B. L'élution est ensuite effectuée par la première solution fortement chlorurée et l'activité est ainsi concentrée dans un volume plus petit (100 à 200 ml.) qu'il est plus facile de dialyser et de lyophiliser.

3) *Elution de F₂*. — L'amberlite retirée de la colonne II est lavée avec le mélange eau-alcool-éthylhexanol, puis, trois fois, avec une solution de KCl N. Elle est ensuite essorée, puis remise en suspension dans un minimum de KCl N. La désorption est réalisée en ajoutant lentement, avec agitation, 25 ml. d'une solution KOH 4 N — KCl N. On filtre sur Buchner et l'amberlite est lavée avec un minimum de KCl N. Les liquides limpides et réunis (taux de concentration : 30 x) sont refroidis à 0° C., puis additionnés de 10 % (v/v) d'une solution KOH 1,1 N — acide borique 0.9 M. On ajoute ensuite un volume double d'une solution, également refroidie à 0° C., de KOH 1,1 N — acide borique 0.9 M contenant 50 g./100 ml. de sulfate ammonique. L'addition se fait lentement (2 heures) par l'intermédiaire d'un tube capillaire et avec agitation. On recueille le précipité par centrifugation et on le dissout dans un minimum de K₂HPO₄ M/30. Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée et lyophilisée.

4) *Rendement*. — Les rendements obtenus lors de huit opérations différentes sont donnés dans le tableau XXI. Le rendement moyen est d'environ 15 mg. par litre, pour chacune des fractions. Les différences observées sont attribuables aux variations d'activité présentées par les diverses cultures (7). Occasionnellement, l'agent staphylolytique, au lieu de se présenter sous la forme d'une poudre blanche, montre une coloration verdâtre. Ceci peut être évité en faisant subir préalablement à l'IRC50 un cyclage complet : forme acide → forme alcaline → forme acide ; ébullition de 3 heures dans HCl 3 N → lavage à l'eau.

TABLEAU XXI
Variabilité du rendement en F₁ et F₂ bruts
au cours de préparations successives

Volume de filtrat actif traité en litre	Rendement en mg./l.	
	F ₁	F ₂
5	11	—
7.3	23	23
6.9	—	21
7	17	21
7.5	9.5	10
7.5	28 (produit vert)	17
8	14	7.5
8	18	11

d) *Lyse de S. aureus S par F₁ et F₂ bruts, isolément ou réunis*

La lyse de *S. aureus* se décompose en deux temps. Un temps de latence, pendant lequel le trouble de la suspension reste inchangé, précède la lyse proprement dite, durant laquelle, pour une concentration donnée en principe actif, la vitesse de réaction est une fonction du temps d'incubation. Cette division en deux phases est particulièrement évidente lorsque la staphylolyse est réalisée dans des conditions sub-optimales de force ionique ainsi que le montre la figure 25. Les droites I, II et III représentent la staphylolyse par F₂ (10 µg./ml.), F₁ (45 µg./ml.) et l'association des deux, à µ 0.010, alors que la force ionique optimale relative à cette association est de 0.030. En effet, F₁ et F₂ associés (45 µg./ml. de chacun) donnent à µ 0.03, après 60 min.

d'incubation, une valeur de $\log \frac{T_0}{T_t}$ égale à 0.800. Cette valeur est ramenée à 0.350 si, toutes autres conditions étant égales, la force ionique est de 0.01. La figure 25 montre également l'effet synergique de l'association F₁ + F₂, qui se traduit à la fois par une diminution du temps de latence et par une augmen-

tation de la vitesse de clarification de la suspension, une fois que celle-ci s'est déclenchée.

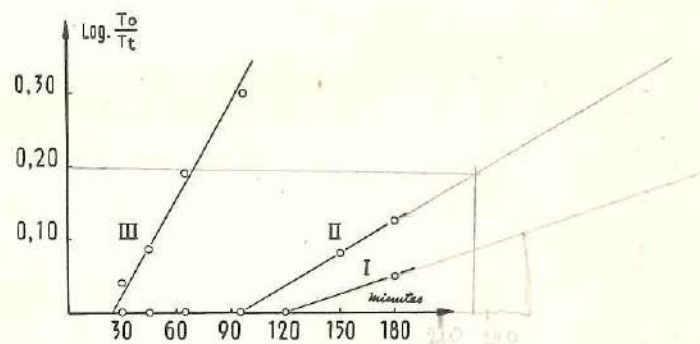


FIGURE 25. — Cinétique de la staphylolyse (souche S) par les fractions brutes F_1 et F_2 de l'actinomycétine, utilisées isolément ou en association (orthophosphates; pH 7; force ionique sub-optimale 0.010).

En ordonnées : $\log (T_0/T_t)$.

En abscisses : temps en minutes.

Courbes : I : 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_2 ; II : 45 $\mu\text{g./ml.}$ de F_1 ; III : 45 $\mu\text{g./ml.}$ de F_1 et 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_2 .

B. — Purification de F_1

a) Procédé

400 mg. de F_1 brut ont été chromatographiés sur une colonne (90 cm./2.5 cm.) d'XE64 (13, c, d, e) en tampon véronal sodique 0.05 M — HCl, de pH 7. Après le passage de 1300 ml., la force ionique du solvant a été augmentée par addition de NaCl 0.2 M et après un passage supplémentaire de 600 ml., la teneur en NaCl a été portée à 0.4 M. On a recueilli 160 fractions dont on a dosé la teneur en protéines (13, f), les activités caséolytique et colilytique, et l'activité sur *S. aureus* S. Celle-ci a été recherchée en incubant pendant 60 minutes, 4.5 ml. d'une suspension staphylococcique aqueuse en présence de 0.1 ml. ou 0.02 ml. de chaque fraction, associé à 0.5 ml. d'une solution de F_2 brut à 200 $\mu\text{g./ml.}$ en phosphates μ 0.2 de pH 7.

La figure 26 montre qu'en l'absence de NaCl, le principe staphylolytique F_1 est complètement fixé par l'amberlite. Dans ces conditions, on élue plusieurs bandes non détachées de protéines dont certaines sont attribuables aux principes coli-

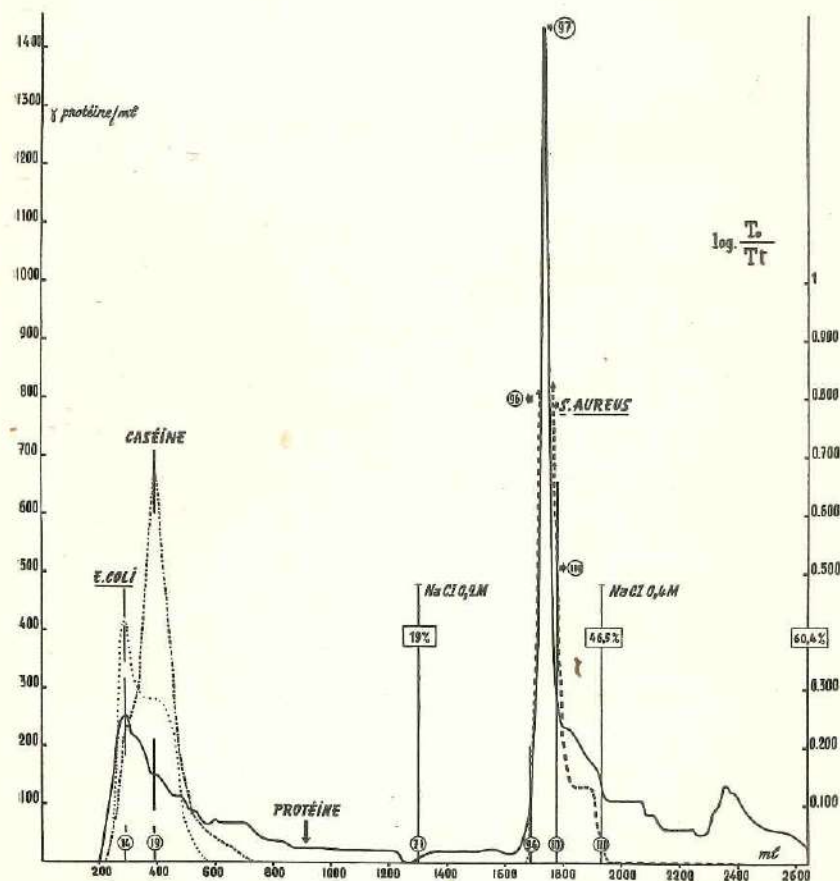


FIGURE 26. — Purification de la fraction F_1 de l'actinomycétine par chromatographie sur amberlite XE-64.

En ordonnées :

échelle de gauche : concentration en protéines du liquide effluent en $\mu\text{g./ml.}$ (courbe en trait plein).

échelle de droite : activité enzymatique du liquide effluent exprimée par $\log (T_0/T_t)$; en pointillé : activité colilytique; points et traits alternés : activité caséolytique; traits discontinus : activité staphylolytique (souche S).

En abscisses : quantité d'effluent recueilli en ml.

Les chiffres placés dans un cercle indiquent le numéro d'ordre de la fraction analysée. Ceux placés dans un rectangle représentent le pourcentage de protéine retrouvé.

L'élution est réalisée par un tampon véronal 0.05 M, pH 7.0, auquel on ajoute NaCl 0.2 M à partir de la fraction 71 et NaCl 0.4 M à partir de la fraction 110.

lytique et caséinolytique qui contaminent la préparation F_1 brute. En présence de NaCl 0.2 M, le principe staphylolytique est élué sous la forme d'un pic étroit qui, entre les fractions 94 et 100, épouse parfaitement celui des protéines. A partir de la fraction 100, on constate toutefois que l'activité des fractions diminue plus rapidement que leur teneur en protéines. Enfin, en présence de NaCl 0.4 M, on élue à nouveau plusieurs bandes de protéines dépourvues des activités recherchées.

b) *Degré de pureté de F_1 purifié*

1) *Coefficient catalytique.* — Le degré de pureté des diverses fractions staphylolytiques a été évalué en divisant les valeurs de $\log \frac{T_0}{T_t}$ observées après 60 min. d'incubation, dans les conditions décrites, par le nombre de $\mu\text{g.}$ de protéines, provenant de la fraction examinée, contenu dans 1 ml. de la suspension de *S. aureus* S. Les valeurs obtenues représentent donc l'activité enzymatique présente dans 1 $\mu\text{g.}$ de chacune des fractions. Ces déterminations ont, strictement, la même valeur que l'établissement des coefficients catalytiques (page 221) et ne sont, de même, applicables que si la lyse par les diverses fractions examinées se déroule suivant une même cinétique; ceci, dans l'expérience présente, se vérifie au moins pendant les 60 premières minutes de la réaction.

Les valeurs calculées dans ces conditions pour les fractions 94 à 100 sont respectivement égales à 0.22, 0.24, 0.23, 0.22, 0.20, 0.165 et 0.125. On voit qu'une contamination de la fraction 99 par une substance azotée, inactive, et réagissant avec le réactif de Folin et Ciocalteu, est probable et qu'elle est certaine pour la fraction 100.

Les fractions 95 à 98 réunies nous ont donné après dialyse et lyophilisation, 55 mg. d'une poudre blanche, dénommée F_1 purifié, et représentant 13 % de la préparation brute originale.

2) *Electrophorèse sur papier.* — Nous avons soumis F_1 purifié à une électrophorèse sur papier 3 MM à pH 5.5 en tampon acétate μ 0.1 sous 400 V. pendant 3 heures, et à pH 7, en tampon de MILLER et GOLDER (1950), μ 0.1 sous 500 V. pendant 90 minutes. Les expériences ont été réalisées en double. Un des

papiers a été révélé selon le procédé de RYDON et SMITH (1952), tandis que l'autre a été étalé sur une gélose, tamponnée à pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$) μ 0.01 contenant soit les cellules vivantes, soit les parois cellulaires de *S. aureus* S. Dans chaque cas, on a observé une bonne concordance entre la révélation chimique, et la révélation enzymatique manifestée par une clarification de la gélose, après une incubation de 15 heures à 37° C. La migration s'effectue toutefois dans de mauvaises conditions. On observe un long étalement de la substance dont le début coïncide avec le point de dépôt, et qui est probablement dû à une interaction de la protéine avec les charges négatives du papier. Aux deux pH, la substance migre vers le pôle négatif. Il s'agit d'une protéine basique, même à pH 7. Dans les conditions expérimentales décrites, l'étalement était de 5.5 cm. à pH 5.5 et de 3.5 cm. à pH 7.

3) *Analyse chromatographique.* — Par chromatographie bidimensionnelle de F_1 purifié, en pyridine-eau 8:2, v/v et n-butanol-acide acétique-eau 8:1:2, v/v/v, on observe que la préparation est contaminée par des traces d'acides aminés, parmi lesquels on peut identifier: la glycine, la sérine, l'acide aspartique et l'alanine. Les quantités décelées sont toutefois négligeables comparées à celles que libère l'hydrolyse chimique (HCl 6 N, 105° C., 24 heures). Après évacuation de l'acide chlorhydrique par lyophilisation, la chromatographie du matériel ainsi obtenu, en phénol- NH_3 et n-butanol-acide acétique-eau, révèle la présence de la plupart des acides aminés communément rencontrés dans les protéines. La figure 27 montre la présence des acides aminés suivants: acide cystéique, acide aspartique, acide glutamique, sérine et glycine, thréonine, alanine, lysine, arginine, proline, tyrosine, valine-méthionine, leucine-isoleucine.

4) *Comportement à l'ultracentrifuge.* — Les ultracentrifugations ont été réalisées à partir de solutions à 0.5 %, faites en tampons μ 0.1 de pH 5.5 (acétate), 6, 7 et 7.5 (tampons de MILLER et GOLDER, 1950, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaCl}$). La substance sédimente sous la forme d'un pic unique. La constante de sédimentation, faible à pH 5.5 ($S = 0.90$), augmente progressivement avec le pH ($S = 1.90$ à pH 6.5) et se stabilise à pH 7 — 7.5 ($S = 2.35$ et 2.38), ce qui traduit la présence de très fortes

interactions électrostatiques dues aux fonctions NH_3^+ libres de la molécule protéinique qu'une élévation de pH neutralise progressivement. Conformément aux résultats de l'électrophorèse, F_1 se comporte donc comme une protéine basique. Il en est de même, par exemple, pour le lysozyme (point isoélectrique : 9.5 à 10), le chymotrypsinogène α (p. i. : 9.1 à 9.5) et la ribonucléase (p. i. : 7.8), qui sont également des protéines enzymatiques purifiables sur amberlite IRC50.

