

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Juillet 1952. — Tome 83.)

COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE

PAR

Mirko BELJANSKI



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS.
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

**COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES À DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE (1)**

par MIRKO BELJANSKI.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique*
[professeur MACHEBOËUF].)

La découverte des antibiotiques pose de nombreux problèmes d'ordre biochimique et biologique. Le problème de la résistance bactérienne a fait l'objet de nombreuses recherches sur les conditions expérimentales permettant d'obtenir des souches résistantes aux toxiques ou aux antibiotiques, mais le point de vue biochimique du problème n'a pas été systématiquement abordé et l'on ignore encore quel est le processus qui est spécifiquement modifié dans les souches résistantes.

Dans notre travail nous avons essayé d'apporter quelques faits nouveaux d'ordre biochimique et biologique qui pourraient peut-être contribuer à faire connaître le déterminisme de la résistance.

Si l'on admet que chaque antibiotique agit spécifiquement sur un processus métabolique déterminé on peut, en effet, penser que la perte ou la transformation de ce processus métabolique entraîne une résistance spécifique à l'antibiotique correspondant.

Nous nous sommes proposé d'analyser le métabolisme des microbes résistants pour voir ce qui les différencie des microbes sensibles normaux de même espèce, puis de voir le comportement de cette souche vis-à-vis de certaines substances chimiques thérapeutiques différentes des antibiotiques. On sait que le fait d'être résistant à un antibiotique ne confère pas la résistance à un autre antibiotique. (La double résistance est possible [1].) Ceci laisse supposer que les processus de résistance aux divers antibiotiques ne sont pas identiques. Nous pourrions donc espérer déceler ces différences biochimiques entre les souches d'une même espèce, mais résistante chacune à un antibiotique différent.

(1) Une note préliminaire résumant les résultats obtenus pour *Staphylococcus aureus* a été publiée [2].

I. — CAS DE LA STREPTOMYCINE

A. — ETUDES SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*OBTENTION D'UNE SOUCHE DE *Staphylococcus aureus* (OXFORD)
RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE.

Une souche normale de *Staphylococcus aureus* sensible à 4 µg de streptomycine par millilitre (titrage de sensibilité par la méthode des dilutions progressives) a fait l'objet d'une série de repiquages successifs sur milieu renfermant des quantités croissantes de streptomycine. L'expérience est conduite en milieu peptoné et glucosé. On obtient, en définitive, une souche capable de se développer abondamment en vingt-quatre heures en présence de 4 000 µg de streptomycine par millilitre.

Cette souche résistante conserve sa résistance pendant quatre ou cinq repiquages au moins sur milieu sans streptomycine, et ceci est très suffisant pour permettre nos essais. Avant d'ensemencer le milieu gélosé dans les boîtes de Roux, nous avons pratiqué deux repiquages de la souche résistante dans le milieu peptoné et glucosé sans streptomycine afin d'éliminer toute influence éventuelle de traces de streptomycine pouvant être apportées par l'inoculum.

Dans les expériences qui suivent, les cultures de *Staphylococcus aureus* « résistant » furent pratiquées sur des milieux exempts de streptomycine, constitués soit par des solutions de peptone et de glucose, soit par de la gélose ordinaire.

ETUDES COMPARATIVES DE LA CROISSANCE
DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Une étude préliminaire sur la croissance des deux souches de *Staphylococcus aureus* s'imposait avant l'analyse biochimique.

On sait, en effet, que la constitution chimique des microbes varie d'une façon sensible suivant qu'ils sont examinés à des phases diverses de leur prolifération.

Nos expériences ont été réalisées en milieu peptoné et glucosé. Deux cultures de *Staphylococcus aureus* prélevées à la dix-huitième heure, l'une provenant de la souche sensible, l'autre de la souche résistante, sont diluées au moyen du milieu peptoné de façon à être ramenées à la même densité optique. On commence une série de tubes avec la même quantité d'émulsion bactérienne de même densité optique. On suit d'heure en heure

la croissance à 37° pendant vingt-quatre heures par des lectures opacimétriques avec l'appareil de Meunier, écran orangé.

Les résultats sont exprimés par les courbes suivantes (fig. 1). Les abscisses correspondent au temps et les ordonnées aux résultats des lectures opacimétriques exprimés en divisions du

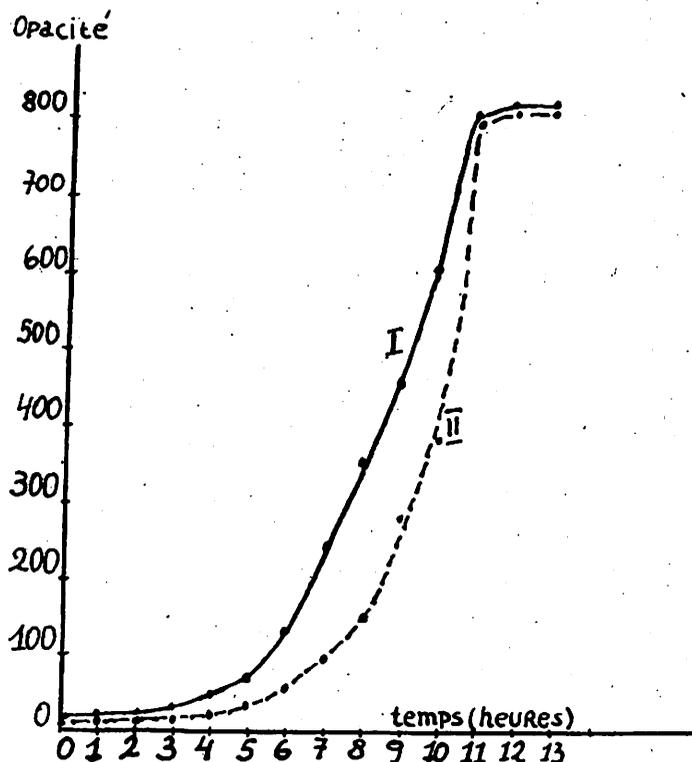


FIG. 1. — I, Courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible; II, Courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistante.

tambour gradué de l'appareil de Meunier. Le chiffre obtenu pour le témoin (l'eau peptonée) est déduit.

Les courbes nous montrent que la phase de latence des souches résistantes est nettement plus longue que celle des souches sensibles, mais à cette exception près, les courbes de croissance sont presque identiques.

La phase de latence est un phénomène complexe. Beaucoup de théories ont été proposées à son sujet.

Monod [3] montre que la durée de la phase de latence varie

pour une espèce bactérienne donnée avec l'âge de l'inoculum. Les bactéries prélevées dans une culture en phase de latence ou bien dans une vieille culture constituent un inoculum pour lequel la phase de latence sera grande. Au contraire, des bactéries prélevées dans une culture en phase exponentielle de croissance constituent un inoculum pour lequel la phase de latence sera extrêmement brève ou pratiquement nulle. Pour Monod, par conséquent, la phase de latence est explicable par l'état physiologique des bactéries inoculées dans la culture. Monod pense aussi à l'influence de substances toxiques présentes dans les milieux de culture artificiels. Ces produits toxiques seraient détruits (ou inhibés) par les bactéries pendant leur phase de latence et c'est seulement après cette destruction que la culture suivrait son destin normal de croissance.

Il se peut aussi, croyons-nous, que les toxiques auxquels pense Monod soient peut-être simplement des métabolites des cellules qui ne croissent plus, c'est-à-dire des vieilles cultures qui constituent l'inoculum habituel. Les bactéries en phase de latence prolongée sont, en effet, des bactéries provenant directement ou indirectement de telles cultures. Ce serait seulement lorsque les bactéries mises dans un milieu nutritif neuf ont pu éliminer ces métabolites ou les métaboliser, que leurs conditions biologiques redeviendraient normales. Lorsque Monod constate l'existence d'une phase de latence pour un inoculum provenant d'une culture elle-même en phase de latence, il s'adressait, en somme, à des cellules d'une vieille culture qui n'avaient pas encore terminé l'élimination des métabolites gênants. La phase de latence ainsi observée est d'autant moins longue que l'inoculum était resté lui-même préalablement plus longtemps en latence.

L'hypothèse de Monod est très intéressante, mais elle n'est pas suffisante pour expliquer tous les faits expérimentaux. En effet, on a pu démontrer [4, 5] que pendant la phase de latence la constitution chimique des bactéries se modifiait progressivement dans le sens de l'accumulation de substances nécessaires au développement et en particulier d'acides nucléiques.

On peut penser que les acides nucléiques et surtout l'acide ribonucléique, indispensable aux synthèses protéiques pendant la prolifération cellulaire, sont fabriqués pendant la période de latence et doivent s'accumuler jusqu'à une concentration suffisante pour permettre ces synthèses.

ETUDES COMPARATIVES DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Les conclusions de nos études ci-dessus sur la croissance des souches résistantes et sensibles de *Staphylococcus aureus* nous

inciterent à orienter nos premières analyses vers le domaine des acides nucléiques, et particulièrement de l'acide ribonucléique, dont on admet l'importance dans les synthèses protéiques [6, 7].

