Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 16 (1963)

Heft: 2

Artikel: Un inducteur de croissance de Lactobacillus casei : contenu dans les protéines du sérum sanguin

Autor: Zender, R.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739353

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

UN INDUCTEUR DE CROISSANCE DE LACTOBACILLUS CASEI CONTENU DANS LES PROTEINES DU SERUM SANGUIN

PAR

R. ZENDER

INTRODUCTION

Nous nommons « inducteur de croissance » toute substance susceptible de faire passer brusquement une culture cellulaire, en phase de latence, à une phase de croissance logarithmique, et cela d'une manière prématurée par rapport à une culture témoin (sans inducteur) où la phase de croissance logarithmique se produira relativement tard. L'inducteur de croissance se distingue donc d'un « facteur de croissance » en ce qu'il n'est pas indispensable à la croissance, mais ne fait que déclencher une croissance qui, en son absence, ne se produirait que plus tard.

Von Bertalanffi [1] et Hinshelwood [2] ont donné de la croissance respectivement cellulaire et tissulaire en général et bactérienne en particulier des descriptions formulées mathématiquement. Toute croissance, suffisamment éloignée de sa phase finale, est de nature logarithmique. Pour une culture bactérienne, on aura:

$$n = n_0 \cdot e^{kt}$$

où « n_0 » est le nombre de bactéries au moment de l'inoculation et « k » une constante. Si une phase de latence d'une durée « L » appréciable existe, cette relation sera valable pour « $t > L$ » seulement.

Selon Hinshelwood [2], la durée de la latence « L » peut être décrite par la relation:

$$L = \frac{C' \cdot \beta}{(\beta - \alpha\, v) \cdot (n_0 + \gamma)}$$

« α », « β » et « γ » sont des constantes, « v » est le volume du milieu servant à l'inoculation et contenant « n_0 » bactéries; « C′ » est la concentration critique, dans

chaque bactérie, d'une substance hypothétique endogène, concentration permettant le départ d'une croissance logarithmique. La durée de la latence sera donc proportionnelle à cette concentration « C′ » et inversement proportionnelle à la dimension de l'inoculum, dimension représentée tant par l'apport du milieu mère « v » que par le nombre « n_0 » de bactéries inoculées. Si l'inoculation est constante, « n_0 » et « v » sont constants; on a alors « $L = K \cdot C'$ », expression dans laquelle la durée de la latence ne dépend plus que de la concentration critique, dans la cellule bactérienne, d'une substance.

Un inducteur de croissance serait donc un composé, ou un groupe de composés, capable ou bien de catalyser la biosynthèse de substances nécessaires à la croissance logarithmique, ou encore de se substituer aux dites substances. Cette représentation est probablement trop simple, nous y reviendrons; toutefois, elle a le mérite de mettre l'accent sur certaines carences, qui existent dans les cellules en période de latence, carences dont la nature est, à l'heure actuelle, peu connue.

Les bactéries en phase de latence ont fait l'objet de très nombreuses études dès le début de ce siècle. Rahn [3], en 1906, rapporte que la latence d'une culture est influencée par la dimension de l'inoculum dont elle est issue. Barber [4], en 1908, montre que la latence augmente si l'on s'écarte de la température optimale de la bactérie concernée. Chesney [5], en 1916, observe que la durée de la latence dépend de la phase dans laquelle l'inoculum est prélevé. En d'autres termes, si l'inoculum est issu d'une culture mère en phase stationnaire, la latence sera importante; en revanche, si les bactéries inoculées proviennent d'une culture en croissance logarithmique, la phase logarithmique se produira immédiatement dans la culture fille. En 1919, Clark et Ruehl [6] observent une variation du volume de la cellule bactérienne pendant la latence; ce volume croît dans les premières heures pour revenir à sa dimension initiale peu avant le départ de la croissance logarithmique. En 1923, Sherman et Albus [7] décrivent une plus grande sensibilité de la bactérie à l'action des agents chimiques et physiques pendant la phase de latence; ils ont nommé cet état: « physiological youth » de la bactérie. Henrici [8], dans une monographie en 1928, confirme les variations de volume observées par Clark [6]. Hegarty [9], en 1939, montre que *S. lactis* produit plus facilement un enzyme adaptatif (β — galactosidase), si l'induction de l'enzyme se fait durant la phase de latence. Hinshelwood [2], à qui nous renvoyons le lecteur pour plus de détails sur les différentes phases de la croissance bactérienne, a montré enfin qu'il est peu probable, sinon exclu, que la latence doive aboutir à un phénomène de sélection naturelle où une fraction seulement des bactéries inoculées serait capable de multiplication rapide.

Une population de bactéries, en phase de latence, est donc composée d'individus qui ne se multiplient que peu ou pas du tout; ils subissent des variations morphologiques: leur volume varie. Ils sont plus sensibles à l'action d'agents extérieurs physiques et chimiques. Ils subissent mieux l'influence d'inducteurs capables de modifier leur métabolisme adaptatif. Ils élaborent, enfin, les systèmes ou dispositifs (substance

hypothétique citée plus haut) qui, ultérieurement, leur permettront de se multiplier rapidement et régulièrement.

Trois problèmes se posent dès maintenant et peuvent être formulés en posant trois questions:

1) Quels sont les systèmes qu'élabore la bactérie en phase de latence, systèmes capables de provoquer ou de permettre une multiplication et une croissance rapide?
2) Quelles sont les substances, inducteurs de croissance, capables de promouvoir une accélération de la formation de ces systèmes ou de se substituer à ceux-ci ?
3) Quel est le mécanisme par lequel les inducteurs de croissance agissent sur la formation des systèmes précités?

Nous renvoyons la discussion de ces trois points à la fin de ce travail. En ce qui concerne le point 2), il fera l'objet d'une brève étude bibliographique concernant surtout l'étude des strépogénines. L'objet de la partie expérimentale de cette thèse sera la description d'un inducteur de croissance issu du sérum sanguin humain et de son mode d'action.

Woolley [10], en 1941, a mis en évidence certains facteurs de croissance de S. hémolytique dans des extraits de foie. Ces facteurs sont solubles dans l'eau, non dialysables, précipités à l'alcool, vraisemblablement de nature protéique. Ils gardent leur activité après hydrolyse chlorhydrique en milieu alcoolique. Ces observations sont confirmées par Grossowics [11].

En 1944, Sprince et Woolley [12] établissent la grande similitude des facteurs hépatiques agissant sur *Streptococcus hemolyticus* x 40, *Lactobacillus casei* et *Streptococcus lactis*. Toutefois, si le facteur concerné, nommé alors « strépogénine », est un facteur de croissance vrai pour S. hémolytique, il ne l'est pas pour *L. casei*, sur qui il n'agit que comme inducteur de croissance, dans le sens défini au début de cet exposé. La strépogénine décrite est partiellement dialysable (48 %) et détruite à raison de 81 % par hydrolyse HCl 1 N, 15 lbs., 1 heure. Ces auteurs relèvent, en outre, que la caséine ,intacte ou totalement hydrolysée, est inactive, tandis que partiellement hydrolysée (HCl 1 N, 15 lbs., et 1 heure), elle a une activité strépogénique bien mesurable.