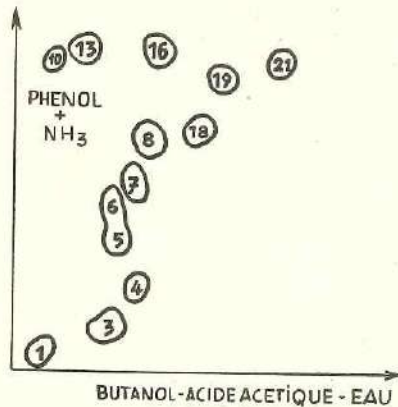


FIGURE 27. — Mise en évidence par chromatographie bidimensionnelle des acides aminés libérés par hydrolyse acide de la fraction F_1 purifiée.

Les chiffres, repris d'un article de SALTON (1953a), représentent respectivement : 1 : acide cystéique ; 3 : acide aspartique ; 4 : acide glutamique ; 5 et 6 : sérine et glycine ; 7 : thréonine ; 8 : alanine ; 10 : lysine ; 13 : arginine ; 16 : proline ; 18 : tyrosine ; 19 : valine-méthionine ; 21 : leucine-isoleucine.

Ainsi que le montre la figure 28, les pics présentent cependant une certaine asymétrie, indicatrice d'une contamination par des substances de faible constante de sédimentation ce qui, à la limite, est conforme avec la présence d'acides aminés libres décelés par chromatographie.

5) *Conclusions.* — Ces diverses analyses montrent que F_1 est presque exclusivement constitué par une protéine basique. Celle-ci est obtenue dans un très haut état de pureté enzymatique, mais elle reste contaminée par des substances de faible poids moléculaire : petits peptides probablement et acides aminés.

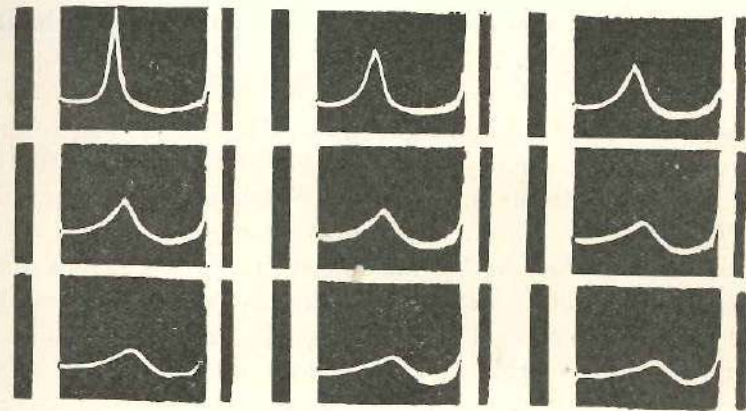


FIGURE 28. — Diagrammes d'ultra-centrifugation de la fraction F_1 purifiée. Tampon de MILLER et GOLDER (1950), pH 7.5, force ionique 0.1, G : 214.000. Température 20.5 à 21.2 °C. Intervalle entre chaque photographie : 8 min. Concentration du matériel : 0.5 % en poids sec.

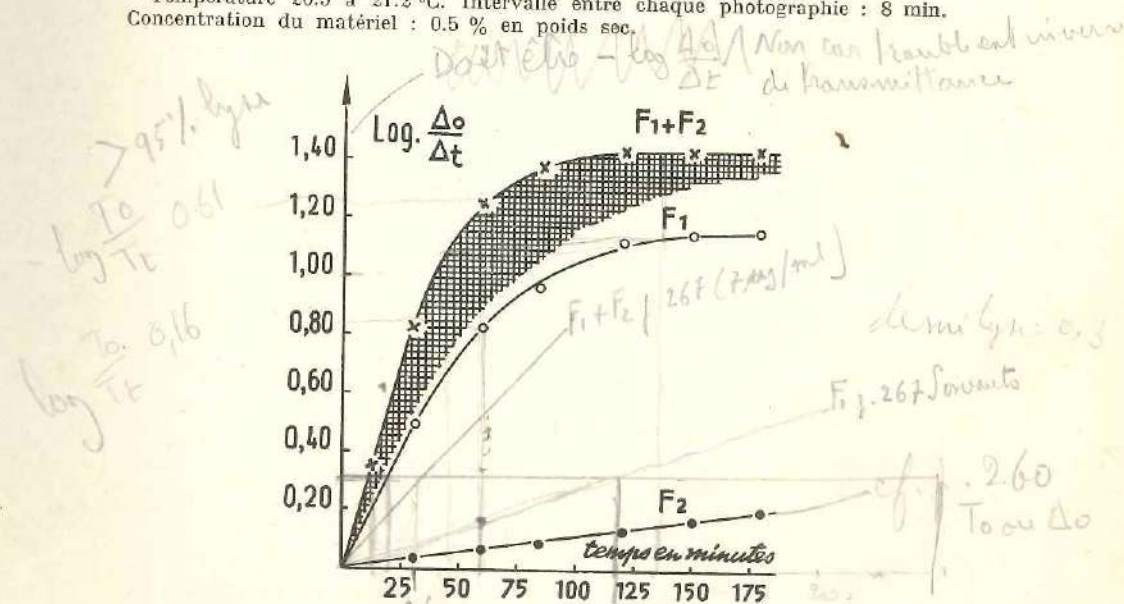


FIGURE 29. — Cinétique de la staphylolyse (souche S, germes vivants) par les fractions F_1 purifiée et F_2 brute utilisées isolément ou associées (orthophosphates ; pH 7.0 ; force ionique : 0.01).

En ordonnées : intensité de la lyse mesurée par $\log (\Delta_o/\Delta t)$.
 En abscisses : temps en minutes.
 Concentration de F_1 et F_2 : 10 $\mu\text{g./ml}$.
 La zone hachurée représente l'effet synergique.

$k = \frac{0.693}{t/2}$
 $k \text{ de } F_1 = \frac{0.693}{20'} = 3,465 \cdot 10^{-2}$

C. — Activité staphylolytique de F₁ purifié et F₂ brut

a) Cellules staphylococciques vivantes

Les figures 29 et 30 montrent la cinétique de la lyse, à force ionique de 0.01 (tampon de GREEN, 1933, KH₂PO₄ — K₂HPO₄), des cellules vivantes de *S. aureus* S et *S. aureus* H par 10 µg./ml. de F₁ purifié, 10 µg./ml. de F₂ brut et par 10 µg./ml. de F₁ associés à 10 µg./ml. de F₂. Elles illustrent également les différences de sensibilité des deux souches staphylococciques. En présence d'un poids égal de F₁ purifié, F₂ brut exerce un effet synergique considérable alors que, agissant seul, à la même concentration, il ne manifeste qu'un effet lytique négligeable.

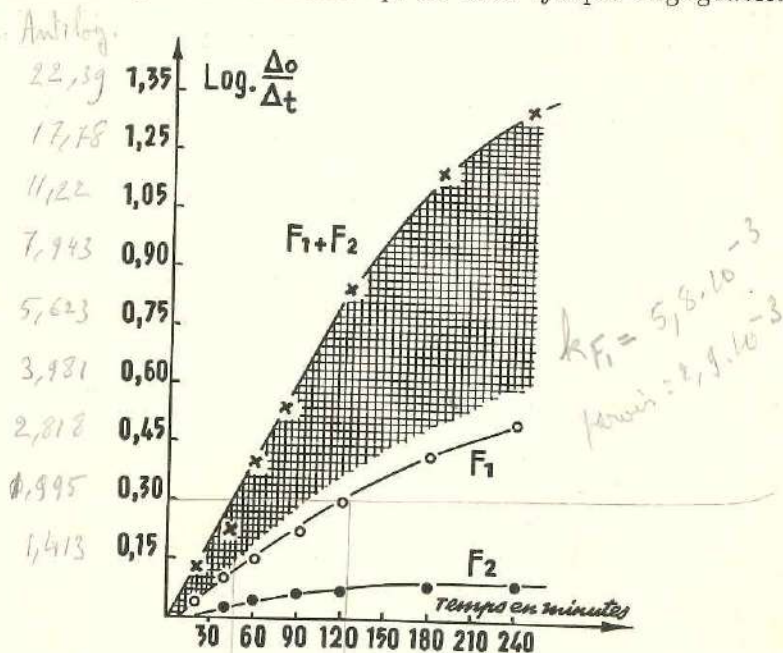


FIGURE 30. — Cinétique de la staphylolyse (souche H, germes vivants) par les fractions F₁ purifiée et F₂ brute utilisées isolément ou associées (orthophosphates; pH 7.0; force ionique 0.01).

Même représentation que pour la figure 29 (SALTON et GHUYSEN, 1957).

b) Cellules staphylococciques chauffées

Le tableau XXII montre que, en K₂HPO₄ M/30 (pH 8.2), milieu favorable à la manifestation de l'activité colylique,

TABLEAU XXII

Activité bactériolytique comparée de F₁ purifié et F₂ brut

Substrat	Milieu	Activité lytique (exprimée par log T ₀ /T _t) des préparations			Temps d'incubation en minutes
		F ₁	F ₂	F ₁ + F ₂	
<i>E. coli</i> chauffée	PO ₄ , M/30; pH 8	0.060	0.525	0.530	15
<i>S. aureus</i> S chauffé	Idem	0.00	0.220	0.220	15
<i>S. aureus</i> S chauffé	PO ₄ ; µ 0.01 pH 7	0.220	0.025	0.820	15
<i>S. aureus</i> S vivant	Idem	0.160	0.00	0.610	60

7 µg/ml
0.16 en 60' donc 0.3 (t/2) en 120' - k = 5.8 · 10⁻³

F₁ purifié, utilisé à la concentration de 7 µg./ml., est pratiquement inactif sur *E. coli* et *S. aureus* S chauffés. Il est dépourvu d'actinozyme. Au contraire, F₂ digère rapidement ces deux substrats et, dans ces conditions de pH, l'association F₁ + F₂ présente la même activité que F₂ seul.

A pH 7, µ 0,01 (K₂HPO₄ — KH₂PO₄) et toujours à la concentration de 7 µg./ml., F₁ est actif sur *S. aureus* S chauffé, tandis que F₂ ne l'est pratiquement plus. L'association F₁ + F₂ est cependant fortement synergique. Dans ces conditions de pH et de force ionique, le comportement de *S. aureus* S vis-à-vis de F₁ purifié et de F₂ brut est donc qualitativement le même, qu'il soit vivant ou chauffé. Cette conclusion rejoint celle que nous avons tirée des cinétiques de réaction présentées par la lyse de *S. aureus* H et de *E. coli* dans des conditions physico-chimiques différentes (p. 238) : en l'absence d'actinozyme, l'intervention du principe staphylolytique dans la lyse de *S. aureus* chauffé, peut être clairement mise en évidence.

c) *Parois staphylococciques*

Les figures 31 et 32 montrent l'influence de la force ionique ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$) sur la lyse, à pH 7, des parois cellulaires de *S. aureus* S et de *S. aureus* H par 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_1 purifié, 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_2 brut et 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_1 associés à 10 $\mu\text{g./ml.}$ de F_2 . De nouveau, F_2 , employé isolément, n'a qu'une très faible activité lytique; il existe un optimum de force ionique bien déterminé et égal à 0.01; l'association $F_1 + F_2$ est synergique et cet effet se traduit, en particulier, par le maintien d'une réaction d'ordre 1, ainsi qu'en témoigne la figure 33 relative à la cinétique de la lyse des parois de *S. aureus* H à μ optimal 0.01. Cette même figure montre également l'action lytique du lysozyme (1000 $\mu\text{g./ml.}$) sur ces mêmes parois, incubées dans le tampon pH 7, μ 0.1 (MILLER et GOLDBER, 1950), généralement utilisé pour cet enzyme.

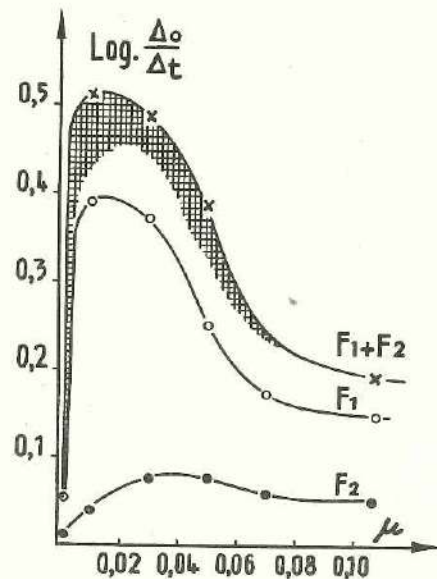


FIGURE 31. — Influence de la force ionique sur la dissolution des parois cellulaires de *S. aureus*, souche S, par les fractions F_1 purifiée et F_2 brute, utilisées isolément ou en association (orthophosphates; pH 7.0).

En ordonnées : intensité de la lyse après 120 min., exprimée par la valeur de $\log (\Delta_0/\Delta t)$.

En abscisses : force ionique.

Concentration en enzymes : voir figure 29.

La zone hachurée représente l'effet synergique.

On voit que, quel que soit le substrat staphylococcique, cellules vivantes, cellules chauffées, parois cellulaires, la digestion par F_1 purifié, F_2 brut et l'association des deux, est strictement comparable. F_1 exerce une action prépondérante et peut, isolément, digérer ces trois substrats. F_2 seul a une activité faible, mais, associé à F_1 , il participe activement à la lyse en hâtant la clarification des suspensions sensibles.