Gros et Machebœuf [9, 2, 10] ont montré que l'action de la streptomycine sur le métabolisme des bactéries se traduit plus particulièrement par des modifications profondes dans l'utilisation de l'acide ribonucléique et de ses dérivés, les mononucléotides.

Il est donc intéressant de rechercher si l'adaptation des microbes à la streptomycine ne s'accompagnerait pas de perturbations profondes dans le métabolisme des acides nucléiques.

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES
CHEZ UNE SOUCHE DE *Staphylococcus aureus*
RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE

ET CHEZ UNE SOUCHE SENSIBLE DE MÊME ESPÈCE.

La souche de *Staphylococcus aureus* résistante est la même que celle qui sert aux études sur la croissance exposées ci-dessus. Sa résistance était de l'ordre de 4 000 µg de streptomycine par millilitre. La sensibilité de la souche normale, dont elle dérivait, était de l'ordre de 4 µg par millilitre. Les expériences ont été conduites dans des boîtes de Roux, sur bouillon gélosé.

TECHNIQUES. — Deux séries de boîtes de Roux furent ensemencées par des *inocula* de même masse provenant de cultures de dix-huit heures. Toutes les heures on a prélevé une boîte de la série résistante et une de la série sensible. Les bactéries furent récoltées (avec des billes de verre) et lavées deux fois avec de l'eau distillée refroidie. Les bactéries lavées sont mises en suspension dans de l'eau distillée. Sur 0,5 ml de suspension homogène, on dose l'azote total microbien. On prélève 1 ml de la suspension pour déterminer le poids sec et le reste est mis en présence d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On laisse à la glacière pour assurer une bonne diffusion, dans la solution, des produits du métabolisme des acides nucléiques. On centrifuge (pendant quinze minutes à 2 000 g), puis on décante. On ajuste le volume à 10 ml avec une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100.

Sur une partie aliquote du liquide on dose :

- 1° L'azote purique des nucléotides par la méthode de Kerr [41];
- 2° Les ions orthophosphoriques par la méthode de Machebœuf et Delsal [42].

Le culot séparé du liquide précédent est utilisé pour l'extraction des acides nucléiques d'après la méthode de Schneider (2) [43].

(2) Le culot de centrifugation traité par la méthode de Schneider est conservé, car il servira à doser l'azote protéique (voir plus loin).

L'acide ribonucléique est dosé suivant la technique de Mejbaum [14] modifiée par Albaum et Umbreit [15] en tenant compte du facteur de correction que nous avons précisé [16].

L'acide désoxyribonucléique est dosé par la méthode de Dische [17] en utilisant comme étalon une préparation d'acide thymonucléique très polymérisé obtenue suivant Hammarsten [18] et purifiée suivant Bredereck [19].

Résultats expérimentaux.

Nos résultats sont exprimés par les figures 2 et 3. Les abscisses correspondent aux durées de culture, tandis que les ordonnées

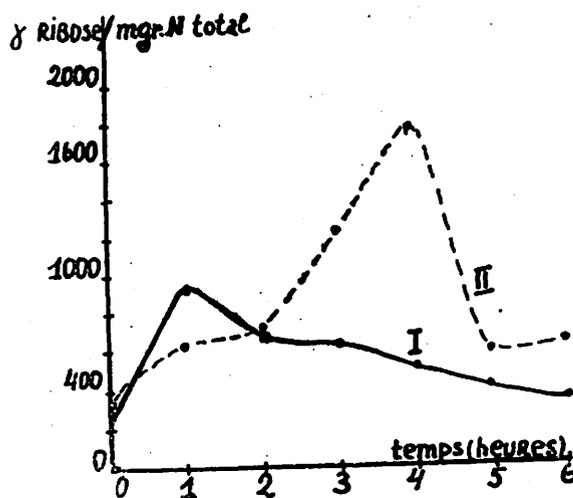


FIG. 2. — Teneur en ribose d'acide ribonucléique de *Staphylococcus aureus*. I, Souche streptomycino-sensible; II, Souche streptomycino-résistante.

correspondent respectivement aux teneurs en µg rapportées au milligramme d'azote total des bactéries.

Pour les deux souches étudiées on observe un accroissement de la teneur en acide ribonucléique, puis un maximum suivi d'un retour au chiffre initial. Mais l'accroissement est considérablement plus grand pour la souche résistante que pour la souche sensible et il est plus tardif.

En somme, chacune des souches accumule de l'acide ribonucléique et le maximum de cette accumulation se situe à la fin de sa période de latence. Le retard constaté pour la souche résistante correspond au retard de la terminaison de sa phase de latence.

Le fait prédominant est la disproportion considérable des teneurs en acide ribonucléique correspondant aux maxima.

Dans la souche résistante, le taux d'acide ribonucléique s'élève à une valeur si grande, qu'à l'époque du maximum, la teneur des cellules en cet acide représente 17 p. 100 de leur substance sèche, chiffre très surprenant mais vérifié avec soin par plusieurs séries d'expériences et corroboré par des expériences comparables sur

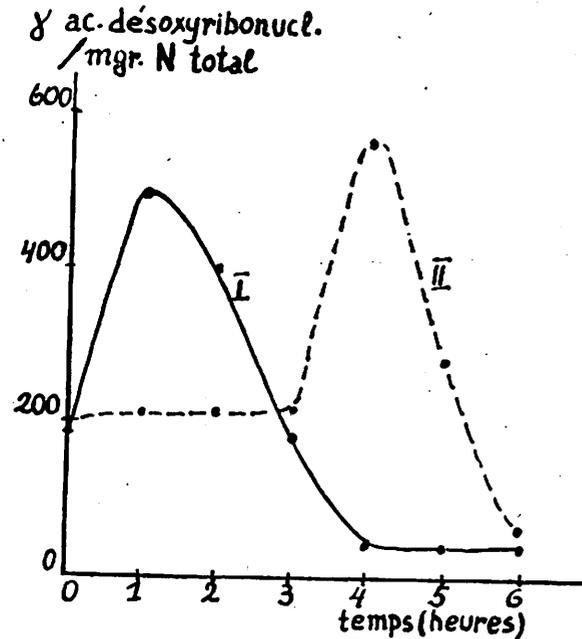


FIG. 3. — I, Courbe représentant la teneur en acide désoxyribonucléique chez une souche de *Staphylococcus aureus*, streptomycino-sensible; II, Courbe représentant la teneur en acide désoxyribonucléique chez une souche de *Staphylococcus aureus*, streptomycino-résistante.

des souches pénicillino-résistantes, dont les résultats seront publiés prochainement.

On voit que l'allure du phénomène est très comparable chez les souches streptomycino-sensibles et chez les souches streptomycino-résistantes, mais il existe une différence très nette dans la teneur en acide ribonucléique qui est deux à trois fois supérieure chez la souche résistante que chez la souche sensible. Cette accumulation massive d'acide ribonucléique constitue peut-être, chez la souche résistante, un processus de désintoxication vis-à-vis de l'antibiotique. Il faut se rappeler ici que l'acide ribonucléique est antagoniste de la streptomycine [20].

En ce qui concerne le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique, au contraire, on constate que la souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible synthétise cette substance aussi abondamment que la souche résistante pendant la phase de latence. Les concentrations maxima sont les mêmes. La seule différence est dans l'époque où se place le maximum.

On peut se demander si le retard dans la synthèse de l'acide ribonucléique a comme conséquence un retard dans le démarrage de la division cellulaire ou bien si, au contraire, c'est le retard du démarrage de la division qui est la cause première. Il nous est difficile d'aborder cette question avant d'avoir examiné d'autres étapes du métabolisme de l'acide ribonucléique.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES NUCLÉOTIDES ACIDO-SOLUBLES
CHEZ *Staphylococcus aureus*, SOUCHES STREPTOMYCINO-SENSIBLE
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

Dans les cellules microbiennes, à côté des acides nucléiques à l'état polymérisé, il existe des dérivés de ces acides : 1° des mononucléotides [21]; 2° des nucléosides; 3° des bases libres puriques et pyrimidiques.

L'étude des produits de dégradation des acides nucléiques a été effectuée en nous inspirant des techniques mises au point par Boivin et Mesrobeanu [22]. Les nucléotides, les nucléosides et les bases puriques libres sont mis en solution dans de l'acide trichloracétique à 10 p. 100 à basse température, comme nous l'avons vu ci-dessus. L'azote, dans les nucléotides précipités, est dosé d'après la méthode de Kerr [41].

Résultats expérimentaux.

Nos résultats sont exprimés en μg d'N purique par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 4).

Dans le cas de *Staphylococcus aureus* souche sensible, on assiste au début à une augmentation de la teneur en mononucléotides; cette augmentation est parallèle à la formation des acides nucléiques (voir courbe pour l'acide ribonucléique). Le maximum de l'accumulation en mononucléotides est atteint en même temps que pour l'acide ribonucléique. Donc, il y a, à côté de l'acide ribonucléique, un surplus des mononucléotides qui n'ont pas encore participé à la formation de l'acide ribonucléique ou qui en dérivent.