Sprince et Wooley [13, 14] ont trouvé ces facteurs dans de nombreux hydrolysats enzymatiques de protéines purifiées et ont montré qu'il s'agissait de peptides de poids moléculaire relativement bas. En 1948, Woolley [15, 16, 17] montre qu'une altération des groupes $-NH_2$ terminaux de l'insuline par HNO_2 ou le dinitrofluoro-benzène supprime l'activité recueillie normalement dans l'hydrolysat de la protéine. Il indique une relation entre l'activité de divers peptides (PM 250-1000) et leur teneur en acide glutamique. Plus particulièrement, les peptides synthétiques, essayés alors, ne possédaient une activité strépogénique que lorsqu'ils contenaient au moins un reste

d'acide glutamique. Par ailleurs, les dérivés, où le groupe acide « γ » de l'acide glutamique est conjugué, possèdent une activité thermosensible par opposition à l'activité thermostable observée très généralement. Mistry [18] observe l'apparition de strépogénines dans les hydrolysats de diverses protéines. Borsook [19] isole des peptides actifs d'extraits de foie et de rate. On peut se demander si les peptides extraits par Borsook [19] ne sont pas le produit d'une autolyse tissulaire, autolyse dont le degré est passablement élevé dans ces tissus. Karrer [20] montre qu'il existe une certaine concordance entre la teneur en strépogénines et l'effet sur a croissance du rat, en différents hydrolysats de caséine et de soja; toutefois, la caséine non hydrolysée demeure supérieure, pour la croissance du rat, aux meilleures préparations strépogéniques. Kodicek [21] montre, pour toute une série de protéines, l'importance d'une hydrolyse ménagée; l'activité relative de la pepsine, par exemple, passe de 6 % à 160 % par hydrolyse chlorhydrique ménagée.

Les séquences de plusieurs peptides ont été établies. Tritsch et Woolley [22] ont isolé de l'insuline un penta, un hexa et un hepta-peptide à activité strépogénique.

Gonin [23], en 1958, isole de la fraction neutre de l'hydrolysat trypsique de caséine des peptides actifs à poids moléculaire relativement élevé, à 24, 27 et 29 restes d'acides aminés. Baudet et Cherbuliez [24, 25], en 1960, retirent des peptides, dont ils déterminent la structure, de la fraction basique de l'hydrolysat trypsique de caséine. Il s'agit de peptides à 11 et 12 restes d'acides aminés n'ayant aucun élément de structure rappelant ceux isolés par Merrifield et Woolley [26]. Baudet confirme ainsi l'idée que l'activité strépogénique n'est pas liée à des éléments de structure très spécifiques. O. Mikes et coll. [27, 28, 29, 30, 31], dans une série d'articles consacrés à l'isolement de peptides dérivés, en particulier, de la trypsine et du chymotrypsinogène, arrivent également à la conclusion « dass das sogenannte * Strepogenin * kein chemischer, sondern ein biologischer Begriff ist ».

Des tentatives ont été faites pour expliquer le mode d'action de ces peptides strépogéniques. Baudet et Cherbuliez [32, 33] ont montré que *L. casei* synthétise au cours de sa croissance des peptides dotés de propriétés strépogéniques; ces peptides sont intracellulaires, on ne les retrouve pas dans le milieu de culture, ils sont thermostables.

Snell [34, 35, 36, 37] a montré qu'il existe des mécanismes distincts pour la pénétration, dans *S. faecalis*, de la glycine, de l'alanine ou de l'alanylglycine; le peptide est le plus rapidement absorbé. Ces observations sont confirmées par Gouda et Chodat [38]. Toutefois, l'utilisation du peptide est conditionnée par sa scission, dans la bactérie, en ses deux composants. Si donc la strépogénine devait être hydrolysée de même à l'intérieur de la bactérie, il faudrait penser que son action porte principalement sur les perméases, permettant en quelque sorte un transfert plus rapide de matériaux à l'intérieur de la cellule. En revanche, Turba [39, 40, 41] et Mc Manus [42] ont montré, au cours de la croissance de levures, que les acides aminés semblaient se fixer d'abord dans une fraction peptidique et ensuite seulement dans les protéines;

ces observations tendraient à montrer que les peptides sont un stade intermédiaire de la biosynthèse protéique.

Zender et Borth [43], en 1962, utilisant une autre souche de *L. casei*, ont montré que certaines protéines, contenues dans un extrait de tissus placentaire, étaient des inducteurs de croissance, que l'on pouvait distinguer des strépogénines par leur thermosensibilité et leur haut poids moléculaire. Nous avons, depuis, retrouvé des inducteurs semblables dans le sérum sanguin humain, et la description de leur mode d'action fait l'objet de la présente recherche.

Un certain nombre d'observations nous ont amené à constater que la connaissance de l'évolution d'une culture soumise à l'action d'un inducteur de croissance était, à l'heure actuelle, insuffisante. D'une manière générale, on s'est contenté de mesurer la croissance induite d'une culture à un temps « x » convenable pour obtenir une relation reproductible entre la dose d'inducteur et la croissance considérée, cela souvent sans se préoccuper de l'évolution ultérieure de la culture, dont on a présumé qu'elle se poursuivait généralement jusqu'au taux atteint ultérieurement par la culture témoin non induite. De là, la définition que nous rappelons [43] des strépogénines: « corps doués de la faculté d'écourter le temps de latence d'une culture de bactéries sans modifier l'état final de cette culture ». Nous montrerons, dans l'étude qui suit, que cette définition n'est pas valable pour l'inducteur de croissance et la souche utilisés, sans préjuger du fait qu'elle peut le demeurer pour d'autres inducteurs ou d'autres souches.

Si l'on admet l'hypothèse d'après laquelle la strépogénine et/ou l'inducteur protéique sérique auraient un effet de catalyse sur la formation de systèmes métaboliques nécessaires à la croissance logarithmique, il n'est pas inutile de mentionner ici que cet effet peut être apparenté à d'autres phénomènes. Nous pensons premièrement à la biosynthèse induite des enzymes adaptatifs et, deuxièmement, suivant Pollock [44], à la formation des anticorps dans le règne animal. En effet, que l'inducteur soit un peptide strépogénique, une protéine sérique, un substrat enzymatique ou un antigène, dans ces quatre cas nous avons comme résultat de leur action une biosynthèse protéique rapide. Cette biosynthèse se traduira dans les deux premiers cas par une croissance rapide, dans les deux derniers par l'apparition de protéines spécifiques. Nous reviendrons sur ceci dans notre discussion.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Méthodes analytiques.

Azote total : micro-Kjeldahl.
Azote aminé : titration potentiométrique après addition de formol.
Electrophorèse : sur papier selon Grassmann et Hannig [45].

Protéines : à concentration élevée: colorimétrie basée sur la réaction du biuret; à basse concentration: méthode de King à l'acide sulfosalicylique modifiée par Sanz [46].

Glucose : par réaction à l'o-toluidine selon Dubowski [47], modifiée par Zender [48].

Na et K : par photométrie de la flamme.

Cl : par titration mercurique [49].

Phosphatases : selon Sommer [50].

2. Préparation du sérum inducteur.

500 prises de 10 ml de sang sont centrifugées et décantées une douzaine d'heures au plus tard après leur prélèvement. Elles proviennent de malades de l'Hôpital Cantonal de Genève. Les sera sont recentrifugés et décantés une deuxième fois pour éliminer le reste des éléments figurés, puis congelés immédiatement et conservés ainsi.