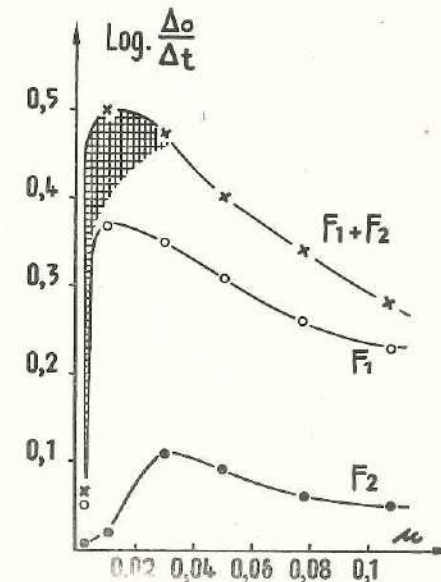


FIGURE 32. — Influence de la force ionique sur la dissolution des parois cellulaires de *S. aureus*, souche H, par les fractions F_1 purifiée et F_2 brute, utilisées isolément ou en association.

Même représentation que pour la figure 31. Le temps d'incubation est toutefois ici de 330 min. (SALTON et GHUYSEN, 1957).

d) *Confirmation de l'activité lytique de F_2 sur les parois staphylococciques*

50 mg. de parois cellulaires staphylococciques ont été digérés par 300 $\mu\text{g.}$ de F_1 ou 500 $\mu\text{g.}$ de $F_1 + 500 \mu\text{g.}$ de F_2 (14, b). Après clarification et dialyse, le matériel non dialysable, qui représente environ 70 % en poids sec des parois cellulaires utilisées, a été lyophilisé et examiné à l'ultracentrifuge (14, d, 2). Il sédimente sous la forme d'un pic unique (figure 34) dont la faible vitesse de sédimentation indique des poids

moléculaires de 10 000 à 15 000. Ainsi que le montre le tableau XXIII, la présence de F_2 ne semble pas provoquer une dégradation plus poussée de la paroi cellulaire.

Les mêmes indialysats ont été soumis à l'électrophorèse sur papier (14, d, 1). Après digestion des parois cellulaires de *S. aureus* S par F_1 et $F_1 + F_2$, il est possible de séparer trois fragments principaux, non dialysables et riches en fonctions NH_2 libres, mises en évidence par leur réaction avec la ninhydrine. La séparation peut être réalisée à pH 7, μ 0.1 (MILLER et GOLDBER, 1950), après trois heures, sous 400 V. (figure 35, rangées I et II).

Après digestion des parois cellulaires de *S. aureus* H par F_1 et électrophorèse à pH 7, μ 0.1 (3 heures, 400 V.), (figure 35,

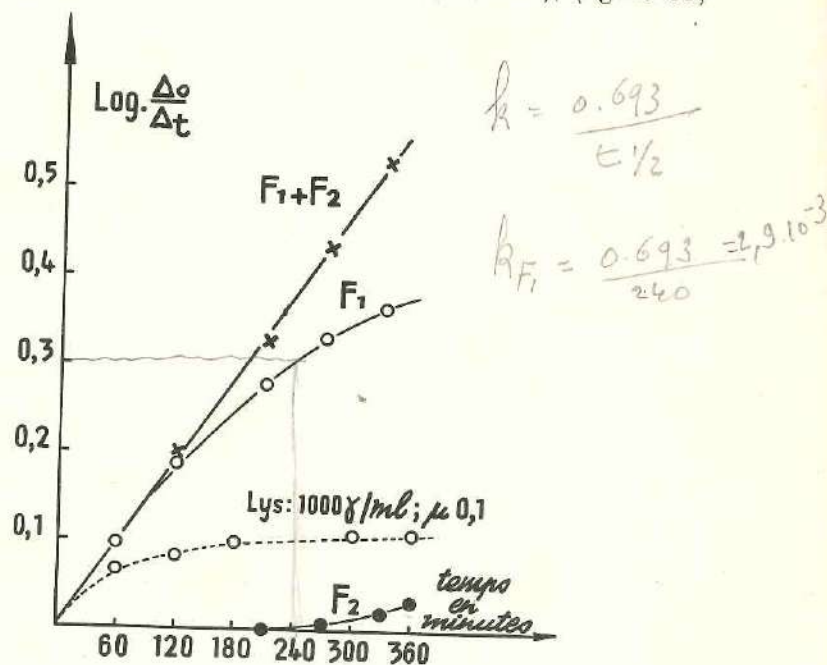


FIGURE 33. — Cinétique de la lyse des parois cellulaires de *S. aureus* souche H, par les fractions F_1 (purifiée) et F_2 (brute), utilisées isolément ou en association, ainsi que par le lysozyme.

En ordonnées : intensité de la lyse exprimée par $\log (\Delta_0/\Delta_t)$.

En abscisses : temps en minutes.

Concentration de F_1 et F_2 : 10 $\mu\text{g./ml.}$; orthophosphates; pH 7.0; force ionique : 0.01.

Concentration du lysozyme : 1000 $\mu\text{g./ml.}$; tampon de MILLER et GOLDBER (1950), force ionique, 0.1 (SALTON et GHUYSEN, 1957).

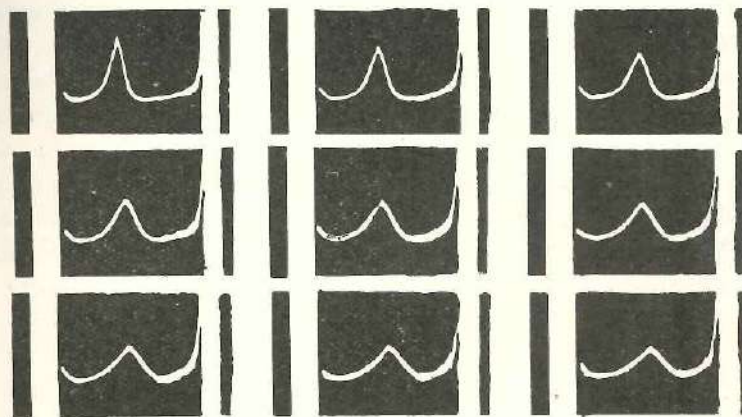


FIGURE 34. — Diagrammes d'ultracentrifugation des fractions non dialysables obtenues après digestion des parois cellulaires de *S. aureus* H par l'association F_1 et F_2 .

Mêmes conditions que pour la figure 28. Toutefois ici : $G = 238.300$; température 23 à 25 °C.

rangée III), on obtient une image électrophorétique comparable à celles obtenues à partir des indialysats de *S. aureus* S. Toutefois, un composant supplémentaire, à caractère nettement basique, apparaît lorsque la digestion est réalisée par l'association $F_1 + F_2$ (figure 35, rangée IV).

Cette dernière observation illustre clairement l'action synergique de F_2 et confirme l'individualité des deux souches

TABLEAU XXIII

Constante de sédimentation, exprimée en unité SVEDBERG, des fractions non dialysables obtenues après digestion enzymatique des parois staphylococciques

Parois de	Enzyme	S_{20}
<i>S. aureus</i> H	F_1 purifié	0.06
<i>S. aureus</i> H	F_1 purifié + F_2 brut	1.05
<i>S. aureus</i> S	F_1 purifié	0.96
<i>S. aureus</i> S	F_1 purifié + F_2 brut	0.92

staphylococciques utilisées ainsi que la bonne séparation des deux préparations F_1 et F_2 .

Ces résultats montrent l'intérêt que présente F_2 . Or, dans les expériences d'extraction fractionnée, l'activité staphylolytique complémentaire F_2 , nous est apparue comme devant être attribuée à un agent spécifique, distinct de l'actinozyme et des principes protéolytiques tels que la caséinase et la kératinase. Nous avons voulu confirmer cette spécificité, par chromatographie de F_2 brut sur XE64.

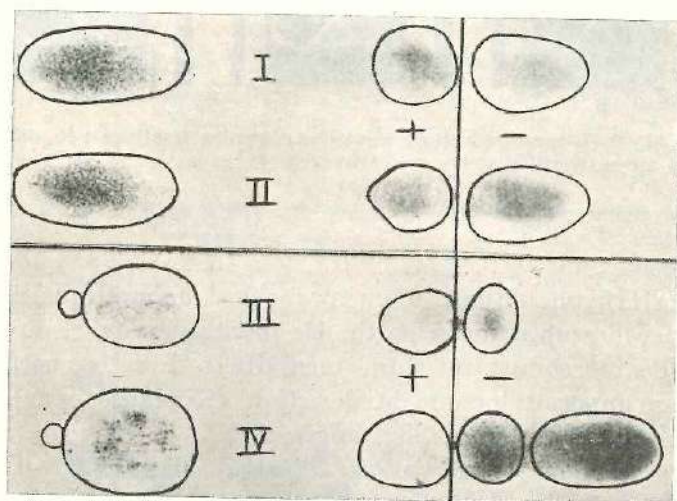


FIGURE 35. — Analyse par électrophorèse sur papier des fractions non dialysables obtenues après digestion des parois cellulaires de *S. aureus* S (I et II) et *S. aureus* H (III et IV) par F_1 (I et III) et par F_1 et F_2 ensemble (II et IV) (SALTON et GHUYSEN, 1957).

D. — Purification de l'agent staphylolytique complémentaire F_2

La purification de cet agent est beaucoup plus malaisée que celle de F_1 , étant donné les analogies qu'il présente avec les divers principes protéolytiques.

a) Essais d'orientation

Des chromatographies ont été réalisées sur IRC50 X E64 en tampons acide citrique — Na_2HPO_4 de pH et de force ionique

différents : pH 7.2 (0.2 M en Na ; colonne de 90 cm./2.5 cm.) ; pH 6.1 (0.2 M en Na ; colonne de 2 m/2.5 cm.) ; pH 5.5 (0.05 M en Na ; colonne de 90 cm./2.5 cm.). Les fractions ont été recueillies au moyen d'un collecteur automatique et nous avons recherché leur teneur en protéines, ainsi que leurs activités caséinolytique, colilytique et staphylolytique. Cette dernière a été dosée en incubant pendant 30 à 60 min., 4.5 ml. d'une suspension aqueuse de *S. aureus* S vivant, en présence de 0.2 ml. de chaque fraction associé à 0.2 ml. d'un tampon pH 7, μ 0.4 (K_2HPO_4 — KH_2PO_4) contenant 800 $\mu\text{g./ml.}$ de la préparation F_1 brute. Dans les conditions choisies, une incubation témoin, en présence de F_1 seul, ne provoque aucune disparition de trouble.

Les résultats sont représentés par les figures 36 (pH 5.5), 37 (pH 6.1) et 38 (pH 7.2) réalisées respectivement au moyen de 20, 100 et 100 mg. de F_2 brut.

1) On observe, dans les trois conditions choisies, un dédoublement de l'activité caséinolytique (bande Ia et bande Ib). Toutefois, suivant ces conditions, l'ordre d'éluion peut être inversé.

2) La bande Ib de caséinase accompagne systématiquement les principes colilytique et kératinolytique.

3) L'activité staphylolytique passe en premier lieu à pH 5.5 ($R_f = 0.9$)⁽¹⁾, se situe entre les caséinases Ia et Ib à pH 6.1 ($R_f = 0.83$) et s'éluie en même temps que la caséinase Ib à pH 7.1 ($R_f = 0.80$).

b) Purification

Malgré les valeurs de R_f très proches des divers principes à séparer, nous avons tenté une purification de l'agent staphylolytique F_2 par chromatographies successives à pH 6.1 (143.28 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 25.2 g. d'acide citrique + eau pour un volume final de 4 litres).

1) Après une première chromatographie sur XE64 (figure 37), les fractions dont l'activité par milligramme de protéine était supérieure à celle du F_2 original, ont été sélectionnées, dialysées et lyophilisées.

⁽¹⁾ Nous désignons par R_f le rapport a/b où a représente le volume de la phase liquide de la colonne et b le volume total de liquide recueilli au moment où la concentration de la substance considérée atteint son maximum.

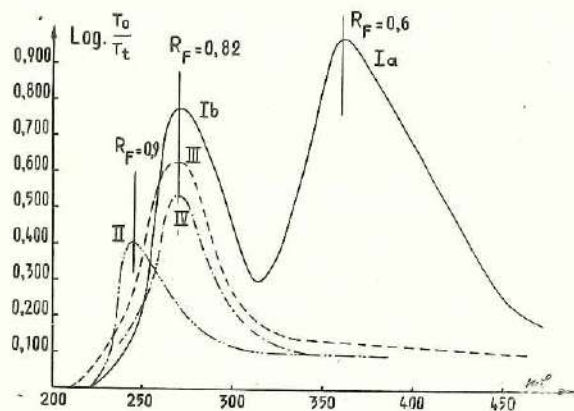


FIGURE 36. — Analyse de la fraction F_2 brute (20 mg.) par chromatographie sur amberlite XE 64. Eluant : tampon phosphate-acide citrique : 0.05 M en Na; pH 5.5.

En ordonnées : activité enzymatique exprimée par $\log (T_0/T_t)$.

En abscisses : quantité d'effluent recueillie en ml.

- (Ia, Ib) : activité caséinolytique.
- (II) : activité staphylolytique (mesurée avec la souche S).
- - - - (III) : activité collolytique.
- · - · (IV) : activité kératolytique.

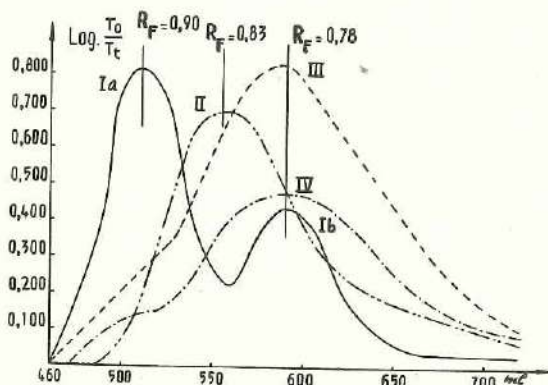


FIGURE 37. — Analyse de la fraction F_2 brute (100 mg.) par chromatographie sur amberlite XE 64.

Eluant : tampon phosphate-acide citrique 0.2 M en Na; pH 6.1.
Même représentation que pour la figure 36.