Une partie des mononucléotides est vraisemblablement utilisée par la formation des polynucléotides et par conséquent de l'acide ribonucléique, tandis que l'autre partie reste à l'état libre. La courbe représentant les mononucléotides a une allure tout à fait semblable à celle correspondant à l'acide ribonucléique. Les

ordonnées de la première ne sont que la moitié environ de celles de la seconde.

La courbe obtenue avec les souches sensibles pour les nucléotides reflète les variations dans le métabolisme de l'acide ribonucléique.

Dans le cas des souches résistantes elle s'élève à la même hauteur que la courbe obtenue pour les souches sensibles, le maximum est simplement déplacé vers la droite et correspond au

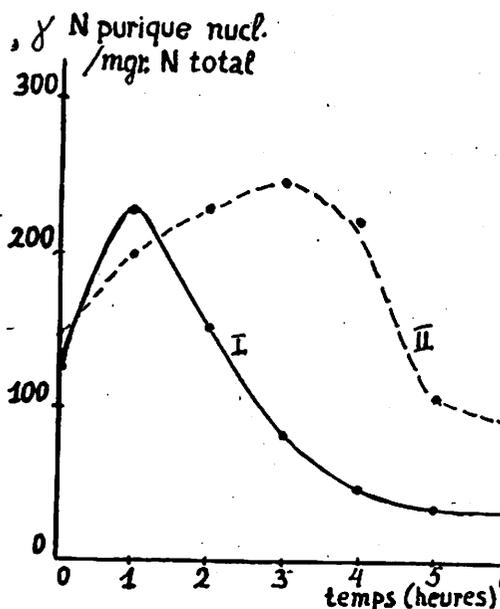


FIG. 4. — I, Courbe représentant l'azote purique nucléotidique chez *Staphylococcus aureus* sensible à la streptomycine; II, Courbe représentant l'azote purique nucléotidique chez *Staphylococcus aureus* résistant à la streptomycine.

Nos résultats sont exprimés en μ g de phosphore par milligramme d'azote total microbien (fig. 5).

maximum de la courbe pour l'acide ribonucléique chez les mêmes souches résistantes.

Mais nous assistons ici à un déséquilibre considérable entre le taux en mononucléotides et le taux en acide ribonucléique de la souche résistante.

La teneur maxima des souches résistantes en mononucléotides est la même que pour les souches sensibles. Cependant les résistantes accumulent beaucoup plus d'acide ribonucléique. Ceci permet de penser que la polymérisation des ribonucléotides qui

conduit à l'acide ribonucléique s'effectue mieux chez les souches résistantes que chez les sensibles. Cette hypothèse trouve un appui dans le fait que le rapport quantitatif acide ribonucléique / ribomononucléotides augmente au cours de la croissance chez les souches résistantes, tandis qu'il décroît chez les sensibles.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES IONS ORTHOPHOSPHORIQUES
DE SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*, STREPTOMYCINO-SENSIBLE
ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

On sait l'importance de la phosphorylation dans le métabolisme bactérien et combien varie, en particulier, la répartition

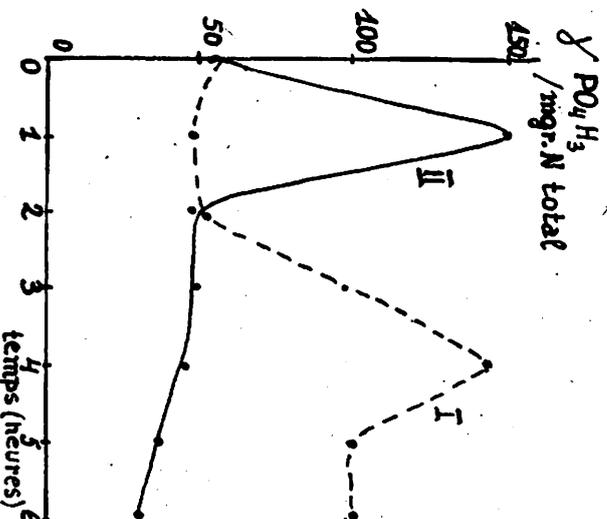


Fig. 5. — I. Courbe représentant l'évolution des ions orthophosphoriques chez *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistant; II, Courbe représentant l'évolution des ions orthophosphoriques chez *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible.

Nos résultats sont exprimés en µg de protéines par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 6 et 7).

du phosphore cellulaire au cours de la croissance. Nous venons de considérer les variations du métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides et nous avons démontré des différences particulièrement nettes dans le comportement des deux souches en ce

qui concerne les acides nucléiques. On sait que la teneur des bactéries en phosphates inorganiques dépend assez étroitement de l'utilisation des acides nucléiques et de leurs dérivés.

Nous avons suivi le sort des ions orthophosphoriques au cours de la croissance des deux souches, sensible et résistante, chez *Staphylococcus aureus*. Le dosage des phosphates a été effectué d'après la méthode de microdosages de Macheboeuf et Delsal [12].

Les lectures sont faites au photomètre de Meunier avec l'écran orangé (on déduit le chiffre obtenu pour le témoin blanc).

Les courbes obtenues pour les deux souches présentent chacune un clocher (fig. 5).

La situation des clochers est différente, mais leur hauteur est pratiquement identique. La montée de la courbe lorsque le clocher apparaît indique une période pendant laquelle les bactéries s'enrichissent considérablement en phosphates minéraux, et ceci se produit justement pour chacune des souches à la période où les bactéries accumulent les acides nucléiques. La baisse de la teneur en phosphates se situe de même à l'époque de la baisse de la teneur en acides nucléiques.

Ces faits sont assez curieux. On aurait pu penser que les phosphates nécessaires à la synthèse des acides nucléiques devaient s'accumuler avant que la synthèse nucléique atteigne sa plus grande vitesse.

ETUDE DES PROTÉINES CHEZ *Staphylococcus aureus*, SOUCHES STREPTOMYCINO-SENSIBLE ET STREPTOMYCINO-RÉSISTANTE.

La synthèse des protéines dans la vie des cellules est un problème parmi les plus difficiles et les plus importants de la biochimie. De nombreuses hypothèses ont été émises, mais leurs supports expérimentaux ne sont pas encore très grands (3).

Une série d'observations a montré qu'il y avait un lien entre la richesse de la cellule en acide ribonucléique et son aptitude de synthétiser des protéines [6, 7].

Caspersson [7] a proposé une très intéressante théorie au sujet de la synthèse des protéines dans les cellules. Les deux types d'acides nucléiques (désoxypentose et pentose nucléique) joueraient un rôle prépondérant dans cette synthèse. L'acide désoxypentose nucléique interviendrait dans la synthèse des protéines nucléaires au cours de la division cellulaire. Au contraire, l'acide pentose nucléique du nucléole et du cytoplasme jouerait un rôle dans la synthèse des protéines cytoplasmiques et des sécrétions protéiques. Cette théorie est basée sur des faits très intéressants

(3) Un exposé de ces théories sortirait du cadre du présent mémoire. Citons une récente mise au point sur ce sujet : Macheboeuf [23].

observés en étudiant l'absorption des rayons ultra-violetes par les bases puriques des acides nucléiques dans les cellules. Il est extrêmement probable que les acides nucléiques soient un facteur très important des synthèses protéiques, mais aucune interpré-

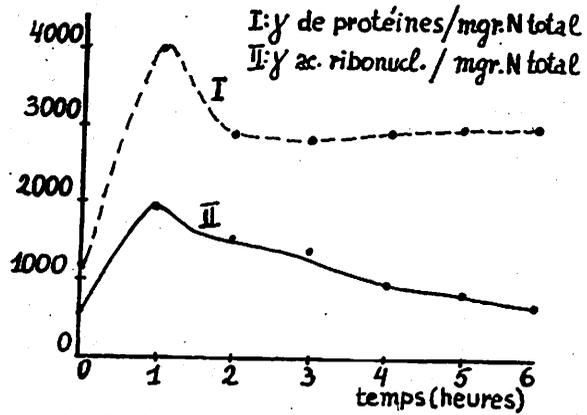


FIG. 6. — Souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-sensible.

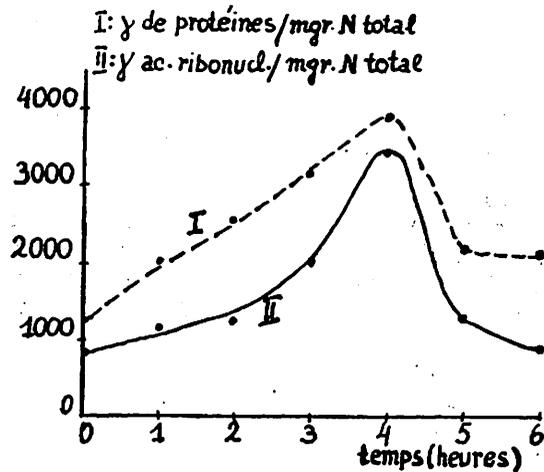


FIG. 7. — Souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistante.

tation satisfaisante n'a pu être proposée jusqu'ici au sujet du mécanisme biochimique de ce rôle des acides nucléiques.