Le pool des sera, environ 1 litre, décongelé, est dialysé 5 fois 12 heures, chaque fois contre 10 volumes de NaCl 0,85 g/100 ml. Après dialyse, on ajoute au sérum un volume de NaCl 0,85 g/100 ml. Ce sérum dilué et dialysé (SDD) est stérilisé par filtration sous 2 kg de pression. Il est réparti stérilement en ampoules de 2 ml. Les ampoules sont scellées et congelées, elles demeurent ainsi jusqu'à leur utilisation.*

3. Analyse du sérum dilué et dialysé (SDD).

Azote total	5,18	g/l
Protéines totales	36,4	g/l (réaction du biuret)
Sodium	159	meq/l
Chlore	145	meq/l
P-ase alcaline	2,3	unités Bodanski
P-ase acide	1,7	unités King

Electrophorèse:	Albumines	14,6 g/l	(40,3 % du total des protéines)
	Globulines α_1	2,5 g/l	(7 % » » » »)
	Globulines α_2	5,3 g/l	(14,5 % » » » »)
	Globulines β	4,9 g/l	(13,4 % » » » »)
	Globulines γ	9,1 g/l	(24,8 % » » » »)

D'autres éléments et composés diffusibles sont en traces ou encore totalement absents à cause de la dialyse.

*) Nous remercions ici la firme Lucchini S.A. qui a bien voulu se charger de cette filtration et de la mise en ampoules.

Le sérum dialysé et dilué que nous utilisons est donc « normal », compte tenu des « valeurs normales » admises pour les méthodes analytiques employées. Relevons toutefois un rapport Albumines/Globulines (0,67) à la limite inférieure des valeurs normales (0,67-1,00). Cela peut être attribué à ce que les sera du pool proviennent de malades, chez qui ce rapport est très souvent perturbé, et pourrait l'être aussi à la préparation (congélations, dialyse et filtration) de SDD.

Il nous a paru nécessaire de comparer ce pool, provenant de 500 individus présumés malades, à un autre, provenant de 3 donneurs du Centre de Transfusion Sanguine à Genève, donneurs présumés sains. L'allure des courbes de croissance que nous avons obtenues était tout à fait la même, le pool de 3 donneurs avait toutefois seulement 71 % de l'activité du pool SDD. Cela pose le problème de savoir dans quelle mesure cette activité peut varier d'un individu à l'autre; nous n'en savons pour l'instant rien. Toutefois, et c'est ce qui nous importe ici, l'activité que nous mesurons semble ne pas pouvoir être attribuée, dans sa totalité, à un état morbide ou à la présence de traces de médicaments. Nous verrons d'ailleurs plus loin qu'elle se retrouve dans des fractions diverses du sang humain. Nous devons néanmoins prévoir la possibilité de cas pathologiques qui seraient caractérisés par une modification du taux de l'activité étudiée.

4. Préparation des solutions a partir de SDD.

Hydrolyse enzymatique

Trypsine « Boehringer » cristallisée, marche de l'hydrolyse selon Baudet [24] rapport Enzyme/Substrat = 1/173 mg/mg.

Papaïne « Siegfried », qualité technique, marche de l'hydrolyse comme pour la trypsine, rapport Enzyme/Substrat = 1/173.

Mesure de l'activité protéolytique

Après un temps « x » de protéolyse (alternativement hydrolyse), 1 ml du milieu réactionnel est déprotéiné avec 9 ml d'acide trichloracétique à 10 % p/v. Filtrer.

La lecture de l'extinction du filtrat se fait à 280 nm (Beckman DU) en utilisant comme blanc un mélange de 1 ml H_2O+9 ml acide trichloracétique à 10%.

Hydrolyse chlorhydrique

20 ml de SDD+146 ml de HCl conc. Ebullition douce pendant 24 heures à reflux. Evaporer à sec sur bain-marie et reprendre par NaCl 0,85%. Neutraliser par NaOH 1 N et filtrer.

Traitement au formol

20 ml de SDD + 39 ml de NaCl 0,85 % + 1 ml de formol 40 %, porter le mélange 1 heure à 65° C, comme le fait Nguyen Throng Thu [51], puis dialyser.

Fractionnement

a) *Opérations personnelles*

Fraction précipitant à 0,4 de saturation en sulfate d'ammonium à partir de SDD.

Fraction précipitant entre 0,4 et 0,75 de saturation en sulfate d'ammonium.

Ces deux fractions ont été centrifugées à 3000 t/min. à 10° C pendant 120 min. puis lavées 2 fois avec la solution de sulfate, respectivement à 0,4 et 0,75 de saturation, et recentrifugées à 3000 t/min. chaque fois.

Nous avons perdu une partie de la fraction 0,4 – 0,75, fraction qui sédimentait insuffisamment à 3000 t/min. Les fractions se redissolvent dans NaCl 0,85 %; elles sont enfin dialysées dans cette solution.

b) *Fractions obtenues à l'extérieur*

Albumine	Croix-Rouge Suisse *
α – globuline (Fract. IV)	Nutr. Biochem. Corp.
β – globuline (Fract. III)	Mann Research Laboratories
γ – globuline	Croix-Rouge Suisse *
Fibrinogène	Croix-Rouge Suisse *
Transferrin-fraction (Fract. IV-7)	Kabi

Ces diverses fractions proviennent de plasma humain.

5. Souches.

La souche de *L. casei* que nous utilisons nous a été fournie par l'Institut Suisse des Vitamines à Lausanne. L'examen de cette souche en milieu peptoné, au pH 6,6, au jus de tomate nous donne:

a) *en milieu liquide :* bâtonnets aérobies, gardant le Gram, immobiles, allongés, à bouts carrés, souvent en chaînes, quelquefois en très longs filaments incurvés;

b) *en milieu solide :* très petits colonies rougeâtres, lisses et rondes. Mêmes caractères de coloration qu'en milieu liquide, moins de formes longues incurvées.

*) Préparée selon Kistler et Nitschmann [52].

La souche de Lausanne a été repiquée 2 fois sur lactobacilli-broth 0901, (Difco), puis, après dilution, sur lactobacilli-agar 0900 (Difco). Elle fut ensuite repiquée sur le milieu de conservation à partir d'une seule colonie.

6. Milieux.

Milieu de conservation

Il s'agit d'un milieu lait-levure, préparé en ajoutant à 500 ml de lait dégraissé une suspension de 10 g de levure dans 50 ml d'eau dist., suspension préalablement portée 3 fois à l'ébullition et centrifugée. Ce milieu est stérilisé 3 fois 20 min. à 100° C à 24 heures d'intervalle. Il est incubé chaque fois entre les stérilisations 24 heures à 37° C; après chaque incubation, on élimine les tubes qui se sont coagulés.

La souche est repiquée sur le milieu de conservation tous les 60 jours à l'aide d'une anse de platine. Lors de chaque repiquage, on laisse la culture se développer à 37° C jusqu'à coagulation du lait. Les souches sont conservées ensuite au frigo à +4° C.

Inoculum

Nous utilisons, pour préparer l'inoculum, le bacto-lactobacilli Broth 0901 Difco. La souche est passée sur une anse de platine directement du milieu de conservation sur le bouillon, réparti dans des éprouvettes à raison de 5 ml. On laisse ensuite la culture se développer pendant 24 h. à 37° C, et on repique sur 5 ml de bouillon 0901 frais à raison de 0,1 ml chaque fois. Ce processus est répété toutes les 24 h. La culture ne sera utilisée, pour la préparation de l'inoculum, qu'après au moins 4 repiquages.