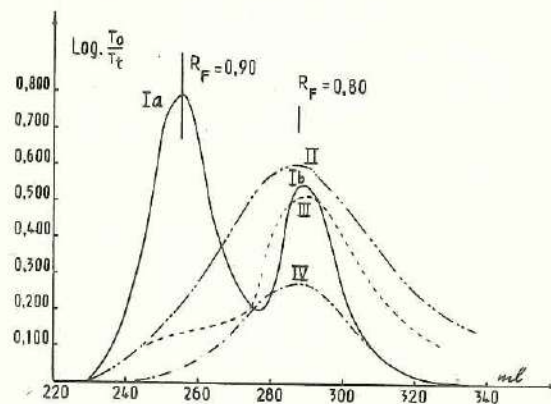


FIGURE 38. — Analyse de la fraction F_2 brute (100 mg.) par chromatographie sur amberlite XE 64.

Eluant : tampon phosphate-acide citrique 0.2 M en Na; pH 7.1.
Même représentation que pour la figure 36.

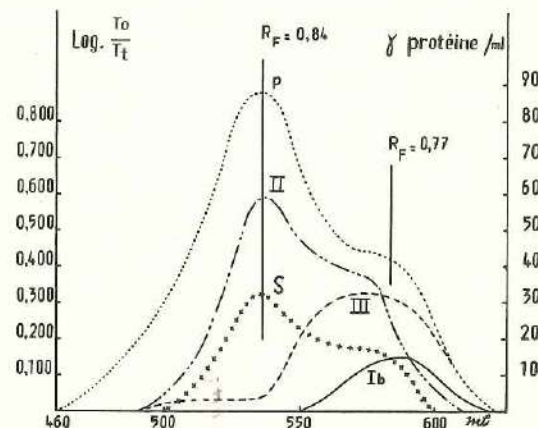


FIGURE 39. — Purification de l'agent staphylolytique par chromatographie de la fraction F_2 brute sur amberlite XE 64. Troisième cycle.
Eluant : tampon phosphate-acide citrique 0.2 M en Na; pH 6.1.

En ordonnées :

échelle de gauche : activité enzymatique exprimée par $\log (T_0/T_t)$. Courbes : Ib : activité caséinolytique; II : activité staphylolytique (souche S); III : activité collolytique; S : activité lytique sur *Sarcina lutea* (mesurée en orthophosphates, pH 7.0, force ionique 0.002).

échelle de droite : concentration en protéines en $\mu\text{g./ml.}$, courbe p.

En abscisses : quantité d'effluent recueillie en ml.

Remarque : le premier cycle relatif à cette purification est représenté par la figure 37.

2) Le produit lyophilisé, remis en solution, a été chromatographié une seconde fois. Nous avons ainsi obtenu 20 fractions et nous n'avons conservé que 5 d'entre elles possédant la plus haute activité par milligramme de protéine.

3) Ces fractions, dialysées et lyophilisées, ont été chromatographiées une troisième fois. La figure 39 montre que la caséinase Ia et la kératinase ont été éliminées. La caséinase Ib persiste très faiblement, associée à une certaine activité colylytique. On remarque toutefois que les fractions recueillies en premier lieu et dont la teneur en protéines va croissant, ne contiennent que l'activité staphylolytique.

Le procédé n'est évidemment pas rentable. Il confirme, toutefois, de façon certaine, la spécificité de l'agent staphylolytique complémentaire contenu dans la préparation F₂.

E. — Conclusions

1) L'activité staphylolytique de l'actinomycétine est réellement due à deux agents distincts qu'il est possible de séparer sur IRC50 par un choix convenable du pH auquel s'effectue l'échange ionique.

2) F₁ a été obtenu dans un état de haute pureté par chromatographie à pH 7 sur XE64. C'est une protéine basique. Elle est le constituant essentiel du système staphylolytique et peut, à elle seule, effectuer la staphylolyse.

3) F₂ est beaucoup plus malaisé à purifier. Son activité bactériolytique directe est faible, mais, en association avec F₁, il favorise la clarification des suspensions sensibles. Par chromatographies répétées, sur XE64, à pH 6.1, on a confirmé la spécificité de cet agent staphylolytique complémentaire. Il est distinct de l'actinozyme, des caséinases et de la kératinase.

4) Le système staphylolytique est actif sur les cellules vivantes, les cellules chauffées et les parois cellulaires staphylococciques. Après digestion de ces dernières, le matériel non dialysable présente un poids moléculaire de 10 000 à 15 000, constitue environ 70 % du matériel original et est riche en fonctions NH₂ libres.

5) L'action activante de F₂ a pu être vérifiée au niveau même des parois cellulaires de *S. aureus* H.

CHAPITRE V

BACTÉRIOLYSE DES GERMES GRAM-POSITIFS PAR LES AGENTS STAPHYLOLYTIQUES F₁ ET F₂

Les agents F₁ et F₂ sont-ils spécifiquement et uniquement staphylolytiques, ou bien jouent-ils un rôle dans la bactériolyse par l'actinomycétine des autres germes gram-positifs vivants ?

Nous étudierons tout d'abord, avec quelques détails, les caractéristiques présentées par la streptolyse et la pneumolyse par notre actinomycétine. En effet, McCARTY (1952) a démontré que l'activité streptolytique de « son » actinomycétine est due à l'intervention initiale d'une polysaccharidase, spécifiquement active sur les parois des streptocoques β hémolytiques. D'autre part, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae* sont des espèces appartenant à un même genre de la famille des *Lactobacteriaceae*. Il était donc intéressant de comparer la bactériolyse de ces deux germes.

Nous poursuivrons en dressant un spectre bactériolytique de l'actinomycétine, en prenant comme substrat les parois cellulaires elles-mêmes. Ce spectre sera limité aux principaux microorganismes sensibles à l'actinomycétine et dont les parois cellulaires ont déjà été antérieurement étudiées par d'autres chercheurs.

Nous préciserons enfin la nature des agents bactériolytiques F₁ et F₂, en examinant le type de liaison dont l'attaque enzymatique, au niveau même de la paroi cellulaire, assure le déclenchement de la bactériolyse.

A. — Streptolyse

Le rôle éventuel du « système staphylolytique » dans la streptolyse par l'actinomycétine, a été recherché au moyen de quatre préparations différentes : la préparation X, obtenue par concentration sur colonne staphylococcique, selon la technique décrite p. 246 ; la préparation A, obtenue par adsorption sur sable et que nous avons déjà utilisée dans les expériences d'extractions fractionnées, rapportées aux pages 249 à 252 ; enfin, les préparations F₁ purifiée et F₂ brute.

a) Préparation X

McCARTY (1952) a montré que, par simple dialyse de son actinomycétine contre HCl 10^{-4} N, la polysaccharidase, spécifiquement active sur les parois streptococciques, pouvait être séparée d'un principe protéolytique actif sur la caséine.

Nous avons tenté de séparer l'une de l'autre les activités caséinolytique et streptolytique de notre actinomycétine X par le même procédé (WELSCH et GHUYSEN, 1953). Dans ce but, 5 ml. d'une solution à 0.3 % de cette préparation, ont été dialysés à 2° C. pendant 24 heures contre une solution de HCl 10^{-4} N. Il s'est formé un abondant précipité, légèrement coloré en jaune, qui a été redissous dans 5 ml. du milieu dénommé ci-dessous « milieu II », tandis que la fraction liquide, restée dans le boyau dialyseur, a été recueillie séparément. Les activités bactériolytique et caséinolytique de ces deux fractions ont été mesurées et exprimées en temps de demi-lyse. Celui-ci exprime le temps nécessaire pour amener la concentration en substrat sensible à 50 % de sa valeur de départ, calculé par extrapolation en supposant que la vitesse initiale de lyse reste constante. Contrairement à ce qu'avait obtenu McCARTY, toute l'activité caséinolytique a été retrouvée dans la fraction précipitée où elle restait associée à la majeure partie des activités bactériolytiques et colilytiques.

1) L'activité du liquide surnageant (L. S.) sur le streptocoque, vivant ou chauffé à 65° C. pendant 30 minutes, est à peu près nulle. Dans les deux cas, et à la dilution de 1/30, v/v, le temps de demi-lyse dépasse 600 minutes, aussi bien en K_2HPO_4 M/30 de pH 8.2 (milieu I que l'on utilise pour le dosage de l'actinozyme) qu'en solution de phosphates-sulfate ammonique-MnCl₂, de pH 7, μ 0.02, employée pour le dosage de l'activité staphylolytique (milieu II).

Son activité sur *S. aureus* H chauffé n'est pas négligeable puisque, à la même concentration, le temps de demi-lyse est de 85 minutes dans le milieu I et de 260 minutes dans le milieu II.

Enfin, le temps de demi-lyse pour *S. aureus* H vivant, dans les mêmes conditions, est de 450 minutes dans le milieu II et de plus de 600 minutes dans le milieu I.

2) La lyse de *S. aureus* H et du streptocoque chauffé par le précipité redissous (P) obéit de façon parfaite à une cinétique

d'ordre 1 après un temps de latence de quelques minutes. A la dilution de 1/100, v/v, les temps de demi-lyse de ces substrats sont respectivement de 14 et 18 minutes en solution I, mais de 40 et 145 minutes en solution II. En milieu I, le streptocoque chauffé se comporte donc de façon très analogue au staphylocoque chauffé. Sa dissolution est cependant bien plus nettement entravée que celle du staphylocoque lorsque l'on passe du milieu I au milieu II.

La lyse de *S. aureus* H et du streptocoque vivants se déroule de façon identique dans le milieu II. A la dilution de 1/100, la demi-lyse est réalisée en 70 minutes et la cinétique d'ordre I est suivie pendant 120 minutes au moins. Par contre, en solution I et à la même dilution, le temps de demi-lyse est de 90 minutes pour le staphylocoque et de 60 minutes pour le streptocoque ; de plus, la cinétique d'ordre I n'est obtenue que pendant les 60 premières minutes de la staphylolyse, tandis qu'elle se manifeste pendant au moins 120 minutes pour la streptolyse.

Les observations précédentes peuvent se résumer très simplement (WELSCH et GHUYSEN, 1957 ; tableau XXIV).

1) La lyse du streptocoque chauffé par P est comparable à celle du staphylocoque chauffé si la digestion est réalisée dans le milieu I uniquement.

2) La lyse du streptocoque vivant par P est comparable à celle du staphylocoque vivant, si la digestion est réalisée dans le milieu II uniquement, quoique le milieu I soit mieux adapté à la streptolyse.

3) La lyse du streptocoque chauffé par L. S., n'est pas comparable à la lyse du staphylocoque chauffé, ni dans le milieu I, ni dans le milieu II.

L'actinomycétine renferme donc, en plus du système staphylolytique, un agent qui, en association ou non avec lui, intervient pour assurer la dissolution du streptocoque.

b) Préparation A

Certaines des activités lytiques de la préparation A ont été signalées page 250. Ajoutons ici que 12 μ g./ml. de cette préparation provoquent, en 20 minutes et en solution de K_2HPO_4 M/30,

TABLEAU XXIV

Comparaison de diverses activités bactériolytiques
des deux fractions L. S. et P d'actinomycétine

Fraction	Milieu (1)	Temps en minutes nécessaire pour obtenir la demi-lyse des suspensions de			
		<i>S. aureus</i> H		<i>S. pyogenes</i>	
		chauffé	vivant	chauffé	vivant
L. S(1/30)	I	85	>600	>600	>600
	II	260	450	>600	>600
P(1/100)	I	14	90	18	60
	II	40	70	145	70

(1) Voir page 278.

une disparition de 50 % du trouble initial d'une suspension de streptocoques vivants.

Le comportement de l'activité streptolytique, lors de l'extraction fractionnée de la préparation A au sulfate ammonique, est montré par les courbes V et ΣV des figures 23 et 24 (pp. 250 et 251).

Cette activité est extraite entre les mêmes limites de concentrations en sulfate ammonique que l'activité staphylolytique, mais elle s'en différencie par un très faible rendement d'extraction, égal à 15 % seulement. De plus, par association des diverses fractions recueillies entre 35 et 0 g./100 ml. de sulfate ammonique, le rendement reste pratiquement inchangé. L'actinozyme, le principe caséinolytique, le principe kératinolytique et l'agent staphylolytique complémentaire F₂ n'interviennent donc pas dans la streptolyse par notre actinomycétine.

c) Fractions F₁ purifiée et F₂ brute

Dans les tampons K₂HPO₄ — KH₂PO₄ de pH 7, F₁ purifié est actif sur *S. pyogenes* vivant. L'optimum de force ionique est de 0.02. Après une incubation de 60 min., à cette force ionique, et à la concentration de 7 µg./ml., on obtient une valeur de $\log \frac{T_0}{T_t}$ égale à 0.130. Par contre, F₂ brut, utilisé à la même concentration, est inactif aux forces ioniques comprises entre 0.11 et 0.002.

L'activité de F₁ et F₂ sur *S. aureus* S vivant, recherchée dans les mêmes conditions, est tout à fait comparable ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.160$ pour F₁ et 0.000 pour F₂). Mais, tandis que l'association des deux fractions se traduit par un effet synergique intense sur la lyse de *S. aureus* S ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.610$) elle n'a pratiquement aucun effet de ce genre sur la streptolyse ($\log \frac{T_0}{T_t} = 0.190$).

d) Conclusions

F₁ purifié possède une certaine activité sur *S. pyogenes* vivant qui explique le rendement de 15 % obtenu lors des extractions fractionnées au sulfate ammonique. F₂ en est pratiquement dépourvu. Mais l'actinomycétine renferme certainement, en plus, un ou plusieurs systèmes spécialement adaptés à la streptolyse, dont, peut-être, la polysaccharidase de McCARTY.

B. — Pneumolyse

a) Comparaison des activités pneumolytiques des fractions C, N et A

Les fractions N et A ont été obtenues par fractionnement sur sable (10) de l'actinomycétine concentrée C. Rappelons que la fraction N est dépourvue d'activité sur *E. coli* chauffée, *S. aureus* et *S. pyogenes* vivants. Les activités de la fraction A ont été précédemment signalées (pages : 250 et 279).