Pour Brachet [6] ce sont des granules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques qui sont facteurs de synthèses protéiques. Ces particules contiennent toujours une proportion appréciable de protéines spécifiques que synthétise chaque cellule. Brachet

considère ce fait comme un argument très puissant en faveur du rôle des granules ribonucléoprotéiques dans la synthèse des protéines. Cet auteur a constaté que la synthèse des protéines et celle de l'acide désoxyribonucléique sont accompagnées par un métabolisme intense de l'acide ribonucléique [24]. Cependant, l'acide ribonucléique n'est pas le précurseur de l'acide désoxyribonucléique [25].

Boivin [26], Malmgren et Heden [8] ont attiré l'attention sur la

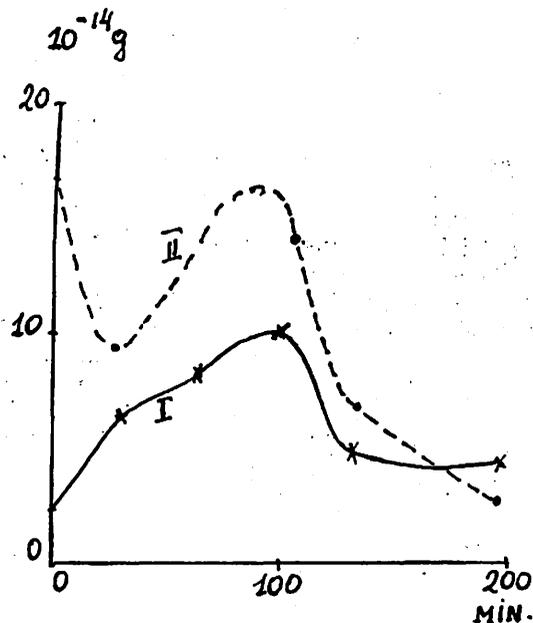


FIG. 8. — I, Teneur en acides nucléiques chez *Escherichia coli*;
II, Teneur en protéines chez *Escherichia coli*.

richesse exceptionnelle en acide ribonucléique des bactéries, dont le pouvoir de multiplication est énorme.

Les travaux de Malmgren et Heden ont apporté des renseignements sur la synthèse des protéines au cours de la croissance microbienne [8]. Ces auteurs étudient chez des bactéries le métabolisme des nucléotides et des protéines au début de la phase de croissance exponentielle et pendant la phase de latence. Ils trouvent que la synthèse des acides nucléiques semble précéder celle des protéines. Ceci n'est pas parfaitement constant, comme l'ont prouvé certaines de nos expériences que nous allons exposer.

Les perturbations provoquées par la streptomycine dans le métabolisme de l'acide ribonucléique nous ont incité à entreprendre des recherches sur l'évolution protidique dans les souches sensible et résistante, en tenant compte des hypothèses qui relient l'acide ribonucléique à la synthèse des protéines. Pour cela, en première approximation, nous nous sommes contenté d'évaluer grossièrement l'azote protidique en dosant l'azote dans le résidu après deux épuisements à l'acide trichloracétique (méthode de Schneider).

Dans notre calcul, nous négligeons la très faible quantité d'azote polynucléotidique et lipidique qui persiste, peut-être, dans les corps microbiens après épuisement par l'acide trichloracétique.

En faisant la comparaison entre les deux courbes représentant l'évolution des protéines dans les souches sensible et résistante à la streptomycine, nous assistons à un phénomène très curieux en ce qui concerne les rapports entre les protéines et les acides nucléiques, spécialement dans la souche résistante. On n'observe pas l'harmonie remarquée par Caspersson et Brachet entre ces deux constituants de la cellule. En effet, dans les conditions de nos expériences, la souche résistante accumule des quantités considérables d'acide ribonucléique et cependant la synthèse de ses protéines conduit à une même teneur que pour la souche sensible. Nous observons donc un défaut d'harmonie entre les synthèses d'acides ribonucléiques et de protéines chez la souche résistante. Le fait est surprenant car il est en opposition avec les très intéressantes observations de Brachet dans les cellules animales.

B. — ETUDES SUR *ESCHERICHIA COLI*

Nous avons vu, dans le cas d'une espèce à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*), que le métabolisme de l'acide ribonucléique différait pour les souches sensibles et les souches résistantes à la streptomycine. Nous avons constaté une accumulation massive d'acide ribonucléique chez la souche streptomycino-résistante avant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. On pouvait se demander si cette propriété se retrouvait également pour les bactéries à Gram négatif. Nous avons donc entrepris l'étude de souches d'*Escherichia coli* sensible et résistante à la streptomycine. Les techniques analytiques que nous avons utilisées sont les mêmes que pour *Staphylococcus aureus*.

Une souche d'*Escherichia coli* B/r [27] résistante à la streptomycine a été envoyée à l'Institut Pasteur par le Dr Bertani (4).

(4) Dr Bertani, Dept. of genetics Cold Spring Harbor, Long Island, N. Y.

Cette souche, fortement résistante à la streptomycine (10 000 µg de streptomycine par millilitre), proliférait parfaitement bien sans et avec streptomycine; elle était donc résistante mais non streptomycino-exigeante [28, 29, 30].

Les souches résistantes et les souches streptomycino-exigeantes obtenues à partir de souches sensibles forment des colonies, dont l'aspect est pratiquement identique à celui des souches sensibles. Cependant l'examen microscopique révèle des différences morphologiques : les cellules sont moins longues mais plus larges [31, 32, 33].

Nous avons effectivement constaté que nos germes résistants présentaient des modifications morphologiques notables. Les bâtonnets sont raccourcis environ deux fois et légèrement élargis.

ETUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DES SOUCHES SENSIBLE ET RÉSISTANTE D'*Escherichia coli*.

L'étude de la croissance a été conduite comme ci-dessus pour le Staphylocoque (milieu peptoné à 2 p. 100 et glucosé à 0,3 p. 100). La souche streptomycino-résistante a subi deux repiquages sans antibiotique avant d'être utilisée.

Les résultats sont exprimés par les courbes de la figure 9. Les abscisses correspondent au temps et les ordonnées aux résultats des lectures opacimétriques exprimées en divisions du tambour gradué de l'appareil de Meunier (témoins déduits).

Dans les conditions de notre expérience, les courbes montrent que :

1° La phase de latence de la souche résistante est nettement plus longue que celle de la souche sensible ;

2° La phase exponentielle pour la souche résistante se termine également plus tard et elle ne conduit pas à un rendement aussi élevé (5) ;

3° La phase exponentielle est suivie par une phase d'autolyse pour la souche sensible tandis qu'elle est suivie par une phase de croissance très ralentie, mais indiscutable, pour la souche résistante [métabolite toxique ou épuisement prématuré d'un élément nutritif] (6).

(5) Nous n'avons pas poursuivi l'expérience au delà de la dixième heure, car nous étions surtout intéressé par la phase de latence et la phase de croissance exponentielle.

(6) C'est volontairement que nous avons opéré l'étude de la croissance dans les milieux nutritifs peu concentrés en matières alimentaires. Ainsi la phase exponentielle se termine avant que des catabolites toxiques atteignent une concentration gênante.

Nos *inocula* dans toutes nos expériences sur la croissance provenaient des bactéries en culture prélevées à la dix-huitième heure. Dans le cas particulier d'*Escherichia coli*, ceux de la souche sensible étaient donc constitués par des germes en autolyse, tandis que ceux de la souche résistante étaient encore probablement en période de croissance ralentie. Ces différences influent peut-être sur la durée des phases de latence. Pour étudier ce problème il

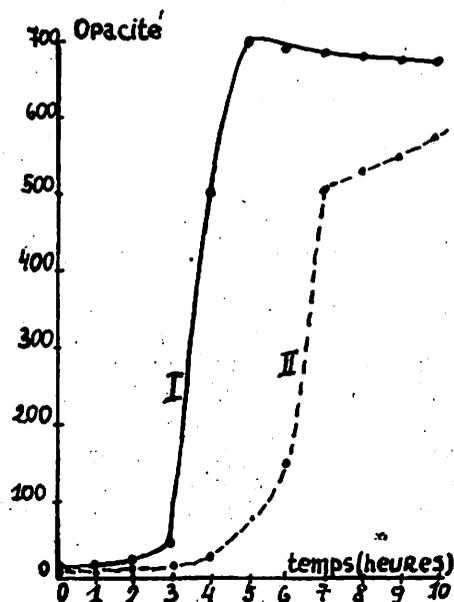


FIG. 9.

faudrait reprendre toute notre longue étude en étudiant systématiquement l'influence de l' « âge » de l'inoculum.

MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES
DE SOUCHES D'*Escherichia coli*,
SENSIBLE ET RÉSISTANTE A LA STREPTOMYCINE.

Nous avons cultivé les deux souches en aérobiose sur milieu gélosé dans les boîtes de Roux, puis opéré par les techniques décrites ci-dessus à propos de *Staphylococcus aureus* (page 84).

Nos résultats sont exprimés en μg de ribose par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 10).