L'inoculum est préparé en diluant la culture de 24 h. 100 fois avec NaCl 0,85% (pds/vol.), stérile.

Pour nos essais, il n'a pas été nécessaire de centrifuger et laver la bactérie avant de l'inoculer. Les traces du milieu 0901, contenues dans l'inoculum, n'ont, dans nos conditions de travail, pas d'effet strépogénique.

Milieu d'essai

(Selon Landy et Dicken, 1942) [53].

Nous préparons le milieu d'essai par portions de 1 litre selon la méthode détaillée ci-dessous:

Solution A

Casamino acids, vitamin free (D) *	5	g
$CH_3COONa3H_2O$ (M) *	6	g
D (+) Glucose, vitamin free (R) *	10	g
L (−) Asparagine (R)	0,25	g
H_2O dist.	600	ml

Agiter jusqu'à dissolution.

Solution B

L (−) Cystine (R)	0,1	g
L (−) Tryptophane (R)	0,1	g
H_2O dist.	200	ml
HC1 conc. (M)	2	ml

Agiter à 70° C jusqu'à dissolution.

Mélanger les deux solutions *A* et *B* et ajouter:

10	ml solution I	0,1	ml solution V
10	ml solution II	1	ml solution VI
0,1	ml solution III	5	ml solution VII
1	ml solution IV	5	ml solution VIII

Le milieu ainsi préparé a un pH d'environ 4,5; il est ramené à pH 6,8 exactement par adjonction de NaOH 1 N (environ 25 ml). On ajoute ensuite de l'eau dist. pour compléter au litre, on filtre et répartit dans des éprouvettes pyrex de 16 × 160 mm, à raison de 5 ml par éprouvette, on stérilise 15 min. à 120° C.

Solution I:	Guanine (R)	50	mg
	Adénine (R)	50	mg
	Uracile (R)	50	mg
	H_2O dist.	98	ml
	HC1 conc. (M)	2	ml
Solution II:	Xanthine (R)	50	mg
	NH_4OH 0,2 N	100	ml
Solution III:	Acide Folique (R)	10	mg
	H_2O dist.-dist.	79	ml
	NaOH 1 N	1	ml
	Ethanol 95%	20	ml

* (D) pour Difco
(M) pour Merck
(R) pour Hofmann-La-Roche

Solution IV:	Thiamine-HC1 (R)	10	mg
	Riboflavine (R)	20	mg
	Pyridoxine-HC1 (R)	40	mg
	H_2O dist.	80	ml
	HC1 1 N	20	ml
Solution V:	Biotine (R)	10	mg
	Ethanol 50%	200	ml
Solution VI:	D (+) Pantothénate de Ca (R)	20	mg
	Acide Nicotinique (R)	20	mg
	Ethanol 50%	100	ml
Solution VII:	KH_2PO_4 (M)	5	g
	K_2HPO_4 (M)	5	g
	H_2O dist. ad	50	ml
Solution VIII:	$MgSO_4 - 7\ H_2O$ (M)	10	g
	NaC1 (M)	0,5	g
	$FeSO_4 - 7\ H_2O$ (M)	0,5	g
	$MnSO_4 - H_2O$ (M)	1	g
	H_2O dist. ad	250	ml

Certains de ces mélanges de composants se dissolvent mal à la température ordinaire; dans ce cas, on chauffe les liqueurs doucement sous un courant d'eau chaude. Ces solutions sont ensuite conservées à 4° C pendant au maximum 15 jours.

La firme Difco a bien voulu nous communiquer l'analyse approximative de l'hydrolysat de caséine que nous utilisons:

Bacto-Casamino Acids — Vitamin Free

	%
Cendres	39
Azote total	8
Azote aminé	6,5
Acides aminés	
Arginine	2
Acide aspartique	5
Acide glutamique	15
Glycine	1
Histidine	1,5
Isoleucine	4
Leucine	5
Lysine	5

	%
Méthionine	1
Phénylalanine . . .	2
Thréonine	2
Tyrosine	1
Valine	4

Notre milieu peut donc être considéré comme très complet en ce qui concerne la répartition des acides aminés apportés par l'hydrolysat Difco; nous l'enrichissons encore en tryptophane, cystine et asparagine.

Stérilisation des solutions actives

Les solutions de protéines sont stérilisées par filtration sur verre fritté Jéna 3G5M ou prélevées directement et stérilement dans les ampoules stérilisées.

7. Technique de Mesure.

Plusieurs tubes (16 × 160 mm) avec des prises de 5 ml du milieu d'essai sont préparés pour chaque dose de chaque échantillon examiné. Cette dose d'échantillon est introduite stérilement dans chacun des tubes, puis le volume du milieu est complété à 6 ml par NaCl 0,85 % stérile. Tous les tubes sauf un sont ensuite inoculés à raison de 0,03 ml de l'inoculum par tube. Le dernier tube servira d'essai à blanc pour la lecture turbimétrique des tubes inoculés. On agite et on incube à 37° C. Après une durée de culture déterminée, on lit la turbidité, due à la croissance de la bactérie, soit directement sur les tubes de culture, si nous désirons répéter nos mesures dans le temps, soit sur un seul tube calibré, s'il s'agit de faire un dosage à un seul temps. La lecture est faite sur le colorimètre Beckman C avec un filtre à 560 nm. La longueur d'onde choisie n'est d'ailleurs pas déterminante pour une mesure de turbidité tant que la coloration du milieu ne varie pas, comme c'est le cas ici. Lors de mesures sur les tubes de culture, nous avons constaté que la reproductibilité était bonne (de l'ordre de 5 %) si les éprouvettes utilisées étaient triées et celles d'un diamètre visiblement plus ou moins fort éliminées.

8. Les dosages biologiques et leur evaluation.

Comme c'est souvent le cas dans les réactions microbiologiques, la turbidité, mesure de la croissance des organismes, augmente, dans des conditions par ailleurs égales, proportionnellement avec la dose de l'extrait actif, et la courbe montrant,

en coordonnées arithmétiques, la relation entre la dose et l'extinction est une droite qui passe par la lecture du témoin (dose zéro). Il s'agirait donc d'un dosage du type des « slope-ratio assays » (Bliss, 1952) [54].

Dans un certain nombre de cas, où nous ne désirons pas interrompre le cours de la croissance bactérienne, nous exprimons l'activité de nos inducteurs par la relation:

$$\text{Activité } x = \frac{\text{Extinction moyenne de } x}{\text{Extinction moyenne de } t},$$

l'activité de « t » (témoin = SDD) étant arbitrairement fixée à 1 pour une dose déterminée.

Lorsque, au contraire, nous avons voulu déterminer cette activité, à un moment donné de la croissance, en tenant compte de plusieurs doses, et évaluer statistiquement nos résultats, nous avons employé l'arrangement expérimental des dosages multiples avec trois doses de chaque échantillon à doser et de l'étalon et avec trois tubes pour chaque dose.