L'étude de la pneumolyse par les trois fractions (GHUYSEN, 1954a) a porté sur des germes stérilisés par un chauffage de

3 minutes à 100° C. et sur des germes vivants. Dans les deux cas, on a utilisé des suspensions bactériennes : 1° en eau distillée, 2° en K_2HPO_4 M/30 de pH 8.2 (milieu I) favorable aux manifestations de l'actinozyme et 3° en solution de phosphates-sulfate ammonique de pH 7 (milieu II') favorable à la staphylolyse. Nous n'avons pas introduit d'ions Mn^{++} dans ce dernier milieu car il exerce un effet stimulant, indésirable ici, sur l'autolyse du pneumocoque.

1) *Pneumocoques chauffés : eau distillée.* — La fraction C et la fraction N sont très peu actives. En outre, leur activité décroît lorsque la concentration augmente, ce qui indique l'intervention de phénomènes d'inhibition. La fraction A est totalement inactive.

2) *Pneumocoques chauffés : milieu I et II'.* — L'activité de C est à peu près identique dans les deux milieux. Les temps de demi-lyse pour 255 $\mu g./ml.$ sont de 20 et 25 minutes.

N est beaucoup plus active dans le milieu II' (temps de demi-lyse de 70 min. pour 150 $\mu g./ml.$) que dans le milieu I (même temps de demi-lyse pour 400 $\mu g./ml.$).

A est, au contraire, plus active dans le milieu I (temps de demi-lyse de 60 minutes pour 5 $\mu g./ml.$) que dans le milieu II' (même temps de demi-lyse pour 20 $\mu g./ml.$).

L'actinomycétine renferme donc deux principes capables d'assurer la bactériolyse du pneumocoque chauffé. L'un contenu dans A, et par conséquent adsorbable sur sable, est plus actif dans le milieu I. Ces deux propriétés permettent de l'assimiler éventuellement au principe colilytique. L'autre, non adsorbé par le sable et contenu dans N, est plus actif dans le milieu II'. L'un et l'autre sont inactifs en eau distillée. Etant donné les propriétés de ces deux agents, on comprend que l'actinomycétine C présente une activité à peu près semblable dans les milieux I et II'.

3) *Pneumocoques vivants.* — Les essais de pneumolyse ont été réalisés en eau distillée et dans le milieu II'. Dans ce dernier cas, la suspension microbienne subit une autolyse progressive (50 % de lyse en 3 heures) qui doit être mesurée et dont il faut tenir compte pour apprécier les effets propres à l'actinomycétine.

Le milieu I (K_2HPO_4 M/30, pH 8.2) n'a pas été utilisé ; en effet, l'autolyse y est tellement rapide (50 % de lyse en 40 minutes) que les effets propres de l'actinomycétine ne peuvent être décelés.

i) Fraction A. Dans le milieu II', la clarification produite par cette fraction n'est que légèrement supérieure à celle qui résulte de la simple autolyse et son effet est indépendant de sa concentration, entre 0.39 et 100 $\mu g./ml.$ (figure 40).

En eau distillée, elle ne provoque aucune clarification endéans deux heures d'incubation (figure 40). Mais si, à ce moment, on introduit dans la suspension les électrolytes nécessaires pour obtenir la composition du milieu II', on assiste à une lyse extrêmement rapide, dont la vitesse dépend, cette fois, de la concentration en actinomycétine initialement mise en œuvre (figure 41). La fraction A exerce donc, en fait, une action évidente sur le pneumocoque vivant en eau distillée, mais celle-ci ne se traduit par une clarification qu'en présence d'électrolytes. Ce phénomène n'est pas observé avec les pneumocoques chauffés. Le système autolytique du germe y participe donc vraisemblablement et, de ce fait, le principe responsable paraît être un inducteur d'autolyse.

ii) Fractions N et C. En eau distillée, la dissolution des pneumocoques par ces deux préparations est rapide. Elle débute après une période de latence de vingt minutes environ ; la vitesse est directement proportionnelle au temps d'incubation et est toujours une fonction de la concentration utilisée.

En milieu II', la lyse est immédiate, non précédée d'une phase de latence. Le tableau XXV montre que, même en négligeant la phase de latence existant en eau distillée, l'actinomycétine C est plus active en milieu II' qu'en eau distillée. On observe l'inverse pour la fraction N.

L'actinomycétine renferme donc également deux principes actifs sur le pneumocoque vivant.

L'un, présent dans A, est adsorbé par le sable. Il favorise dans le milieu II' l'autolyse du pneumocoque, tandis qu'en eau distillée, il provoque des modifications importantes de la cellule qui se traduisent par sa dissolution lorsque le milieu est rendu favorable à l'autolyse par addition d'électrolytes. Il est possible que cet inducteur d'autolyse représente tout ou partie du complexe staphylolytique.

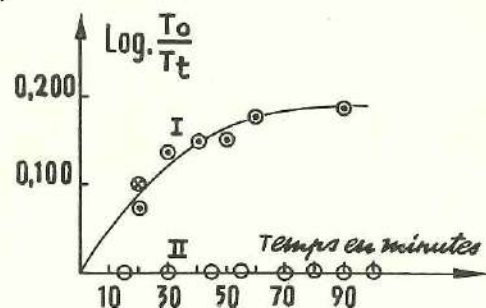


FIGURE 40. — Cinétique de la lyse de *Streptococcus pneumoniae* vivant par la fraction A de l'actinomycétine.

En ordonnées : $\log (T_0/T_t)$.

En abscisses : temps en min.

Courbe I : lyse dans le milieu II' (voir texte) et déduction faite de la clarification due à l'autolyse.

Courbe II : en eau distillée.

Résultats obtenus avec des concentrations d'actinomycétine variant depuis 0.4 jusque 100 μ g./ml.

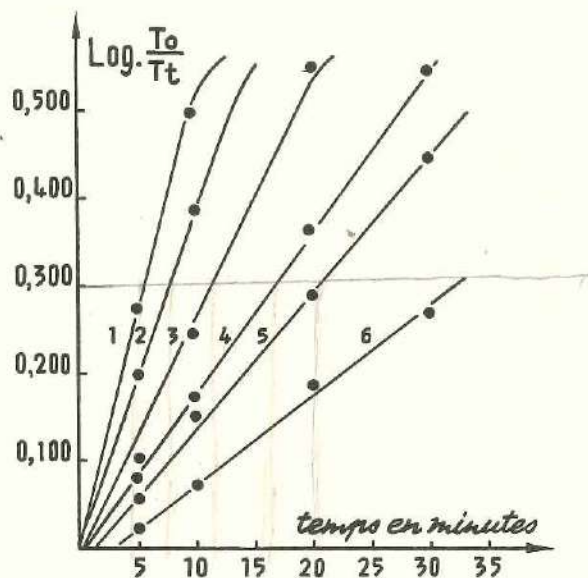


FIGURE 41. — Cinétique de la lyse de *Streptococcus pneumoniae* vivant par la fraction A de l'actinomycétine.

Incubation pendant 2 heures en eau distillée (voir figure 40, courbe II), puis addition des sels constitutifs du milieu II' (voir texte).

Même représentation que pour la figure 40.

Concentration en enzyme pour la courbe 1 : 12.5 μ g./ml. en poids sec; pour les courbes suivantes, diminutions successives de moitié.

TABLEAU XXV

Activité des fractions d'actinomycétine C et N sur *S. pneumoniae* vivant

Fraction	Concentration en μ g./ml. (poids sec)	Temps en minutes nécessaire pour obtenir la demi-lyse des suspensions pneumococciques en	
		Milieu II' ⁽¹⁾	Eau distillée ⁽²⁾
C	513	36	65
	256	45	75
	128	57	85
	64	70	100
N	400	60	67
	200	—	75
	100	—	86
	50	110	99

⁽¹⁾ Voir page 282.

⁽²⁾ Dans tous les cas, le début de la lyse est précédé d'une phase de latence de 20 minutes.

L'autre principe, non adsorbé par le sable, se retrouve dans la fraction N et assure la dissolution des germes, de préférence dans l'eau distillée. Ces deux caractères le distinguent de l'actinozyme et des systèmes staphylolytique et streptolytique.

b) Extraction fractionnée de N

On voit que les activités pneumolytiques de la fraction N doivent être attribuées à des principes spécifiques et distincts de ceux que nous avons précédemment étudiés. Mais, le principe qui, dans cette fraction N, lyse le pneumocoque vivant, en eau distillée, est-il identique au principe de cette même fraction, qui dissout, de préférence dans le milieu II', le pneumocoque chauffé ? Cette question a été résolue en soumettant N à une extraction fractionnée au sulfate ammonique dans des conditions identiques à celles qui avaient été appliquées à la fraction A.

L'activité contenue dans les différents liquides extractifs dialysés a été mesurée, d'une part, sur le pneumocoque vivant en eau distillée et, d'autre part, sur le pneumocoque chauffé en eau distillée et dans le milieu II'. Les résultats sont représentés dans la figure 42.

Quel que soit le pH de l'extraction et le milieu de dosage, l'activité sur le pneumocoque chauffé se retrouve avec un bon rendement (70 à 80 %) dans les fractions extraites entre 30 et 15 g./100 ml. de sulfate ammonique. Ce principe se comporte donc comme une substance unique.

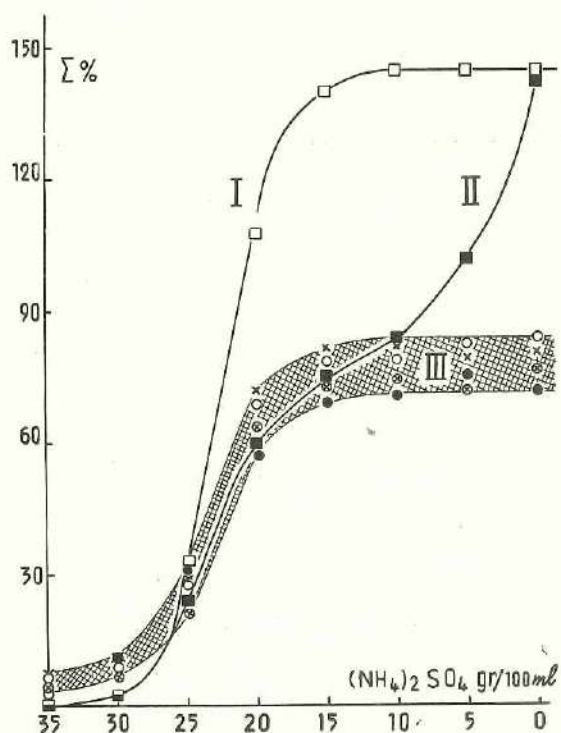


FIGURE 42. — Extraction fractionnée au sulfate ammonique des activités pneumolytiques de la fraction N de l'actinomycétine.

Même représentation que pour les figures 23 et 24.

Courbe I : extraction à pH 9.5; dosage sur pneumocoques vivants en eau distillée.

Courbe II : extraction à pH 5.5; dosage sur pneumocoques vivants en eau distillée.

Courbe III : extraction à pH 9.5 ou 5.5; dosage en eau distillée et en ortho-phosphates-sulfate ammonique, pH 7, sur pneumocoques chauffés.

L'activité sur le pneumocoque vivant se retrouve également entre les mêmes limites de concentrations en sulfate ammonique lorsque l'extraction est réalisée à pH 9.5. Le rendement de l'opération est de 150 %, ce qui peut sans doute s'expliquer par l'élimination d'un inhibiteur. Si, au contraire, le fractionnement est réalisé à pH 5.5, une première fraction active est recueillie avec un rendement de 80 %, toujours entre les mêmes limites de concentrations en sulfate ammonique. Une seconde fraction, recueillie entre 15 et 0 g./100 ml., est inactive sur le pneumocoque chauffé mais contient encore 70 % de l'activité initiale sur le pneumocoque vivant.

N a donc été divisé en deux fractions : l'une active sur le pneumocoque vivant ou chauffé, l'autre active sur le pneumocoque vivant uniquement.

c) Comparaison des activités de F_1 purifié et de F_2 brut sur *S. pneumoniae* vivant

En tampons $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$, F_1 purifié et F_2 brut, utilisés séparément, sont actifs sur le pneumocoque vivant. A la concentration de 70 $\mu\text{g./ml.}$, après 60 minutes d'incubation et aux forces ioniques de 0.107, 0.02 et 0.001, les valeurs mesurées de $\log \frac{T_0}{T_t}$, déduction faite de l'autolyse correspondante, sont respectivement égales à 0.040, 0.500 et 0.200 pour F_1 et de 0.480, 0.640 et 0.800 pour F_2 .

A la concentration de 7 $\mu\text{g./ml.}$, après 60 minutes d'incubation et à μ 0.02, les valeurs de $\log \frac{T_0}{T_t}$ obtenues pour F_1 seul, F_2 seul et l'association $F_1 + F_2$ sont respectivement égales à 0.170, 0.300 et 0.500. Rappelons que, dans des conditions identiques, les valeurs de $\log \frac{T_0}{T_t}$ relatives à la lyse de *S. aureus* S vivant sont de 0.160, 0.000 et 0.610; de même, celles relatives à la lyse de *S. pyogenes* vivant sont de 0.130, 0.000 et 0.190.

1) Il est certain que la fraction A doit à l'agent staphylo-lytique F_1 au moins une partie de son activité sur le pneumocoque vivant.

2) La pneumolyse par la fraction F₂ brute ne semble pas pouvoir être attribuée à l'agent staphylolytique qu'elle contient.

En effet, isolément peu active sur *S. aureus* S vivant, cette fraction est très efficace sur *S. pneumoniae* vivant; associée à F₁ purifié, elle n'exerce, contrairement à ce qui se passe dans la staphylolyse, qu'un effet synergique négligeable sur la pneumolyse.

On remarquera encore que les actions pneumolytiques de la fraction F₂ brute et de la fraction A qui contient les deux agents staphylolytiques (voir figures 23 et 24), ne sont nullement comparables. Au contraire, une diminution de la force ionique favorise la pneumolyse par la fraction F₂ brute, d'une part, et la fraction N, d'autre part. Or, cette dernière ne contient certainement pas l'agent staphylolytique présent dans F₂ brut.

Il résulte donc de tout ceci qu'une partie au moins des activités pneumolytiques de la fraction N peut être attribuée à un agent spécifique que l'on retrouverait également dans la fraction F₂ brute.

d) Conclusions

Les conclusions sont comparables à celles relatives à la streptolyse. L'agent staphylolytique F₁ est responsable d'une partie de l'activité lytique de l'actinomycétine sur le pneumocoque vivant. Mais celle-ci renferme, en plus, un ou plusieurs principes spécialement adaptés à la pneumolyse.