Les courbes de la figure 10 montrent que la souche streptomycino-résistante accumule une proportion d'acide ribonucléique

notablement plus grande que la souche sensible. La différence n'est cependant pas aussi considérable que pour *Staphylococcus aureus* résistant à la streptomycine (7).

En ce qui concerne le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique, des mononucléotides puriques, des protéines et des ions orthophosphoriques, nous n'observons pas de différences quantitatives entre les deux souches d'*Escherichia coli*, sensible

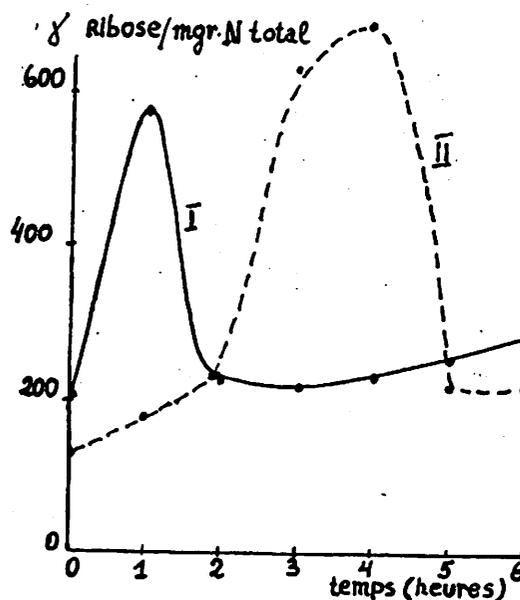


FIG. 10. — I, Courbe représentant la teneur en ribose d'acide ribonucléique chez une souche d'*Escherichia coli*, streptomycino-sensible; II, Courbe représentant la teneur en ribose d'acide ribonucléique chez une souche d'*Escherichia coli*, streptomycino-résistante.

et résistante à la streptomycine (fig. 11, 12, 13, 14). L'allure des courbes représentant l'évolution de ces substances en fonction du

(7) En comparant les résultats obtenus pour une espèce bactérienne à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) avec ceux obtenus pour une espèce à Gram négatif (*Escherichia coli*), nous observons que les germes à Gram positif résistants à la streptomycine accumulent davantage d'acide ribonucléique pendant la phase de latence que les germes à Gram négatif également résistants à la streptomycine. Cette étude a porté seulement sur deux espèces bactériennes; il serait intéressant de l'étendre à une série d'espèces pour savoir si ces conclusions ont un caractère de généralité.

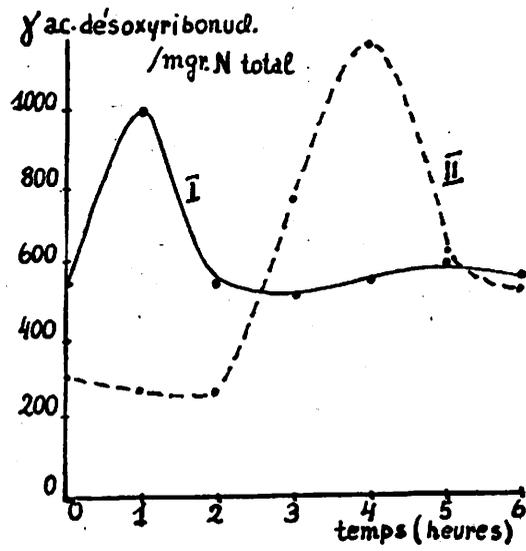


FIG. 11. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

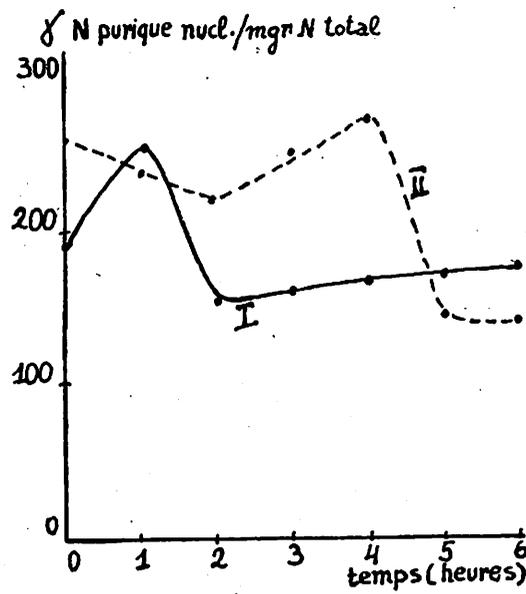


FIG. 12. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

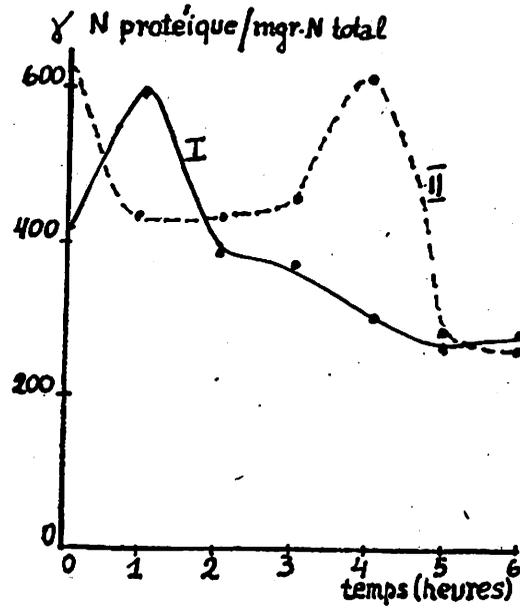


FIG. 13. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

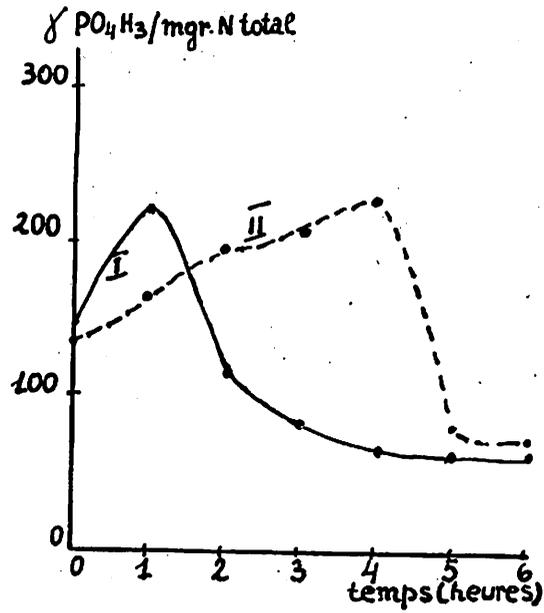


FIG. 14. — Souche de *E. coli*. I, Souche sensible; II, Souche résistante.

temps pour les deux souches est la même, lorsque la période de latence est terminée. Donc, indépendamment de l'inégalité des phases de latence, la seule différence entre les deux souches porte sur l'acide ribonucléique. Ceci est une confirmation de nos résultats antérieurs obtenus chez *Staphylococcus aureus*, résistant et sensible à la streptomycine.

Morse et Carter [34] ont étudié le métabolisme des acides nucléiques chez deux souches d'*Escherichia coli*, une souche normale B et une souche *résistante aux ultra-violets* provenant de B et désignée par B/r.

Ces auteurs ont utilisé comme traceur le phosphore radio-actif à l'état de phosphates et ont observé son rôle dans la synthèse des acides nucléiques. L'acide ribonucléique est surtout synthétisé pendant la phase de latence, juste avant le commencement de la phase exponentielle de multiplication des cellules bactériennes.

Morse et Carter trouvent que la souche B/r contient, à la fin de la phase de latence, trois à quatre fois plus d'acide désoxyribonucléique que la souche B normale d'*Escherichia coli*.

Bertani a bien voulu nous remettre une souche résistante à la streptomycine préparée à partir de la souche B/r.

Contrairement à ce qu'avaient observé Morse et Carter sur la souche B/r elle-même, nous trouvons ici que c'est l'acide ribonucléique qui est accumulé plus abondamment que l'acide désoxyribonucléique.

Nous devons donc conclure que la souche streptomycino-résistante obtenue par Bertani à partir de la souche B/r de Morse et Carter n'a plus les caractéristiques qu'avait la souche B/r elle-même. Les cultures répétées de B/r en présence de doses minimales de streptomycine ont conduit à l'obtention d'une souche streptomycino-résistante qui présente les caractéristiques que nous avons découvertes pour toutes les souches streptomycino-résistantes étudiées :

La phase de latence est prolongée.

L'acide ribonucléique s'accumule à la fin de cette phase notablement plus que l'acide désoxyribonucléique. Ce dernier acide ne s'accumule pas plus que dans les souches sensibles à la streptomycine.

En somme, la souche résistante aux ultra-violets de Morse et Carter, dite souche B/r, avait des caractères biochimiques très différents de ceux des souches streptomycino-résistantes de même espèce. Cependant, la souche streptomycino-résistante que Bertani a obtenue à partir de B/r présente les caractéristiques biochimiques habituelles des autres souches streptomycino-résistantes.

Conclusions.

Des souches streptomycino-résistantes de deux espèces bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, ont été comparées avec des souches de même espèce, mais sensibles à l'antibiotique.