Le SDD dilué, au moment de l'emploi, avec 2 volumes de NaCl 0,85 g/100 ml stérile nous sert d'étalon, son activité est égale à 1 par définition. Six tubes témoins, inoculés mais sans sérum (dose zéro), sont également préparés en complétant le volume du milieu à 6 ml par 1 ml de NaCl 0,85 %. Tous les tubes d'un dosage multiple sont incubés ensemble. On peut ainsi doser sept ou huit préparations simultanément (environ 100 tubes); pour des raisons techniques, il est préférable de ne pas augmenter ce nombre.

Pour pouvoir utiliser les techniques de calculs plus simples et mieux étudiées des « parallel-line assays », nous choisissons un quotient constant ($J = 2$) des doses contiguës, et nous transformons toutes les lectures (D_x) de turbidité selon la formule suivante (Gaddum, 1953) [55]:

$$Y = 100 \cdot \log (10^3 D_x - 10^3 D_o),$$

où « D_o» est la moyenne des lectures témoins (dose zéro). En portant les valeurs moyennes de « Y » en fonction du logarithme de la dose, on obtient des lignes droites et parallèles pour les différentes préparations.

L'arrangement expérimental symétrique (constance du nombre d'observations par dose ($n = 3$) et la progression géométrique des doses ($I = \log J = \log 2 = 0{,}301$)) nous permet d'employer, pour l'évaluation biométrique des dosages, un système de calcul simplifié décrit récemment pour les dosages biologiques multiples (Borth, 1960) [56]. Nous calculons pour chaque extrait dosé son activité (rapportée à l'étalon = 1) et les limites de confiance des ces résultats pour une probabilité de $P = 0{,}05$. Pour chaque série de dosages, nous examinons les critères de validité (régression, parallélisme, courbure), et nous calculons les indices de précision (L et λ).

EXPÉRIENCES BIOLOGIQUES

1. Effet général de SDD a diverses doses sur la croissance de L. casei.

DESCRIPTION DES PHASES DE CROISSANCE.

Nous avons porté sur la figure 1 les courbes de croissance de *L. casei* en présence de 0,2, 0,1 et 0,05 ml de SDD par tube de 5 ml de milieu. Chaque point de ces courbes est la moyenne des lectures de 5 tubes. Ces quantités d'inducteurs représentent respectivement 7,28, 3,64 et 1,82 mg de protéines sériques par tube; rappelons à ce sujet que Sprince et Woolley [12] utilisaient 5 mg de la fraction L de Wilson (extrait de foie) pour obtenir une croissance maximale, qui, selon Kodicek [21], aboutirait à 1,5 mg de bactéries (poids sec) par tube de 5 ml. L'introduction de l'inducteur se fait immédiatement avant l'inoculation, et la culture est conduite à 37° C à l'obscurité.

A. *Culture témoin*

L'évolution de la culture témoin (dose zéro) se déroule en quatre phases bien distinctes:

Une *prophase de latence* qui dure ici une douzaine d'heures environ. Pendant cette phase, la culture est inerte et la multiplication cellulaire est très faible ou inexistante. Cette phase traduit les contraintes qu'impose à la bactérie le milieu nouveau sur lequel elle est inoculée. Cette phase traduit probablement aussi un effet de détoxication selon Chesney [5]. Prises, en effet, dans la phase finale ou stationnaire du milieu mère, les bactéries, servant à l'inoculation, contiennent une certaine proportion des produits toxiques qui s'accumulent en fin de culture; d'où, ensuite, une étape de « détoxication » sur le milieu fille. Adaptation aux contraintes nouvelles du milieu fille, détoxication des résidus du milieu mère semblent donc présider à cette prophase de latence.

A la fin de cette phase, une division cellulaire nettement perceptible se produit, et la culture bactérienne atteint rapidement un niveau de croissance nouveau, celui-ci va peu varier durant 36 heures dans l'exemple de la figure 1, c'est-à-dire jusqu'à la 48e heure environ. Cette phase de 36 heures est la *phase de latence vraie*, durant laquelle la bactérie va élaborer les systèmes qui, plus tard, vont lui permettre de se multiplier rapidement, cela selon la conception déjà ancienne de Penfold [57]. Cet auteur estimait que la phase de latence correspondait à l'accumulation de métabolites néces-

saires à la croissance; nous pensons plutôt qu'il s'agit de systèmes métabolisants, dont le plus important sera sans doute le « protein forming system ».

Il existe donc une « période » de la croissance où la bactérie passe d'une prophase de latence à une phase de latence vraie et, à ce moment, correspond une multiplication plus rapide que dans l'une ou l'autre des deux phases. Cette multiplication correspond-elle à la présence, dans le milieu, d'inducteurs de croissance en traces, ou, au contraire, à la présence, dans la bactérie, des systèmes précités hérités du travail qui s'est fait dans le milieu mère? Nous n'en savons rien. Nous pensons toutefois qu'il est intéressant de constater cette division de la latence classique, en deux étapes

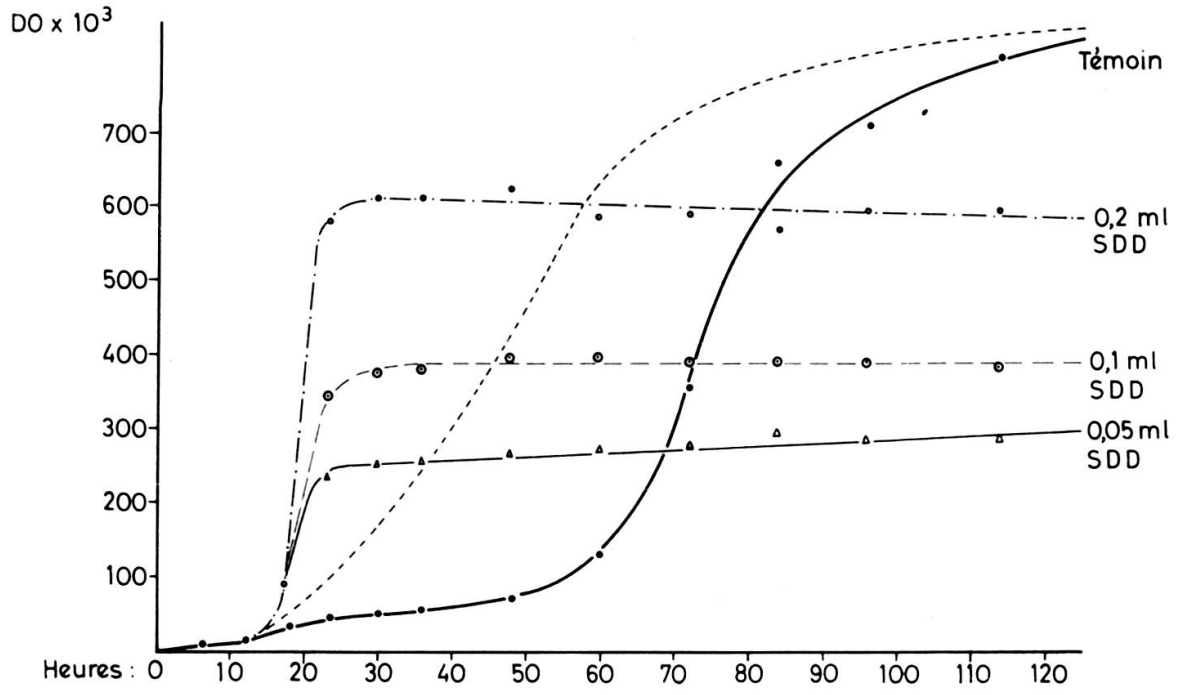

Fig. 1.
Effet inducteur de SDD, à différentes doses, sur la croissance de *L. casei*.

distinctes: prophase de latence et latence vraie, et de concilier ainsi les théories de Chesney [5] et de Penfold [57] qui, l'une et l'autre, permettent une interprétation d'une période de la croissance bactérienne. Par ailleurs, nous verrons plus loin que cette distinction de deux phases de la latence est validée par le fait que la bactérie est non-inductible en prophase de latence et, au contraire, inductible dans sa deuxième phase.