C. — Distribution des activités staphylolytique, streptolytique et pneumolytique dans les filtrats de culture des streptomycètes

La présence des trois activités bactériolytiques sur *S. aureus* H, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* vivants a été recherchée dans les filtrats de culture d'une centaine de souches de *Streptomyces* (BERGAMINI, GHUYSEN et WELSCH, 1954; WELSCH, 1954).

Dans toutes les recherches d'activité bactériolytique, l'actinomycétine étudiée est ajoutée à raison de 10 % en volume à une suspension microbienne en eau distillée. Pour la staphylolyse, les filtrats sont considérés comme inactifs (I) s'ils ne provoquent

qu'une réduction de trouble inférieure à 10 % en quatre heures, modérément actifs (II) lorsque la clarification atteint de 11 à 25 %, actifs (III) si elle s'élève entre 26 et 50 %, très actifs (IV) lorsque cette valeur est dépassée.

Pour la streptolyse, les indications correspondantes, mais valables pour une heure d'incubation seulement, sont : I = moins de 15 ; II = 16 à 40 ; III = 40 à 70 et IV = plus de 70 %.

Pour la pneumolyse, trois classes d'activité seulement ont été établies d'après la réduction de trouble observée après deux heures d'incubation : I = moins de 20 ; II = 20 à 50 et III plus de 50 %.

Les observations sont résumées dans les tableaux XXVI et XXVII.

1) Les diverses activités bactériolytiques s'exercent avec une fréquence décroissante, sur le pneumocoque (73 %), le streptocoque (48 %) et enfin le staphylocoque (29 %).

2) Environ un quart des cultures lyse les trois substrats microbiens utilisés (24 %). Un second quart ne dissout que deux d'entre eux (24 %) ; c'est généralement alors le staphylocoque, qui résiste. Un troisième quart ne s'attaque qu'à un seul substrat bactérien (30 %), le plus souvent, il s'agit du pneumocoque.

TABLEAU XXVI

Répartition des filtrats de culture de 100 *Streptomyces* spp. en groupes basés sur leurs activités bactériolytiques

Groupe	Nombre de filtrats assurant la bactériolyse de		
	<i>S. aureus</i> H	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>
I	71	52	27
II	11	36	40
III	16	8	33
IV	2	4	—
Total	100	100	100

TABLEAU XXVII.

Fréquence des activités bactériolytiques de filtrats de culture de 100 *Streptomyces* spp.

Nombre de substrats sensibles (x)	Nombre de filtrats assurant la lyse de			
	<i>S. aureus</i> H	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	x substrat(s)
3	24	24	24	24
2	1	1	0	24
	2 0	0 21	2 21	
1	2	0	0	30
	0	2	0	
	0	0	26	
0	0	0	0	22
Total	29	48	73	100

Enfin, 22 % des cultures sont dépourvues de toute action bactériolytique appréciable.

3) Les activités bactériolytiques étudiées sont donc fréquemment associées dans les actinomycétines, mais il n'existe pas de corrélation étroite entre elles.

D. — Action des agents F₁ et F₂ sur les parois cellulaires

a) Spectre bactériolytique

Nous avons commencé à établir le spectre bactériolytique de l'actinomycétine en utilisant comme substrat les parois cellulaires elles-mêmes. A l'heure actuelle, 7 types de parois cellulaires ont été examinés et nous résumerons brièvement nos observations (SALTON et GHUYSEN, 1957).

Les parois cellulaires ont été soumises à l'action de F₁ purifié et de F₂ brut, utilisés, séparément ou en association, à la concen-

tration de 10 µg./ml., dans des milieux de pH 7 (KH₂PO₄ — K₂HPO₄) et de force ionique variable, comprise entre 0.11 et 0.002.

Les parois cellulaires peuvent être classées en trois groupes (tableau XXVIII).

Dans le groupe I (*Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Sporosarcina ureæ*, *Clostridium welchii*), la force ionique optimale

TABLEAU XXVIII

Activité de F₁ purifié et F₂ brut (10 µg./ml.) sur les parois cellulaires de diverses bactéries

Groupe	Espèces et souches	Force ionique optimale pour l'activité de			Temps de demi-lyse, en minutes, aux forces ioniques optimales, par		
		F ₁	F ₂ ⁽¹⁾	F ₁ + F ₂	F ₁	F ₂ ⁽¹⁾	F ₁ + F ₂
I	<i>B. megaterium</i>	0.05 à 0.11	—	0.05 à 0.11	30	—	<<30
	<i>B. cereus</i>	0.05	—	0.05	100	—	90
	<i>S. ureæ</i>	>0.11	—	>0.11	100	—	60
	<i>S. aureus</i> S	0.01	—	0.01	135	—	105
	<i>S. aureus</i> H	0.01	—	0.01	240	—	190
	<i>C. welchii</i>	0.01	—	0.01	600 ⁽²⁾	—	380 ⁽²⁾
	<i>S. aureus</i> S	0.01	—	0.01	135	—	105
II	<i>M. lysodeikticus</i>	0.03	0.002 ou moins	0.015	180	300	90
III	<i>S. lutea</i>	0.002 à 0.11	0.002 ou moins	0.002 ou moins	>500	320	140

⁽¹⁾ L'activité de F₂ sur les parois du groupe I étant négligeable, ni la force ionique optimale, ni le temps de demi-lyse n'ont pu être déterminés.

⁽²⁾ Ces valeurs ne peuvent être comparées avec celles des autres parois cellulaires. En effet, les parois de *C. welchii* ayant été lyophilisées, donnent un trouble non homogène et se sédimentent très rapidement.

pour l'activité de l'association $F_1 + F_2$ est la même que pour celle de F_1 seul. Sa valeur est variable selon le type de paroi (de 0.01 à des valeurs supérieures à 0.11), ainsi que le montrent, par exemple, les figures 31, 32 et 43 relatives à l'influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *S. aureus* S, *S. aureus* H et *S. ureæ*. Dans ce groupe, F_2 seul est faiblement lytique, tandis que F_1 peut, isolément, assurer la bactériolyse.

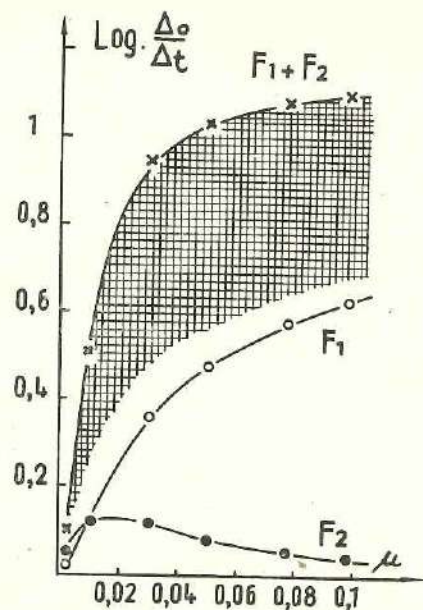


FIGURE 43. — Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *Sporosarcina ureæ* par les fractions F_1 purifiée et F_2 brute, utilisées isolément ou en association.

Mêmes conditions et même représentation que pour la figure 31 (SALTON et GHUYSEN, 1957).

Le groupe II renferme les parois de *M. lysodeikticus* (figure 44). F_1 et F_2 , seuls, ont, en milieu de force ionique optimale, des activités comparables. La force ionique optimale pour l'association $F_1 + F_2$ est comprise entre les forces ioniques respectivement optimales pour F_1 et F_2 seuls.

Les parois de *S. lutea* constituent le groupe III (figure 45). La force ionique est ici, dans les limites étudiées, sans effet sur l'activité de F_1 . D'autre part, F_2 agissant en milieu de

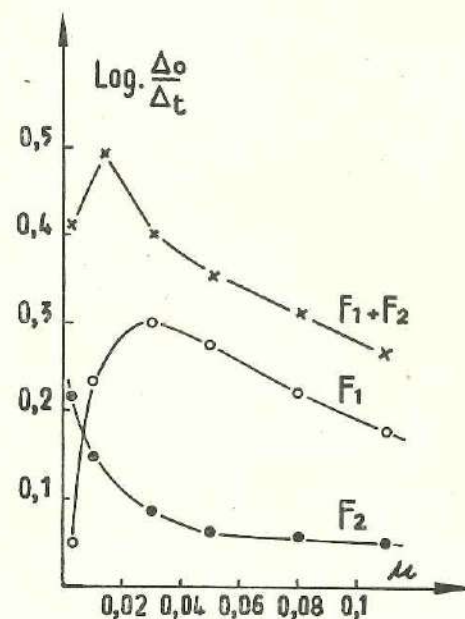


FIGURE 44. — Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *Micrococcus lysodeikticus* par les fractions F_1 (purifiée) et F_2 (brute), utilisées isolément ou en association.

Mêmes conditions et même représentation que pour la figure 31 (SALTON et GHUYSEN, 1957).

force ionique optimale possède une activité supérieure à celle de F_1 . Enfin, la force ionique optimale pour l'activité de l'association $F_1 + F_2$ est égale à celle qui est la plus favorable pour l'action de F_2 .

En passant du groupe I au groupe III, l'activité bactériolytique de F_2 devient prépondérante. Toutefois, quel que soit le groupe, l'association $F_1 + F_2$ est synergique et permet à la lyse de se dérouler suivant une cinétique d'ordre I (figure 33). L'intensité de l'effet synergique dépend de la nature des parois et des traitements qui leur sont appliqués lors de leur préparation. En particulier, un pré-traitement à la trypsine, sans abolir l'effet synergique sur la lyse des parois de *S. aureus* S, diminue son intensité, quoique, d'autre part, les vitesses de lyse par F_1 et F_2 seuls ne soient pas affectées.

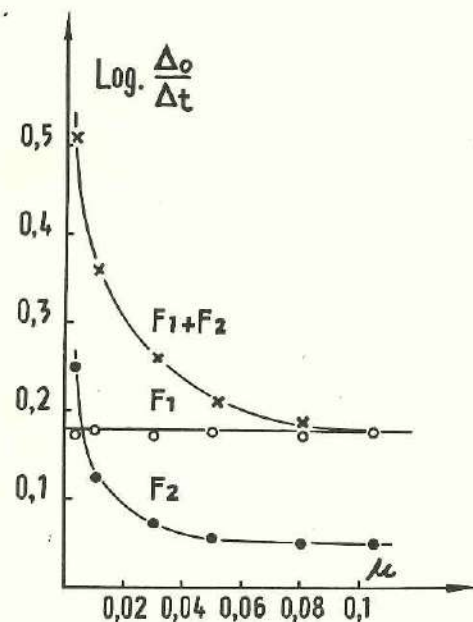


FIGURE 45. — Influence de la force ionique sur la lyse des parois cellulaires de *Sarcina lutea* par les fractions F_1 (purifiée) et F_2 (brute), utilisées isolément ou en association.

Mêmes conditions et même représentation que pour la figure 31; toutefois, la durée d'incubation est ici de 230 min. (SALTON et GHUYSEN, 1957).

b) Homogénéité enzymatique de F_2 brut

Les diverses manifestations bactériolytiques de F_2 brut sont-elles attribuables au principe staphylolytique complémentaire qu'elle contient ?

Faute de F_2 purifié en quantité suffisante, il ne nous a pas été possible d'examiner cette question pour toutes les parois étudiées. Cependant, dans le cas de la bactériolyse des parois de *S. lutea*, la figure 39 montre que, après chromatographies successives de F_2 brut sur XE64 à pH 6.1, l'activité directement sarcinolytique et l'activité complémentaire staphylolytique restent indissociables; ce qui est un indice de l'unicité probable des agents responsables.

c) Nature de l'activité enzymatique

1) L'action de F_1 et de F_2 sur les parois cellulaires est certainement liée à la charge électrique de celles-ci. En effet, en rempla-

çant, par traitement au fluordinitrobenzène (2), leurs groupes NH_2 libres, par $\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3-(\text{NO}_2)_2$, on modifie profondément leur sensibilité à nos enzymes de même que les valeurs de force ionique optimales pour leur activité.

Un cas suggestif est donné par les parois de *M. lysodeikticus* dont les dérivés dinitrophénoliques restent sensibles à F_1 , mais avec un optimum de force ionique passant à plus de 0.10 au lieu de 0.03. D'autre part, les parois ainsi modifiées sont devenues pratiquement résistantes à F_2 , si bien qu'elles se comportent comme un substrat du groupe I.

2) Les parois examinées sont certainement de nature très différente, mais leur appartenance à un groupe déterminé n'a aucun rapport avec leur composition chimique globale. Nous avons donné un aperçu de celle-ci pages 174(II) et 181. Précisons ici (14, a) que l'alanine, l'acide glutamique, la glycine et la lysine sont les principaux acides aminés entrant dans la constitution des parois examinées. Les deux premiers se retrouvent abondamment dans toutes celles-ci. Toutefois, les parois des *Bacillus* spp. ne contiennent pas ou peu de glycine et de lysine. La lysine semble être également absente des parois de *C. welchii*. Mais, par contre, *Bacillus* spp. et *C. welchii* renferment de fortes quantités d'acide α — ϵ diaminopimélique. La glucosamine et un second sucre aminé, non encore identifié, entrent dans la constitution des parois étudiées. Celles de *C. welchii* contiennent en outre un troisième sucre aminé : la galactosamine.