1° Les courbes de croissance présentent une phase de latence plus prolongée pour les souches résistantes.

2° L'acide ribonucléique s'accumule, à la fin de la phase de latence, considérablement plus dans les souches résistantes que dans les souches sensibles.

3° Les autres constituants des bactéries qui furent étudiés (protéines, orthophosphates, mononucléotides à ribose, mononucléotides à désoxyribose et acide désoxyribonucléique) ne sont pas accumulés en excès par les souches résistantes. L'accumulation exagérée porte uniquement sur l'acide ribonucléique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. M. POWELL et H. A. JAMIESON. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1942, 49, 387.
- [2] F. GROS, M. BELJANSKI, M. MACHEBOEUF et M^{me} F. GRUMBACH. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 875.
- [3] J. MONOD. *Actualités scientifiques et industrielles*, 1942, 911.
- [4] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, 24, 417.
- [5] H. B. LEVY, E. T. SKUTCH et H. L. SCHADE. *Arch. Bioch.*, 1949, 24, 199.
- [6] J. BRACHET. *Actualités biochimiques*, 1951, 1.
- [7] T. CASPERSSON. *Symposium Soc. exp. Biol. Nucleic Acids*, 1947.
- [8] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, 24, 448.
- [9] F. GROS, M. MACHEBOEUF et S. JEULIN. *Ces Annales*, 1948, 74, 368.
- [10] F. GROS, M. MACHEBOEUF, B. RYBAK et P. LACAILLE. *Ces Annales*, 1949, 77, 246.
- [11] S. E. KERR. *J. biol. Chem.*, 1940, 132, 151.
- [12] M. MACHEBOEUF et J.-L. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 116.
- [13] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, 161, 293.
- [14] W. MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, 253, 117.
- [15] H. G. ALBAUM et W. W. UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1947, 167, 370.
- [16] M. BELJANSKI et M. MACHEBOEUF. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 174.
- [17] Z. DISCHE. *Microchemie*, 1930, 8, 4.
- [18] E. HAMMARSTEN. *Biol. Zeitschr.*, 1924, 144, 383.
- [19] H. BRADERECK. *Ergebn. Enzymforsch.*, 1938, 7, 101.
- [20] H. VON EULER. *Ark. Kem. Miner. Geol.*, 1948, 26 A n° 6, 1.
- [21] M. STEPHENSON. *Bacteriol. Metabolism*. Edition 1948.
- [22] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 114, 302.
- [23] M. MACHEBOEUF. *Symposium sur les Protéines*. Rutgers University, 1951.

- [24] J. BRACHET. *Arch. Biol.*, 1937, 48, 520.
- [25] S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1948, 174, 281.
- [26] A. BOVIN. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, 24, 139.
- [27] E. M. WITKIN. *Genetics*, 1947, 32, 221.
- [28] C. P. MILLER et M. BOHNHOFF. *Science*, 1947, 103, 620.
- [29] C. P. MILLER et M. BOHNHOFF. *J. Bact.*, 1947, 54, 167.
- [30] P. SCHAEFFER. *Ces Annales*, 1950, 78, 624.
- [31] E. STRAUSS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, 64, 97.
- [32] A. K. SILVER et C. H. KEMPE. *J. Immunol.*, 1948, 57, 270.
- [33] C. LEVADITI. La streptomycine et ses applications thérapeutiques, 1947.
- [34] M. L. MORSE et C. E. CARTER. *J. Bact.*, 1949, 58, 317.

9)

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Comparaison de souches bactériennes résistant à la streptomycine avec des souches sensibles de mêmes espèces.* Note de M. MIRKO BELJANSKI, présentée par M. Gabriel Bertrand.

Des souches de *Staphylococcus aureus* (nos 133 et 131) et deux mutants provenant d'une souche de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) résistant à la streptomycine accumulent de l'acide ribonucléique beaucoup plus abondamment que les souches sensibles de mêmes espèces.

Dans des travaux antérieurs ⁽¹⁾, nous avons constaté que des souches de *Staphylococcus aureus* (Oxford) et d'*Escherichia coli* (Bertani) résistant à la streptomycine accumulent beaucoup plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles de mêmes espèces.

Nous nous sommes demandé si cette accumulation excédentaire d'acide ribonucléique par les bactéries streptomycino-résistantes était indissolublement liée au phénomène de la résistance. Pour cela, nous avons étudié le métabolisme des acides nucléiques chez les souches de *Staphylococcus aureus* (nos 133 et 131) et chez deux mutants d'une souche de *Salmonella enteritidis* résistant à la streptomycine ⁽²⁾. La résistance de ces souches était de l'ordre de 3 000 µg de streptomycine par millilitre. Celle des souches normales était de l'ordre de 3 µg/ml dans un milieu d'eau peptonnée et glucosée.

Nos expériences ont été conduites dans les conditions indiquées pour nos travaux antérieurs ⁽¹⁾.

Les résultats se résument ainsi :

A la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance, nous constatons une accumulation d'acide ribonucléique pour toutes les souches résistantes ou sensibles, mais cette accumulation est beaucoup plus grande chez les bactéries résistantes que chez les bactéries sensibles. Elle persiste pendant un temps plus ou moins long suivant l'espèce bactérienne.

⁽¹⁾ M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 83, 1952, p. 80.

⁽²⁾ Ces deux mutants ont été isolés par J. SERVANT, *C. R. Soc. Biol.*, 146, 1952, p. 894.

Nos résultats sont exprimés en milligrammes de ribose de l'acide nucléique par rapport aux milligrammes d'azote total au début de la phase exponentielle de croissance (tableau).

Espèces bactériennes.	Ribose de l'acide nucléique en mg/mg d'azote.		Excédent par rapport à la souche sensible (%)
	Souche sensible.	Souche résistante.	
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 133.....	0,376	0,580	54,2
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 131.....	0,303	0,525	73,2
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant G)..	0,271	0,400	47,6
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant P)..	0,283	0,625	120,8

Dans les conditions de nos expériences, nous avons constaté que le taux d'acide ribonucléique est en excédent de 47,6 à 120,8 % chez les souches streptomycino-résistantes. Par contre pour les protéines, nous n'avons pas observé de différence quantitative entre les souches résistantes et les souches sensibles.

Ces faits semblent en opposition avec la théorie classique de Caspersson⁽¹⁾ et de Brachet.⁽²⁾ d'après laquelle il existerait une corrélation entre l'intensité de la synthèse protéique et l'abondance d'acide ribonucléique dans la cellule. Nous trouvons, en effet, que la très forte teneur des germes résistants en acide ribonucléique ne s'accompagne pas d'une synthèse protéique plus active.

Il est vrai que Jeener et Brachet⁽³⁾ ont montré l'existence, chez les Levures, de deux fractions distinctes d'acide ribonucléique. L'une est fixée aux microgranules cellulaires et l'autre se trouve à l'état libre. Pour ces auteurs, ce serait seulement l'acide granulaire qui interviendrait dans la synthèse protéique. On peut donc se demander si, dans le cas des bactéries que nous étudions, ce n'est pas seulement une fraction ribonucléique, sans lien avec la synthèse protéique, qui se trouve augmentée chez les souches résistantes. D'autres hypothèses peuvent être envisagées. On peut, par exemple, penser que l'acide ribonucléique en excédent dans les souches résistantes a une structure chimique particulière.

(¹) *Naturwissen*, 29, 1941, p. 33.

(²) *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 12, 1947, p. 18.

(³) *Enzymologia*, 11, 1943-1945, p. 222.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*.
t. 236, p. 1102-1104, séance du 9 mars 1953).

9'

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Comparaison de souches bactériennes résistant à la streptomycine avec des souches sensibles de mêmes espèces.* Note de M. MIRKO BELJANSKI, présentée par M. Gabriel Bertrand.

Des souches de *Staphylococcus aureus* (nos 133 et 131) et deux mutants provenant d'une souche de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) résistant à la streptomycine accumulent de l'acide ribonucléique beaucoup plus abondamment que les souches sensibles de mêmes espèces.

Dans des travaux antérieurs ⁽¹⁾, nous avons constaté que des souches de *Staphylococcus aureus* (Oxford) et d'*Escherichia coli* (Bertani) résistant à la streptomycine accumulent beaucoup plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles de mêmes espèces.

Nous nous sommes demandé si cette accumulation excédentaire d'acide ribonucléique par les bactéries streptomycino-résistantes était indissolublement liée au phénomène de la résistance. Pour cela, nous avons étudié le métabolisme des acides nucléiques chez les souches de *Staphylococcus aureus* (nos 133 et 131) et chez deux mutants d'une souche de *Salmonella enteritidis* résistant à la streptomycine ⁽²⁾. La résistance de ces souches était de l'ordre de 3 000 µg de streptomycine par millilitre. Celle des souches normales était de l'ordre de 3 µg/ml dans un milieu d'eau peptonnée et glucosée.

Nos expériences ont été conduites dans les conditions indiquées pour nos travaux antérieurs ⁽¹⁾.