A ces deux phases de la latence succède une *phase logarithmique* classique, puis une *phase stationnaire*. La culture témoin se définit donc par quatre phases: Prophase de latence — latence vraie — logarithmique — stationnaire. Ultérieurement, la culture se lyse en une cinquième phase qui ne nous concerne pas ici.

B. *Culture induite*

Les cultures induites ont une allure tout à fait différente. On peut relever trois phases de leur croissance. La première de ces phases ne se distingue pas de la *prophase de latence* de la culture témoin, elle dure également une douzaine d'heures, et pendant cette durée, il n'est pas possible de distinguer une culture témoin d'une culture induite.

A la fin de la prophase de latence, l'effet de l'inducteur de croissance va se manifester très brusquement. La culture entre dans sa deuxième phase que nous nommons *phase logarithmique précoce* pour des motifs qui seront expliqués plus loin. Cette phase est brève, et la multiplication des bactéries se fait à un rythme rapide, plus

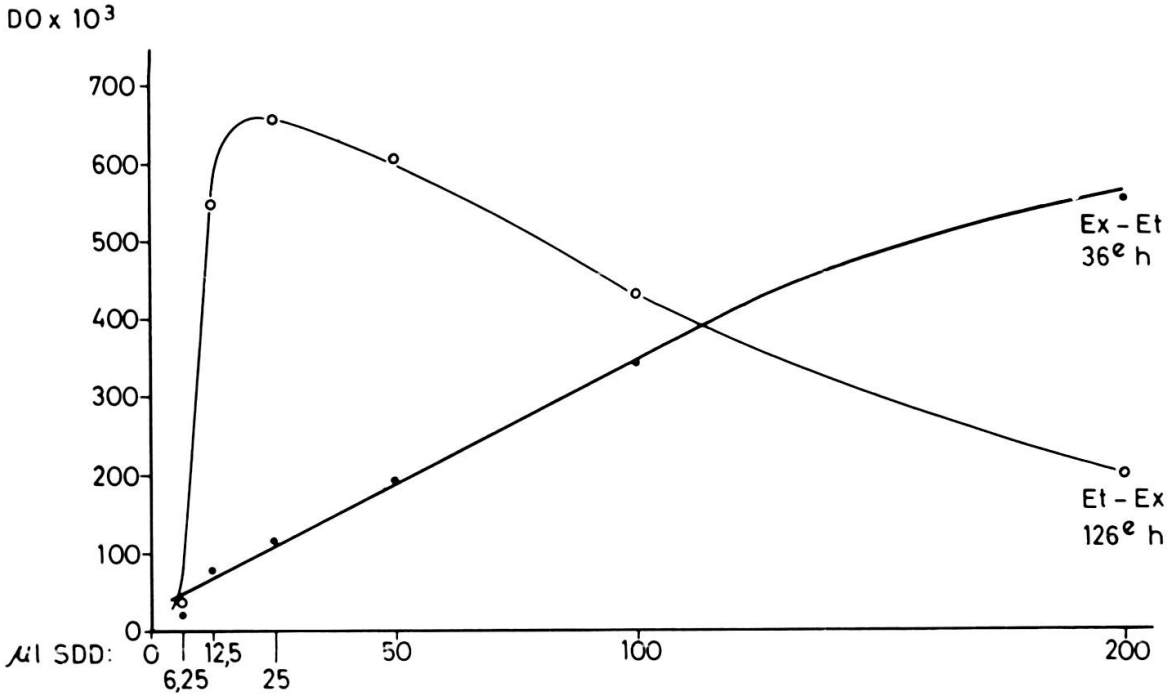

Fig. 2.

Relation entre la dose de SDD et la mesure turbidimétrique de la croissance de *L. casei* mesurée à 36 h. (courbe Ex-Et) et à 126 h. (courbe Et-Ex).

Et = extinction dose 0
Ex = extinction dose x.

rapide même que durant la phase logarithmique du témoin. Tout se passe dans le temps comme si cette phase était une exaltation de la multiplication cellulaire qui se produit, dans la culture témoin, entre la prophase de latence et la phase de latence vraie.

La culture, à la suite de cette phase logarithmique précoce, atteint sa troisième phase que nous nommons *phase de latence induite*, au cours de laquelle le niveau de la croissance ne variera plus (nous l'avons mesurée jusqu'à 170 heures). Ce niveau va dépendre de la dose d'inducteur de croissance ajoutée, et nous pouvons voir à la

figure 2 qu'il existe, à la 36e heure de la culture (courbe Ex-Et), de 25 à 150μl de SDD, une relation linéaire entre la dose de SDD et la différence des croissances induite et témoin. Lorsque la comparaison des cultures induite et témoin est prolongée au-delà de la 36e heure et jusqu'à, par exemple, la 126e heure, nous assistons à un renversement de la situation au moment où la culture témoin s'est entièrement développée, tandis que les cultures induites sont toujours à leur niveau de la 36e heure. Un effet d'inhibition de la culture peut alors être décrit (courbe Et-Ex), effet qui, lui, est inversement proportionnel à la dose de l'inducteur; cela à partir de la dose minimum active, ici environ 12μl de SDD, en-dessous de laquelle la courbe de la culture induite tend à se confondre avec celle du témoin.

Nous pensons que cet effet inhibiteur de la croissance traduit, d'une part, le manque d'autonomie physiologique des bactéries ayant reçu une dose suffisante, par exemple 12μl de SDD, d'inducteur. Ces bactéries renoncent, en quelque sorte, à créer l'appareil adaptatif qui leur serait nécessaire pour continuer leur croissance sur le nouveau milieu jusqu'au niveau final du témoin. Il s'agit d'un défaut de l'adaptation qui, chez le témoin, se fait pendant la phase de latence vraie. D'autre part, il est certain, et nous le montrerons plus loin, que l'entretien prolongé d'une population de bactéries aux niveaux atteints, grâce à l'inducteur, épuise le milieu. Si, par exemple, au moment où le témoin commence sa phase logarithmique, les bactéries des cultures induites avaient pu élaborer les systèmes permettant une croissance autonome, elles ne pourraient pas les utiliser, étant donné la perte en éléments nutritifs qui s'est faite au cours de la phase de latence induite; perte d'entretien qu'il faut distinguer de la perte par croissance.

Nous avons tracé, en pointillé sur la figure 1, la courbe de croissance que l'on pourrait observer si l'effet inducteur du SDD était semblable à celui des strépogénines peptidiques. Cette courbe eut résulté d'une diminution de l'une ou de l'autre, ou des deux phases de latence. Notre étude, peut-être insuffisante, de la littérature concernant les strépogénines ne nous a pas permis de trouver une description complète de la croissance bactérienne, en présence de strépogénines peptidiques. Nous avions nous-mêmes publié [43] une courbe de croissance en présence d'extrait placentaire, semblable à la courbe pointillée de la figure 1. Nous devons maintenant l'interpréter comme représentant une dose maximum d'inducteur placentaire. En effet, au-delà des doses d'inducteurs donnant une réponse linéaire (voir fig. 2), le niveau final de la croissance atteindra, à de fortes doses d'inducteur, le niveau de croissance final de la culture témoin. Ce dernier niveau sera même un peu dépassé en suite de l'économie du milieu qui est faite, la culture n'étant pas entretenue pendant une phase de latence vraie prolongée.