3) Les produits de dégradation dialysables obtenus après digestion enzymatique des parois ont été examinés (14, b, c).

a) La recherche des sucres et sucres aminés est négative; ce qui, d'emblée, différencie nos enzymes du lysozyme et de l'enzyme streptolytique de McCARTY; F_1 et F_2 ne sont pas des polysaccharidases.

b) Au contraire, les fractions dialysables réagissent fortement à la ninhydrine, et, par chromatographie en pyridine-eau, on observe la présence de une ou deux substances, suivant les cas, migrant avec des R_F déterminés et se détachant sur une traînée de fonds faiblement positive.

c) Une étude plus détaillée de ces substances ninhydrine-positives montre qu'elles sont certainement constituées par

de petites peptides dialysables, non encore identifiés, et des acides aminés qui, pour toutes les parois lysées, sont toujours la glycine ou l'alanine ou ces deux acides aminés ensemble. Le tableau XXIX donne, faute de déterminations quantitatives, une évaluation approximative des acides aminés libérés par la digestion enzymatique. Aucune différence n'est observée lorsque la lyse est réalisée par F_1 ou F_2 ou $F_1 + F_2$. Seules les parois du groupe I libèrent certainement de l'alanine. De plus, les parois de *M. lysodeikticus* (groupe II), lysées après avoir été transformées par le fluordinitrobenzène, semblent également libérer de l'alanine et se comporter ainsi comme les substrats du groupe I.

d) F_1 est probablement une endopeptidase stricte. Il est en tout cas inactif sur les dipeptides glycyglycine, DL-alanyl-DL-alanine, glycy-DL-alanine et DL-alanyl-glycine. La dégradation éventuelle des dipeptides a été recherchée par chromatographie en phénol- NH_3 et en mesurant l'intensité de la coloration à la nynthridine par le procédé de COCKING et YEMW (1954).

TABLEAU XXIX

Acides aminés libérés en quantité appréciable
par digestion enzymatique des parois cellulaires de diverses bactéries

Parois cellulaires de	Enzyme utilisé	Alanine	Glycine
<i>S. aureus</i> H	F_1 ou $F_1 + F_2$	+++	—
<i>S. aureus</i> S	F_1 ou $F_1 + F_2$	+++	—
<i>Idem</i> , traité par le F. D. N. B. (*)	F_1	+	++
<i>B. megaterium</i>	$F_1 + F_2$	++	—
<i>B. subtilis</i>	F_1	+	—
<i>C. welchii</i>	F_1	+	+++
<i>M. lysodeikticus</i>	F_1 ou F_2 ou $F_1 + F_2$	—	++
<i>Idem</i> , traité par le F. D. N. B. (*)	F_1	+	++
<i>S. lutea</i>	F_1 ou F_2 ou $F_1 + F_2$	—	++

(*) I, fluor 2.4 dinitrobenzène (SALTON et GHUYSEN, 1957).

e) Enfin, l'alanine, libérée des parois staphylococciques sous l'action de F_1 ou $F_1 + F_2$, puis incubée en présence de D aminoacide-oxydase, se transforme, au moins partiellement, en acide pyruvique. Faute de détermination quantitative, nous ignorons cependant si l'alanine libérée est exclusivement sous la forme D.

E. — Conclusions

1) F_1 purifié et F_2 brut sont des peptidases dont l'action lytique est consécutive à l'attaque des parois cellulaires de plusieurs germes gram-positifs.

2) Cette activité peptidasique s'accompagne de la libération de petits peptides dialysables, non identifiés, et d'acides aminés qui sont toujours l'alanine ou la glycine, ou les deux ensemble.

3) Dans le cas des parois staphylococciques, l'alanine libérée est, au moins partiellement, sous la forme D.

4) F_1 semble être une endopeptidase stricte.

5) On peut classer les parois examinées en trois groupes suivant leur sensibilité aux deux préparations enzymatiques.

6) L'enzyme purifié F_1 intervient certainement dans toutes les bactériolyses que nous avons étudiées. Il n'est cependant pas démontré que chacune de celles-ci soit pleinement réalisée par l'association à F_1 , du même enzyme staphylolytique complémentaire F_2 . Si ce dernier paraît s'identifier à l'enzyme sarcinolytique contenu dans la préparation F_2 brut, il est bien établi, d'autre part, que certains types de bactériolyse font intervenir d'autres systèmes plus spécifiques; c'est le cas de la pneumolyse et de la streptolyse.

7) Etant donné la nature peptidasique de F_1 et F_2 , il est possible que, contrairement au lysozyme, leur action puisse ne pas se limiter aux parois cellulaires mais s'exercer aussi sur les protéines du corps microbien. On comprend que, dans ce cas, ils puissent éventuellement contribuer à la dissolution complète des suspensions staphylococciques chauffées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Arrivé au terme de l'exposé de nos recherches, nous en dégagerons les résultats essentiels.

A. — Bactériolyse du staphylocoque par l'actinomycétine

1) L'actinomycétine renferme un premier enzyme, F_1 , qui, à lui seul, est capable d'assurer la staphylolyse. Son activité se manifeste le mieux à pH 7 et force ionique 0.01.

2) L'activité de F_1 est spécifique. Cet agent est en effet distinct des autres principes lytiques de l'actinomycétine qui lysent les bactéries chauffées (actinozyme) ou digèrent divers substrats protéiniques, telles la caséine et la kératine. Il présente, en particulier, un caractère nettement basique, grâce auquel il est possible de le séparer et de le purifier par chromatographie sur amberlite IRC50.

3) F_1 est une protéine dont la constante de sédimentation, en unités SVEDBERG, est égale à 2.3 à pH 7.5 (μ 0.1). Son hydrolyse acide libère la plupart des acides aminés communément rencontrés dans les protéines. Notre préparation reste contaminée par des constituants de faible poids moléculaire. Cependant, l'application de la méthode du coefficient catalytique témoigne de sa grande pureté enzymatique.

4) F_1 est une peptidase, probablement une endopeptidase stricte. Elle attaque un constituant des parois cellulaires staphylococciques avec libération de petits peptides et d'alanine. Une partie au moins de celle-ci est de la forme D. Le matériel non dialysable obtenu après digestion des parois isolées est constitué de trois ou quatre composants principaux, riches en fonctions NH_2 libres et de poids moléculaires de 10 000 à 15 000.

5) F_1 dissout les corps staphylococciques vivants, vraisemblablement par suite de la désintégration de leurs parois cellulaires.

6) L'actinomycétine renferme un second enzyme, F_2 . Son association à F_1 confère à l'actinomycétine sa pleine activité staphylolytique, cette association étant en effet fortement synergique, tant pour la lyse des cellules vivantes que pour la

digestion des parois cellulaires isolées. L'association de F_1 et F_2 assure une lyse qui se déroule suivant une cinétique d'ordre 1. L'optimum de force ionique pour l'activité de cette association est la même que pour celle de F_1 seul. Après action simultanée des deux enzymes, l'alanine reste le seul acide aminé libéré en quantité appréciable lors de la digestion des parois staphylococciques; mais il apparaît dans les fractions non dialysables, et avec certaines souches de staphylocoques seulement, un composant supplémentaire séparable par électrophorèse.

7) L'activité de F_2 est spécifique. Il se distingue également des principes colilytique, caséinolytique et kératinolytique de l'actinomycétine quoiqu'il présente avec ceux-ci beaucoup d'analogies de comportement qui en rendent la séparation très malaisée. Nous en avons toutefois obtenu une faible quantité dans un état de pureté telle que son activité staphylolytique a pu être clairement démontrée en l'absence des autres principes lytiques de l'actinomycétine.

8) La spécificité du système staphylolytique était largement démontrée avant son isolement. Suspectée par les conditions particulières qui président aussi bien à la manifestation de son activité qu'à sa production dans les cultures de *S. albus* G, elle s'est affirmée lors de l'établissement d'une épreuve d'homogénéité enzymatique basée sur les équations de cinétique, par l'étude de son adsorption sur substrats microbiens, par son comportement lors d'expériences d'extraction fractionnée. Cette dernière technique démontrait en plus la complexité du système.

9) La lyse des staphylocoques chauffés est, en ordre principal, attribuable à l'actinozyme. Mais l'étude comparée des cinétiques de réaction présentées par la lyse de *S. aureus* vivant, *S. aureus* chauffé et *E. coli* chauffée, montre qu'après inhibition de l'actinozyme, la clarification des suspensions de staphylocoques chauffés peut également être provoquée par le système staphylolytique. L'isolement ultérieur de F_1 et F_2 a entièrement confirmé ce point de vue.

L'action directe du système staphylolytique sur le protoplasme bactérien, natif ou coagulé par la chaleur, n'a pas été recherchée.

B. — Bactériolyse d'autres germes gram-positifs vivants par l'actinomycétine

1) F_1 intervient certainement dans la lyse par l'actinomycétine de plusieurs autres germes gram positifs vivants : streptocoques, pneumocoques, *Bacillus* spp., *Sarcina lutea*, *Sporosarcina ureæ*, *Clostridium welchii*, *Micrococcus lysodeikticus*. Les parois cellulaires de ces germes, à l'exception des streptocoques et pneumocoques qui n'ont pas été examinés à ce point de vue, sont digérées par cet enzyme. Leur digestion s'accompagne de la libération d'alanine ou de glycine ou d'un mélange de ces deux acides aminés. La nature peptidasique de F_1 est donc pleinement confirmée.

2) La fraction F_2 non purifiée est également active sur les diverses parois isolées que nous avons examinées. Seule ou associée à F_1 , elle attaque les parois cellulaires ou favorise leur digestion, suivant les cas, avec chaque fois libération des mêmes acides aminés : glycine ou alanine ou les deux. Son action est donc également de nature peptidasique. De plus, l'association $F_1 + F_2$ est toujours synergique et permet à la digestion de se dérouler suivant une réaction pseudomonomoléculaire. Il est donc vraisemblable que l'enzyme staphylolytique F_2 joue un rôle aussi général dans la bactériolyse des germes gram positifs que l'enzyme staphylolytique F_1 . En raison des difficultés d'obtention de l'enzyme F_2 purifié, cette hypothèse n'a pas pu être démontrée dans tous les cas étudiés. Elle se vérifie cependant pour les parois de *S. lutea* qui, en l'absence de F_1 , peuvent être digérées aussi bien par la fraction F_2 brute que par l'enzyme staphylolytique F_2 purifié.

3) Il existe des différences quantitatives dans la sensibilité des diverses parois microbiennes à nos peptidases. Les parois de diverses souches de *S. aureus*, de *Bacillus* spp., de *S. ureæ* et de *C. welchii* sont particulièrement sensibles à F_1 . Au contraire, les parois de *M. lysodeikticus*, et surtout de *S. lutea*, sont très sensibles à l'action de F_2 .

4) De même, l'optimum de force ionique assurant l'activité maximale de nos enzymes diffère dans chaque cas particulier. Il semble être, entre autres choses, fonction de la charge électrique

des parois cellulaires. A l'appui de cette assertion, rappelons qu'il est différent pour les parois normales ou chimiquement transformées par combinaison de leurs radicaux NH_2 libres avec le fluordinitrobenzène.

5) L'agent staphylolytique F_2 n'a pas d'action sur les streptocoques et les pneumocoques. Les activités streptolytique et pneumolytique de l'actinomycétine ne peuvent cependant pas être uniquement attribuées à l'action de F_1 . Il est certain, en effet, que l'actinomycétine renferme d'autres systèmes lytiques plus spécifiquement adaptés à la bactériolyse de ces germes. Ces systèmes ont été clairement mis en évidence, mais n'ont pas été étudiés en détail.

6) La conception selon laquelle la rigidité structurale des parois cellulaires de *M. lysodeikticus* serait due exclusivement à ses mucoïdes constitutifs, ne peut guère être retenue. En effet, la lyse de ce microorganisme peut être obtenue par des enzymes très différents, le lysozyme, qui est une polysaccharidase, et les enzymes F_1 et F_2 , qui sont des peptidases, agissant cependant tous au niveau de la paroi cellulaire. Les chaînes peptidiques de celles-ci doivent donc jouer un rôle de même importance que les mucoïdes.

Nous proposons de désigner les enzymes bactériolytiques F_1 et F_2 sous les noms d'actinolysopeptidases I et II. L'actinolysopeptidase I est particulièrement active sur *S. aureus*. L'actinolysopeptidase II est particulièrement active sur *S. lutea*. Ces deux peptidases sont également actives sur *M. lysodeikticus*. Dans chaque cas, leur association est synergique.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHER, R., JUTISZ, M., FROMAGEOT, C. et CHAUVET, J. (1952). — *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 442.
- ACHER, R., THAUREAUX, J., CROCHER, C., JUTISZ, M. et FROMAGEOT, C. (1952). — *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 339.
- ALBERT, A. (1951). — *Selective Toxicity*, Methuen's Monographs on Biochemical Subjects, London.
- ALBERTON, G., WORD, W. H. et FEVOLD, H. L. (1945). — *J. biol. Chem.*, **157**, 43.
- AMINOFF, D., MORGAN, W. T. J. et WATKINS, W. M. (1952). — *Biochem. J.*, **51**, 379.
- ANDERSEN, E. A. et ALBERTY, R. A. (1948). — *J. Phys. and coll. Chem.*, **32**, 1345.
- AUCLAIR, J. M. et PATTON, R. L. (1950). — *Rev. Canad. Biol.*, **9**, 3.
- BERGAMINI, L., GHUYSEN, J. M. et WELSCH, M. (1954). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **148**, 733.
- BLACKBURN, S. et LOWTHER, A. G. (1951). — *Biochem. J.*, **158**, 126.
- BOARDMAN, N. K. et PARTRIDGE, S. M. (1953). — *Nature*, **171**, 208.
- BORN, V. R. (1952). — *J. gen. Microbiol.*, **6**, 344.
- CALIFANO, L. (1952). — *Bull. O. M. S.*, **6**, 19.
- COCKING, E. C. et YEMW, E. W. (1954). — *Biochem. J.*, **58**, xii.
- DATH, S. (1927). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **97**, 1194.
- DEBRIEN, Y. et REYNAUD, J. (1955). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **149**, 743.
- DESREUX, V. (1948). — *Bull. Soc. chim. belges*, **57**, 146.
- DESREUX, V. (1949). — *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **68**, 780.
- DESREUX, V. et GHUYSEN, J. M. (1951). — *Bull. Soc. chim. belges*, **60**, 410.
- DESREUX, V. et OTH, A. (1952). — *Chemisch Weekblad*, **48**, 247.
- DESREUX, V. et SPIEGELS, M. C. (1950). — *Bull. Soc. chim. belges*, **59**, 476.
- DUBOS, R. J. et AVERY, P. T. (1931). — *J. exp. Med.*, **54**, 51.
- EPSTEIN, L. A. et CHAIN, E. (1940). — *Brit. J. exp. Pathol.*, **21**, 339.
- FEVOLD, H. L. et ALBERTON, G. (1949). — *Biochem. Preparations*, **1**, 67.
- FLEMING, A. (1922). — *Proc. roy. Soc.*, London, Ser. B., **93**, 306.
- FLEMING, A. (1929). — *Brit. J. exp. Pathol.*, **10**, 226.
- FRUTON, J. S., IRVING, G. W. et BERGMANN, M. (1941). — *J. biol. Chem.*, **138**, 249; **141**, 763.
- GALE, E. F. et MITCHELL, P. D. (1949). — *J. gen. Microbiol.*, **3**, 369.
- GARDELL, S., HELJENAKJÖLD, F. et ROGH-NORLUND, A. (1950). — *Acta chem. scand.*, **4**, 970.