Les résultats se résument ainsi :

A la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance, nous constatons une accumulation d'acide ribonucléique pour toutes les souches résistantes ou sensibles, mais cette accumulation est beaucoup plus grande chez les bactéries résistantes que chez les bactéries sensibles. Elle persiste pendant un temps plus ou moins long suivant l'espèce bactérienne.

⁽¹⁾ M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 83, 1952, p. 80.

⁽²⁾ Ces deux mutants ont été isolés par J. SERVANT, *C. R. Soc. Biol.*, 146, 1952, p. 894.

Nos résultats sont exprimés en milligrammes de ribose de l'acide nucléique par rapport aux milligrammes d'azote total au début de la phase exponentielle de croissance (tableau).

Espèces bactériennes.	Ribose de l'acide nucléique en mg/mg d'azote.		Excédent par rapport à la souche sensible (%)
	Souche sensible.	Souche résistante.	
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 133.....	0,376	0,580	54,2
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 131.....	0,303	0,525	73,2
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant G)..	0,271	0,400	47,6
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant P)..	0,283	0,625	120,8

Dans les conditions de nos expériences, nous avons constaté que le taux d'acide ribonucléique est en excédent de 47,6 à 120,8 % chez les souches streptomycino-résistantes. Par contre pour les protéines, nous n'avons pas observé de différence quantitative entre les souches résistantes et les souches sensibles.

Ces faits semblent en opposition avec la théorie classique de Caspersson⁽⁴⁾ et de Brachet⁽⁵⁾ d'après laquelle il existerait une corrélation entre l'intensité de la synthèse protéique et l'abondance d'acide ribonucléique dans la cellule. Nous trouvons, en effet, que la très forte teneur des germes résistants en acide ribonucléique ne s'accompagne pas d'une synthèse protéique plus active.

Il est vrai que Jeener et Brachet⁽⁶⁾ ont montré l'existence, chez les Levures, de deux fractions distinctes d'acide ribonucléique. L'une est fixée aux microgranules cellulaires et l'autre se trouve à l'état libre. Pour ces auteurs, ce serait seulement l'acide granulaire qui interviendrait dans la synthèse protéique. On peut donc se demander si, dans le cas des bactéries que nous étudions, ce n'est pas seulement une fraction ribonucléique, sans lien avec la synthèse protéique, qui se trouve augmentée chez les souches résistantes. D'autres hypothèses peuvent être envisagées. On peut, par exemple, penser que l'acide ribonucléique en excédent dans les souches résistantes a une structure chimique particulière.

(³) *Naturwissen*, 29, 1941, p. 33.

(⁴) *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 12, 1947, p. 18.

(⁵) *Enzymologia*, 11, 1943-1945, p. 222.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*.
t. 236, p. 1102-1104, séance du 9 mars 1953).

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Février 1953. — Tome 84.)

COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE
II. — CAS DE LA PÉNICILLINE

PAR

Mirko BELJANSKI



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

**COMPARAISON DE SOUCHES BACTERIENNES
RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE**

II. — CAS DE LA PENICILLINE

par MIRKO BELJANSKI.

(*Institut Pasteur. Service du professeur MACHEBOEUF.*)

Dans un travail précédent [1] nous avons montré que *Staphylococcus aureus* résistant à la streptomycine accumule des quantités d'acide ribonucléique très supérieures à celles accumulées par la souche sensible.

D'après ces résultats on pouvait se demander si cette accumulation massive d'acide ribonucléique était spécifique de la streptomycino-résistance, ou si elle s'étendait aux autres antibiotiques provoquant des perturbations du métabolisme chez les bactéries. Pour cela, nous avons entrepris l'étude chimique comparative d'une souche résistante et d'une souche sensible à la pénicilline de *Staphylococcus aureus*. (Les cas des sulfamido-résistance et azido-résistance seront publiés prochainement.)

**ETUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DE *Staphylococcus aureus*
SUCHE PÉNICILLINO-RÉSISTANTE
ET SUCHE PÉNICILLINO-SENSIBLE.**

Pour nos études sur la pénicillino-résistance nous avons choisi une souche de *Staphylococcus aureus* (Oxford) très sensible à la pénicilline. Pour obtenir *in vitro* une souche résistante à la pénicilline, on rencontre beaucoup plus de difficultés que dans le cas de la streptomycine. Les cultures successives d'une souche sensible proliférant en présence de petites doses croissantes de pénicilline ne se développaient que très lentement et il a fallu de très nombreux passages pour obtenir enfin la souche de haute résistance (4 000 unités par millilitre).

Nous avons fait une étude comparative des vitesses de croissance des deux souches dans les conditions indiquées à propos de la streptomycino-résistance [1].

Notons tout d'abord que la souche de *Staphylococcus aureus*

résistante à la pénicilline a une croissance beaucoup plus lente que la souche résistante à la streptomycine étudiée dans le travail précédent [4].

D'autre part, nous retrouvons pour la souche pénicillino-résistante un phénomène analogue à celui que nous avons observé pour la souche streptomycino-résistante : la souche résistante a une phase de latence beaucoup plus prolongée que celle de la souche sensible (fig. 1). Par contre, la phase exponentielle de croissance est modifiée plus profondément que pour la strepto-

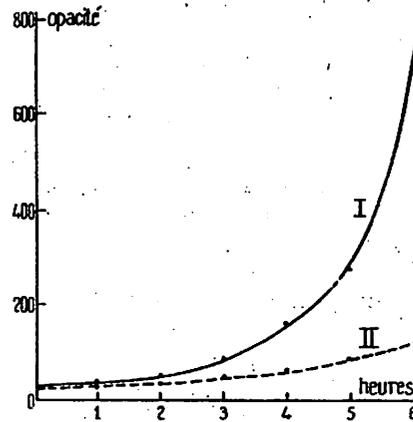


FIG. 1. — I, courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* pénicillino-sensible; II, courbe de croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* pénicillino-résistante.

mycino-résistance. (Nous n'avons pas l'intention d'approfondir cette question dans le présent travail.)

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DE LEURS DÉRIVÉS CHEZ *Staphylococcus aureus* PÉNICILLINO-RÉSISTANT ET PÉNICILLINO-SENSIBLE.

Pour l'étude du métabolisme des acides nucléiques et de leurs dérivés nous avons appliqué les méthodes que nous avons utilisées dans le cas de la streptomycino-résistance.

Nos résultats se résument ainsi :

a) ACIDE RIBONUCLÉIQUE. — La souche de *Staphylococcus aureus* pénicillino-résistante accumule en abondance de l'acide ribonucléique pendant la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance. Cette quantité d'acide

ribonucléique est deux à trois fois supérieure à celle accumulée par la souche sensible dans les mêmes conditions (fig. 2).

Les maxima des courbes des deux souches ne sont pas situés à la même heure, mais nous savons qu'il existe des différences dans la durée des phases de latence dans les courbes de croissance respectives pour les deux souches. En somme, nous retrouvons le phénomène que nous avons découvert dans le cas de la streptomycine.

b) ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE. — Pour l'acide désoxyribonucléique chez *Staphylococcus aureus* sensible et résistant à la

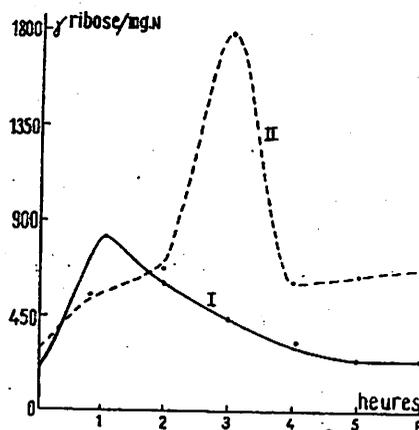


FIG. 2. — Teneur en ribose d'acide ribonucléique chez *Staphylococcus aureus*. I, souche pénicillino-sensible ; II, souche pénicillino-résistante.

streptomycine, le taux est le même pendant le début de la croissance. Dans le cas d'une souche pénicillino-résistante nous constatons, au contraire, qu'il y a une légère différence quantitative entre la souche sensible et la souche résistante en ce qui concerne l'acide désoxyribonucléique. Mais les différences sont beaucoup moindres que pour l'acide ribonucléique. La souche résistante à la pénicilline accumule un peu plus d'acide désoxyribonucléique que la souche sensible pendant les premières heures de la croissance bactérienne. Les maxima des courbes représentant l'évolution de l'acide désoxyribonucléique se situent à la même heure que ceux des courbes représentant l'évolution de l'acide ribonucléique.

Nos résultats sont exprimés par les courbes de la figure 3.

c) MONONUCLÉOTIDES PURIQUES. — D'après les travaux de Gros et Machebœuf [2] confirmés par ceux de Mitchell [3], la pénicil-

line agit sur la scission des mononucléotides et de l'A. T. P.