Quoi qu'il en soit, nous pensons avoir montré que l'effet de l'inducteur sérique sur la croissance de notre souche est différent de l'effet strépogénique, tel qu'il est décrit. Il serait sans doute intéressant d'étudier de la même manière d'autres inducteurs et d'autres souches.

2. Variation du taux de croissance de cultures témoin et induite par 0,1 ml de SDD.

Au cours d'une autre expérience (fig. 3), nous avons étudié les déviations absolues qui se produisent au cours des phases énumérées ci-dessus, dans les cultures induite et témoin. Nous avons inoculé 10 tubes contenant 0,1 ml de SDD et 9 tubes témoins, en utilisant comme toujours un tube non inoculé, comme blanc.

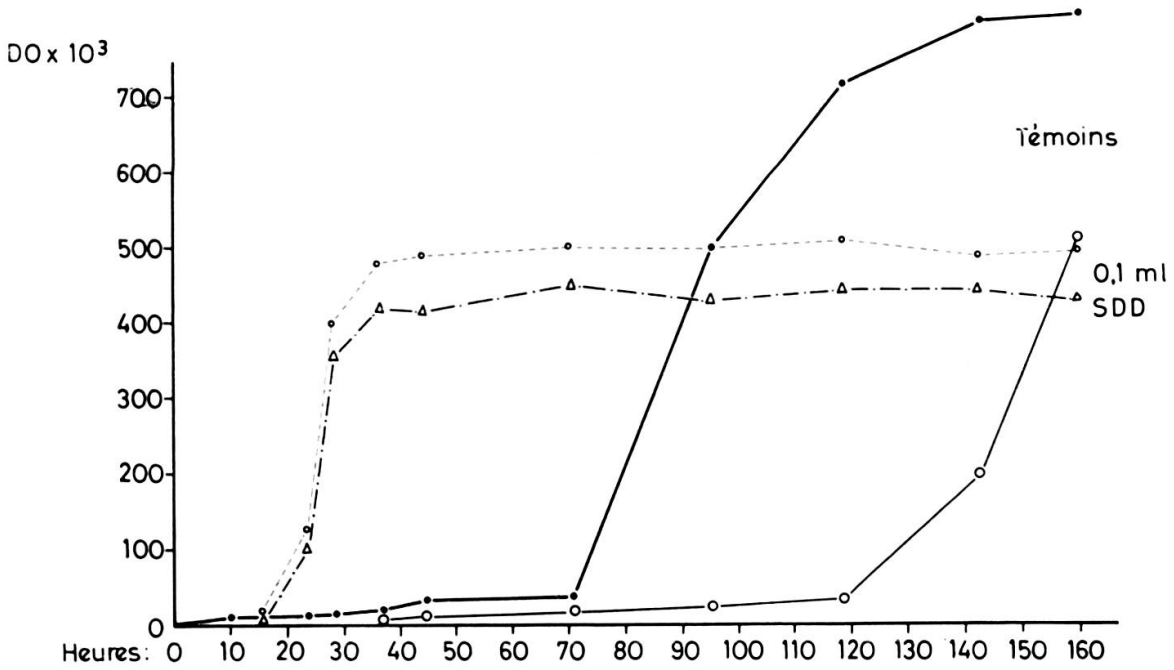

Fig. 3.

Mesure de la croissance en la présence et en l'absence de 0,1 ml de SDD pour 5 ml de milieu d'essai — Dispersion des résultats.

●——● Croissance témoin: valeur maximum
○——○ Croissance témoin: valeur minimum
○----○ Croissance induite: valeur maximum
△—·—·—·—△ Croissance induite: valeur minimum

Nous constatons alors qu'il existe une bonne reproductibilité des effets observés en ce qui concerne la *courbe induite*. Compte tenu des variations qui existent dans le diamètre des tubes à essai, cette reproductibilité est même très bonne, la dispersion des résultats est de l'ordre de 10 % de leur valeur moyenne.

En revanche, en ce qui concerne la *courbe témoin*, la reproductibilité de la phase logarithmique est beaucoup moins bonne. Tous les tubes se comportent d'une manière semblable jusqu'à la 70e heure environ, mais ensuite la phase logarithmique va démarrer dans certains dès la 70e heure et dans d'autres à la 120e heure seulement. Ce sont alors ces différences, souvent importantes, dans le temps de latence vraie de la culture témoin, qui provoquent l'aspect en plage de la phase logarithmique.

Ajoutons, pour être complet, que certains tubes, rares il est vrai, n'atteignent jamais la phase logarithmique, leur développement avorte.

Cette dispersion chez le témoin est une expression de la variabilité de l'activité génétique du germe entraîné à croître sur Difco 0901, à l'égard des contraintes que lui impose le milieu nouveau sur lequel il est inoculé. En revanche, la faible dispersion des résultats du système avec inducteur semble montrer que l'effet de ces mêmes contraintes vis-à-vis du germe est annulé par SDD.

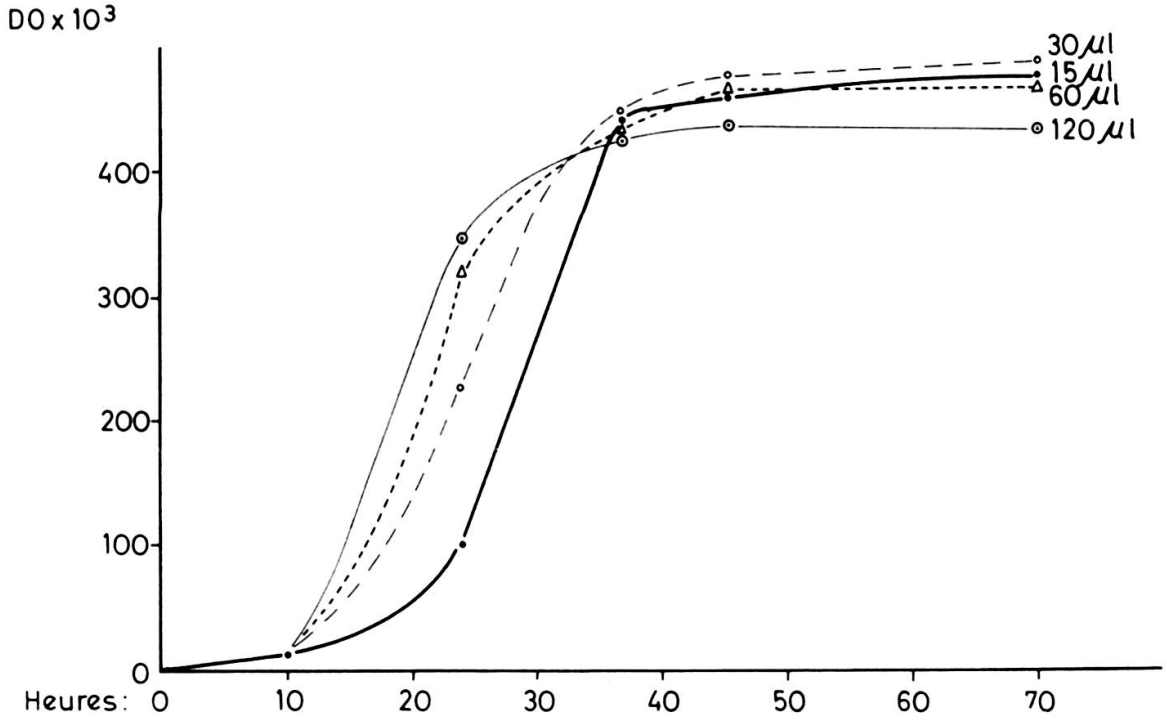

Fig. 4.
Effet sur la croissance, induite par 100 µl de SDD pour 5 ml de milieu d'essai, de volumes d'inoculum croissants de 15-120 µl.