- GHUYSEN, J. M. (1952). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **146**, 1268.
- GHUYSEN, J. M. (1953a). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **146**, 1812.
- GHUYSEN, J. M. (1953b). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **147**, 1502.
- GHUYSEN, J. M. (1954a). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **149**, 729.
- GHUYSEN, J. M. (1954b). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **148**, 1283.
- GORINI, L. (1950). — *Biochim. biophys. Acta*, **6**, 237.
- GORINI, L. (1951). — *Biochim. biophys. Acta*, **7**, 318.
- GORINI, L. et AUDRAIN, L. (1952a). — *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 702.
- GORINI, L. et AUDRAIN, L. (1952b). — *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 160.
- GORINI, L. et AUDRAIN, L. (1953). — *Biochim. biophys. Acta*, **10**, 570.
- GORINI, L. et FELIX, F. (1953). — *Biochim. biophys. Acta*, **11**, 535.
- GRATIA, A. (1926). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **95**, 734.
- GRATIA, A. et ALEXANDER, J. (1931). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **106**, 1288.
- GRATIA, A. et DATH, S. (1924a). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **91**, 1442.
- GRATIA, A. et DATH, S. (1924b). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **92**, 461.
- GRATIA, A. et DATH, S. (1925a). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **93**, 1125.
- GRATIA, A. et DATH, S. (1925b). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **91**, 451.
- GRATIA, A. et DATH, S. (1926). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **94**, 1267.
- GRATIA, A. et RHODES, B. (1924). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **91**, 640.
- GRATIA, A. et RHODES, B. (1926). — *Lancet*, **I**, 204.
- GREEN, A. A. (1923). — *J. Amer. chem. Soc.*, **60**, 2331.
- HICKEY, J. (1945). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **8**, 439.
- HIRS, C. H. W. (1953). — *J. biol. Chem.*, **205**, 93.
- HIRS, C. H. W., MOORE, S. et STEIN, W. H. (1953). — *J. biol. Chem.*, **200**, 493.
- HOLDSWORTH, E. S. (1952). — *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 110; **9**, 19.
- HUGO, W. B. (1954). — *Bacteriological Rev.*, **2**, 87.
- IRVING, H. et WILLIAMS, R. J. (1943). — *Nature*, **162**, 746.
- JERMYN, M. A. et ISHERWOOD, F. A. (1949). — *Biochem. J.*, **44**, 402.
- JONES, A. S., STACEY, M. et WEBB, M. (1949). — *Biochim. biophys. Acta*, **3**, 383.
- JONES, A. S., SWALLOW, A. J. et WEBB, M. (1948). — *Biochim. biophys. Acta*, **2**, 167.
- KANTOROWIECZ, A. (1909). — *Münch. med. Wochenschr.*, **56**, 897, 1419.
- LANCEFIELD, R. C. (1949). — *J. exp. Med.*, **78**, 465.
- LIESKE, R. (1921). — *Morphologie und Biologie der Strahlenpitze*, Borntraeger, Leipzig.
- LOWRY, O. R., ROSEBROUGH, N. J., FAIR, A. L. et RANDALL, R. J. (1951). — *J. biol. Chem.*, **193**, 265.
- LUNDGREN, H. P., STEIN, A. M., KOORN, V. M. et O'CONNEL, R. A. (1948). — *J. Phys. and coll. Chem.*, **52**, 180.
- MARGOLIASH, E. (1954). — *Biochem. J.*, **56**, 529.
- MAXTED, W. R. (1948). — *Lancet*, **II**, 255.
- MCCARTY, M. (1952). — *J. exp. Med.*, **96**, 555, 569.
- MELLOR, D. P. et MALEY, L. (1948). — *Nature*, **161**, 436.
- MEYER, K., PALMER, J. W., THOMPSON, R. et KHORAZO, D. (1936). — *J. biol. Chem.*, **113**, 479.
- MICHAELIS, L. et MENTEN, M. L. (1913). — *Biochem. J.*, **49**, 333.
- MICKLE, H. (1948). — *J. R. Micr. Soc.*, **68**, 10.
- MILLER, G. L. et GOLDBER, R. H. (1950). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **20**, 420.

- MITCHELL, P. et MOYLE, J. (1951). — *J. gen. Microbiol.*, **5**, 981.
 MORGAN, G. et DREW, H. (1920). — *J. Chem. Soc.*, **117**, 1456.
 MUGGLETON, P. W. et WEBB, M. (1952). — *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 431 et 526.
 OCHOA, S. (1951). — *Physiol. Rev.*, **31**, 56.
 OCHOA, S., VEIGA SALLÉS, J. B. et ORITZ, P. J. (1950). — *J. biol. Chem.*, **187**, 863.
 PALÉUS, S. et NEILANDS, J. B. (1950). — *Acta chem. scand.*, **4**, 1024.
 PARTRIDGE, S. M. (1949). — *Nature*, **164**, 443.
 PRINS, K. K. et HUISMAN, T. H. J. (1955). — *Nature*, **175**, 903.
 RHULAND, L. E., WORK, E., DEAMAN, R. F. et HOARE, D. S. (1955). — *J. Amer. chem. Soc.*, **77**, 4844.
 RYDON, H. N. et SMITH, P. W. G. (1952). — *Nature*, **169**, 922.
 SALMON, J. (1949). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **143**, 717, 993.
 SALMON, J. (1950). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **144**, 715, 978, 1289.
 SALMON, J. (1951). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **145**, 776, 1413.
 SALMON, J. (1952). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **146**, 792.
 SALTON, M. R. J. (1952a). — *Nature*, **170**, 746.
 SALTON, M. R. J. (1952b). — *Biochim. biophys. Acta*, **8**, 510.
 SALTON, M. R. J. (1952c). — *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 334.
 SALTON, M. R. J. (1953a). — *Biochim. biophys. Acta*, **10**, 512.
 SALTON, M. R. J. (1953b). — *J. gen. Microbiol.*, **9**, 512.
 SALTON, M. R. J. (1954). — *J. gen. Microbiol.*, **11**, IX.
 SALTON, M. R. J. (1956). — Dans *Bacterial Anatomy*. The sixth Symposium of the Society of general Microbiology. Cambridge, p. 92.
 SALTON, M. R. J. et GHUYSEN, J. M. (1957). — *Biochim. biophys. Acta* (sous presse).
 SALTON, M. R. J. et HORNE, R. W. (1951a). — *Biochim. biophys. Acta*, **7**, 10.
 SALTON, M. R. J. et HORNE, R. W. (1951b). — *Biochim. biophys. Acta*, **7**, 177.
 SALTON, M. R. J. et INGRAM, V. (1957). — *Biochim. biophys. Acta* (sous presse).
 SALTON, M. R. J. et McQUILLON, K. (1955). — *Biochim. biophys. Acta*, **17**, 465.
 SANGER, F. (1945). — *Biochem. J.*, **39**, 507.
 SCHROEDER, W. A. (1952). — *J. Amer. chem. Soc.*, **74**, 281.
 SHANKAR, K. et BARD, R. C. (1955). — *J. Bacteriol.*, **69**, 436, 444.
 SMITH, E. L. (1948a). — *J. biol. Chem.*, **173**, 571.
 SMITH, E. L. (1948b). — *J. biol. Chem.*, **176**, 21.
 SMITH, E. L. (1949a). — *Proc. nat. Acad. Sci.*, Wash., **35**, 80.
 SMITH, E. L. (1949b). — *Fed. Proc.*, **8**, 581.
 SMITH, G. N. et STOCKER, E. (1949). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **21**, 383.
 SMOLIAR, V. (1949). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **143**, 1147.
 SMOLIAR, V. (1952). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **146**, 1620.
 STEFFYN, P. S. et JEANLOZ, R. W. (1954). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 373.
 TAI, T. Y. et van HEYNINGEN, W. E. (1951). — *J. gen. Microbiol.*, **5**, 110.
 TALLAN, H. H. et STEIN, W. H. (1953). — *J. biol. Chem.*, **200**, 507.
 THOMPSON, A. R. (1952). — *Nature*, **169**, 495.
 VAN SLYKE, D. D. (1942). — *Advanc. Enzymol.*, **2**, 33.
 WAKSMAN, S. A. (1918). — *J. Bacteriol.*, **3**, 509.
 WAKSMAN, S. A. (1927). — *Principles of soil Microbiology*. Williams and Williams Co., p. 304.
 WEBB, M. (1948). — *J. gen. Microbiol.*, **2**, 275.

- WEBB, M. (1949). — *J. gen. Microbiol.*, **3**, 410.
 WEBB, M. (1951a). — *J. gen. Microbiol.*, **5**, 480.
 WEBB, M. (1951b). — *J. gen. Microbiol.*, **5**, 484.
 WEBB, M. (1953). — *Science*, **118**, 607.
 WEIBULL, C. (1953). — *J. Bacteriol.*, **66**, 688.
 WEIBULL, C. (1956). — Dans *Bacterial Anatomy*. The sixth Symposium of the Society of General Microbiology. Cambridge, p. 111.
 WELSCH, M. (1937). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **126**, 244.
 WELSCH, M. (1947a). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **29**, 4.
 WELSCH, M. (1947b). — *Rev. belge Pathol. Méd. exp.*, **28**, suppl. 2, p. 1-315.
 WELSCH, M. (1948). — *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 1589.
 WELSCH, M. (1954). — *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 694.
 WELSCH, M. et DELCAMBE, L. (1951). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 488.
 WELSCH, M. et DELCAMBE, L. (1954). — *C. R. XXVII Congr. Chim. ind. Bruxelles*, **3**, 803.
 WELSCH, M. et GHUYSEN, J. M. (1953). — *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **147**, 1659.
 WELSCH, M. et GHUYSEN, J. M. (1957). — *Giorn. Microbiol.*, (sous presse).
 WELSCH, M. et SALMON, J. (1949). — *J. gen. Microbiol.*, **27**, 3.
 WELSCH, M. et SALMON, J. (1950). — *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 802.
 WETTER, L. R. et DEUTSCH, H. F. (1951). — *J. biol. Chem.*, **192**, 237.
 ZELLER, E. A. (1949). — *Helv. Chim. Acta*, **32**, 94.
 ZELLER, E. A. et UTZ, D. C. (1949). — *Helv. Chim. Acta*, **32**, 338.

Je désire vivement profiter de l'occasion qui se présente pour remercier les personnes qui, depuis plusieurs années, me conseillent, me dirigent et m'aident.

C'est à Messieurs les Professeurs BAUDRENCHEN, VIVARIO et STAINIER que je dois l'orientation de mes études. Jeune étudiant, j'ai à tout moment, trouvé auprès d'eux l'encouragement et les conseils dont j'avais besoin.

C'est par sa cordialité et son dynamisme que Monsieur le Professeur DESREUX m'a donné le goût de la recherche et des problèmes biologiques. C'est avec une émotion vraie que je me souviens des trois années passées dans son service de Chimie Physique. Qu'il veuille bien accepter ici l'expression de toute ma gratitude.

Le travail exposé dans ce mémoire a été réalisé dans les laboratoires de Monsieur le Professeur WELSCH. J'ai reçu de lui tout ce qu'un disciple peut trouver chez un Maître. Me confiant un problème qui lui tenait à cœur depuis longtemps, il a suivi les progrès de mes recherches et s'est efforcé de faciliter ma tâche, sans ménager ni son temps, ni ses peines. Sa façon

directe et précise de soulever des problèmes et de discuter des conclusions ont été pour moi un grand stimulant. Je lui exprime toute ma reconnaissance et mon admiration.

J'ai eu le grand plaisir et la chance de séjourner dans le Département de Microbiologie de Monsieur le Professeur MAITLAND à Manchester. L'aide et la sympathie que lui-même et le Docteur SALTON m'ont prodiguées, m'ont été extrêmement précieuses.

Les recherches exposées dans ce mémoire n'auraient pu être entreprises sans l'attribution d'une bourse de Recherche que m'a octroyée l'INSTITUT POUR L'ENCOURAGEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE DANS L'INDUSTRIE ET L'AGRICULTURE, en 1951-1952. Je tiens à exprimer ici ma très grande gratitude à cette institution qui, d'ailleurs, est intervenue dans la suite à plusieurs reprises pour faciliter ma tâche.

Tous mes remerciements vont encore à la Direction de la SOCIÉTÉ DES LABORATOIRES LABAZ qui, après m'avoir engagé, m'a néanmoins permis de poursuivre pendant cinq ans les recherches entreprises. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a témoignée et l'aide matérielle qu'elle m'a largement dispensée.

Les nombreuses manipulations que j'ai eu à réaliser à l'usine-pilote du CENTRE DE RECHERCHES POUR LA PÉNICILLINE ET LES AUTRES ANTIBIOTIQUES, ont été menées à bien grâce à l'aide efficace et amicale du Docteur L. DELCAMBE.

Les diverses souches de staphylocoques, streptocoques et pneumocoques m'ont été procurées, avec une extrême bienveillance, par le Docteur E. JOIRIS.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Monsieur DIERICKX, ingénieur technicien, pour sa très compétente et agréable collaboration, et à Monsieur PERMENTIER, préparateur, pour son aide dévouée.

Je voudrais enfin assurer de toute ma sympathie le personnel du SERVICE DE MICROBIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE et du C. R. P. A. qui m'a grandement secondé dans les divers travaux que j'ai eu le plaisir de réaliser avec lui.