Nous avons donc étudié le métabolisme des mononucléotides puriques chez les souches de *Staphylococcus aureus* sensible et résistante à la pénicilline. La souche résistante accumule nota-

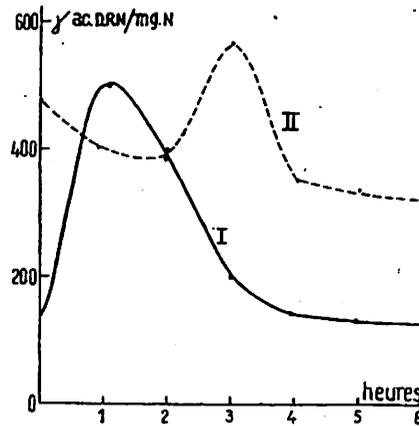


FIG. 3. — Teneur en acide désoxyribonucléique chez *Staphylococcus aureus*. I, souche pénicillino-sensible. II, souche pénicillino-résistante.

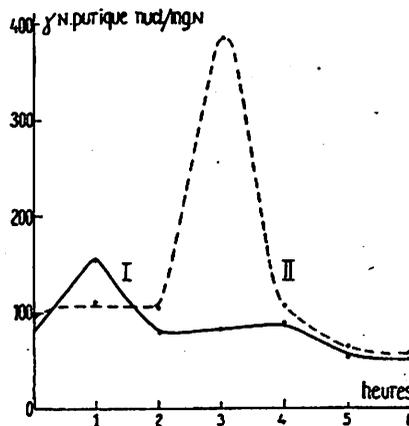


FIG. 4. — Azote purique nucléotidique chez *Staphylococcus aureus*. I, souche pénicillino-sensible. II, souche pénicillino-résistante.

blement des mononucléotides puriques au cours des premières heures de la croissance bactérienne.

Nos résultats sont exprimés en μg d'azote purique mononucléotidique par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 4).

d) IONS ORTHOPHOSPHORIQUES. — Divers auteurs ont déjà étudié le problème du métabolisme phosphorique chez des bactéries pénicillino-sensibles mises en présence de l'antibiotique.

Gros et Machebœuf [4] ont observé que les cellules de *Clostridium sporogenes* non proliférantes captent abondamment des ions phosphoriques du milieu ambiant lorsque la pénicilline est présente, tandis que cette captation est infime en l'absence de l'antibiotique.

Park et Johnson [5] ont vérifié récemment ce fait sur des staphylocoques en prolifération. Ces auteurs ont même isolé des dérivés triphosphorés : acide uridyl-pyrophosphorique. Ces corps sont accumulés pendant la phase de latence par la souche

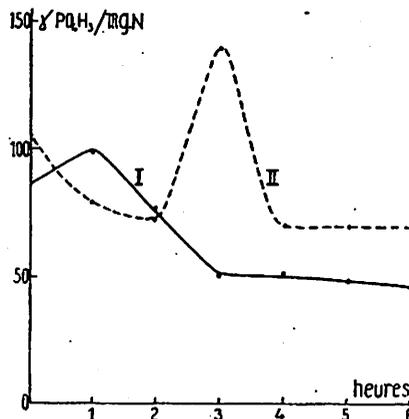


FIG. 5. — Ions orthophosphoriques chez *Staphylococcus aureus*. I, souche pénicillino-sensible. II, souche pénicillino-résistante.

sensible cultivée en présence de doses subléthales de pénicilline [6].

Toutes ces études ont porté uniquement sur des souches sensibles à l'antibiotique.

Nous avons abordé le problème différemment en étudiant les teneurs en phosphore acido-soluble des cellules de deux souches de *Staphylococcus aureus* pénicillino-sensible et pénicillino-résistante. La souche résistante à une certaine période de sa croissance accumule beaucoup plus de phosphore acido-soluble que la souche sensible.

Or, nous avons vu que dans le cas de la streptomycine nous n'avons rien observé de semblable. Ceci constitue une divergence biochimique très nette entre la souche pénicillino-résistante et la souche streptomycino-résistante que nous avons étudiées.

L'accumulation de phosphore acido-soluble par la souche pénicillino-résistante est peut-être en rapport avec les anomalies du catabolisme de l'acide ribonucléique que présente cette souche résistante [2].

Nos résultats sont exprimés par les courbes de la figure 5.

ETUDE DES PROTIDES

CHEZ *Staphylococcus aureus* PÉNICILLINO-RÉSISTANT ET PÉNICILLINO-SENSIBLE.

Gros et Machebœuf [7], en travaillant avec *Clostridium sporogenes*, ont constaté que la pénicilline ne modifie pas l'activité protéolytique de ce germe. Ils notent, par contre, une action sur le métabolisme des amino-acides (désamination couplée).

Gale [8], d'autre part, en travaillant avec *Staphylococcus aureus*, constate que la pénicilline à doses infraléthales freine la captation de l'acide glutamique par la cellule microbienne. Mais Hotchkiss [12] observe que certaines souches de Staphylocoques, pourtant très sensibles à la pénicilline, ne captent pas mieux l'acide glutamique en absence de pénicilline qu'en présence de l'antibiotique.

La pénicilline n'ayant pas d'action directe sur le métabolisme protidique proprement dit dans la cellule, il était intéressant d'étudier une souche pénicillino-résistante et de voir si son métabolisme protéique différait de celui d'une souche sensible comme diffère son métabolisme nucléique.

Notre étude a montré que la teneur en azote protéique des cellules bactériennes au cours de la croissance évolue de façon pratiquement identique dans les deux souches ; on note tout au plus une légère différence, peut-être non significative, en faveur de la souche résistante.

Nous avons vu chez deux types de bactéries, l'un à Gram positif et l'autre à Gram négatif, que le taux de protéines est le même pour la souche microbienne sensible que pour la souche résistante à la streptomycine. Mais une souche de *Staphylococcus aureus* pénicillino-résistante accumule un peu plus de protéines que la souche sensible à cet antibiotique.

On sait que les travaux de Caspersson [9] et de Brachet [10] ont fait admettre des relations étroites entre l'acide ribonucléique et la synthèse des protéines dans les cellules vivantes. D'autre part, d'après ces auteurs, la synthèse de l'acide ribonucléique semble précéder celle des protéines. (La teneur en acide ribonucléique du cytoplasme est d'autant plus grande que la synthèse protéique est plus active.)

Or, dans notre étude sur les bactéries streptomycino-résistantes,

nous n'avons pas observé de parallélisme entre les teneurs en acide ribonucléique et l'accumulation des protéines. La souche résistante accumule des quantités considérables d'acide ribonucléique, tandis que sa teneur en protéines reste identique à celle des souches streptomycino-sensibles. (La synthèse de l'acide ribonucléique ne semble pas précéder ici celle des protéines.)

En étudiant la pénicillino-résistance, nous constatons, bien que les teneurs en acide ribonucléique et en protéines varient dans le même sens, qu'il n'y a pas parallélisme.

Nos résultats sont exprimés par les courbes de la figure 6.

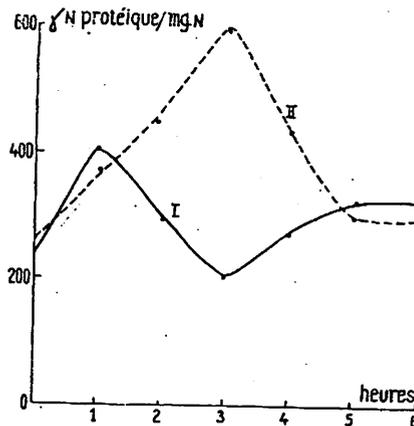


FIG. 6. — Azote protéique chez *Staphylococcus aureus*. I, souche pénicillino-sensible. II, souche pénicillino-résistante.

CONCLUSIONS.

Tandis qu'une souche de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistante n'accumule que de l'acide ribonucléique, une souche de même espèce, mais pénicillino-résistante, accumule non seulement des quantités supérieures d'acide ribonucléique, mais également de protéines, de mononucléotides puriques et de composés phosphoriques acido-solubles.

Ces différences sont peut-être basées sur les modes d'action différents des deux antibiotiques quant aux acides nucléiques : la pénicilline n'empêche pas la dépolymérisation de l'acide ribonucléique qui se dégrade et participe à la synthèse des protéines. La streptomycine, au contraire, se complexifie avec l'acide ribonucléique (ou avec des nucléoprotéines) et freine sa dépolymérisation [11].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1952, 83, 80.
- [2] F. GROS et M. MACHEBOEUF. Congrès de Copenhague 1947.
- [3] P. MITCHELL. *Nature*, 1949, 164, 259.
- [4] F. GROS et M. MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1948, 74, 378.
- [5] J. T. PARK et M. J. JOHNSON. *J. biol. Chem.*, 1949, 179, 585.
- [6] J. T. PARK. *J. biol. Chem.*, 1952, 194, 887.
- [7] F. GROS, M. MACHEBOEUF et P. LACAÏLE. *Ces Annales*, 1948, 75, 320.
- [8] E. F. GALE et E. S. TAYLOR. *Nature*, 1946, 158, 676.
- [9] T. CASPERSSON. Symp. Soc. exp. Biol. Nucl. Acids, 1947.
- [10] J. BRACHET. *Actualités Biochimiques*, 1951, 1.
- [11] S. S. COHEN. *J. biol. Chem.*, 1947, 168, 211.
- [12] R. D. HOTCHKISS. *J. exp. Med.*, 1950, 91, 351.