La figure 3 nous permet aussi de relever que la durée totale des prophase de latence et phase de latence vraie varie d'une expérience à l'autre (comparer avec fig. 1). Cette variation peut être attribuée à des inégalités thermiques de notre étuve ou à des variations expérimentales dans la richesse de l'inoculum. Elle ne joue pas de rôle au cours d'une expérience individuelle.

3. Effet, sur la croissance induite, de la variation du volume d'inoculum.

Nous savons [3] que la durée de latence (prophase de latence plus latence vraie) est influencée par le volume de l'inoculum. Nous avons constaté que cela n'est plus le cas en présence de 0,1 ml de SDD. Nous voyons, en effet, sur la figure 4 que la varia-

tion du volume de l'inoculum, que nous avons fait varier entre 15 μl et 120 μl, ne modifie pas la durée de la latence. Celle-ci est toujours égale à la prophase de latence de 12 heures. Cette variation de volume ne modifie pas non plus sensiblement le niveau final de la culture; elle semble tout au plus exercer un rôle sur la vitesse de multiplication pendant la phase logarithmique précoce. Quel que soit donc, dans

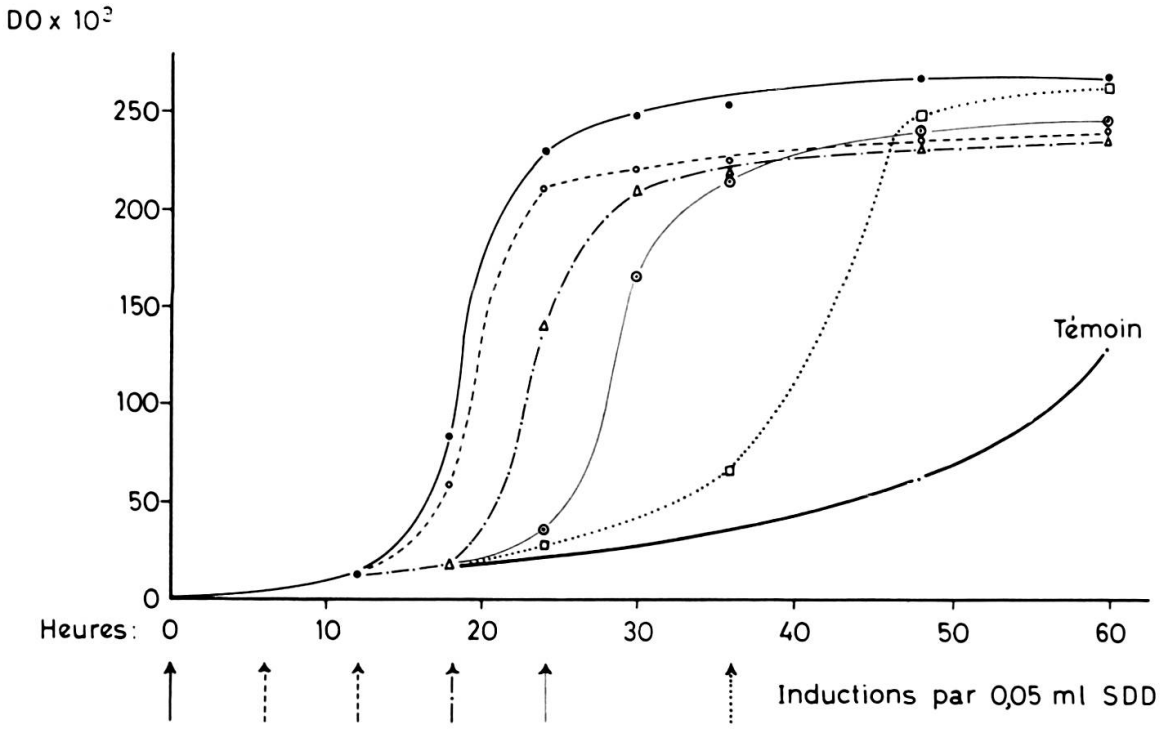

Fig. 5.

Inductions par 50 μl de SDD de la croissance de *L. casei* à divers moments de la latence i.e. à 0, 6, 12, 18, 24 et 36 h. Le point de départ élevé de la culture induite à 36 h. est une expression de la variabilité du témoin.

les limites indiquées, le nombre de bactéries inoculées, d'une part elles ne sont pas sensibles à l'action de l'inducteur pendant la prophase de latence, et d'autre part, elles le deviennent dès que cette phase est achevée.

4. Ajouts de l'inducteur a différents moments de la latence. Effet d'une induction surnuméraire.

L'induction par SDD peut se faire à divers moments pendant la prophase de latence et la phase de latence vraie. Nous avons induit avec 50 μl de SDD des cultures de *L. casei* respectivement 0 heure, 6 heures, 12 heures, 18 heures, 24 heures et 36 heures après leur inoculation: figure 5. On observe que les inductions faites pen-

dant les 12 premières heures, c'est-à-dire pendant la prophase de latence de la culture, provoquent une phase logarithmique précoce débutant à la douzième heure. Les inductions de 6 et 12 heures donnent des courbes qui ne se distinguent pas l'une de l'autre et qui démarrent en même temps que celle résultant de l'induction à 0 heure. En revanche, l'induction effectuée pendant la phase de latence vraie, c'est-à-dire dès et y compris la 12e heure, se traduit par un démarrage presque immédiat de phases logarithmiques précoces, respectivement à 12, 18, 24 et 36 heures. Ce phénomène montre bien l'existence de deux phases de latence. En effet, la bactérie, à la douzième heure de sa culture environ, passe d'un état inerte à un état de réactivité vis-à-vis de l'inducteur sérique. Cette réactivité accrue peut traduire l'adaptation de la bactérie à son nouveau milieu, elle peut aussi traduire une détoxication de la bactérie; ces deux interprétations ne s'excluent pas d'ailleurs.

Pendant la phase de latence vraie, allant ici de 12 heures à 50 heures environ, la bactérie est constamment susceptible d'être induite, et sa réponse à une dose donnée d'inducteur sera la même, elle atteindra le même niveau final de culture. L'inducteur, pendant la phase de latence vraie, accélère les processus autocatalytiques du métabolisme endogène et situe la population bactérienne dans un régime amélioré. Nous verrons plus loin que les effets de l'inducteur portent vraisemblablement sur l'appareil périphérique de la bactérie qui possèderait des récepteurs sensibles à SDD dès que la prophase de latence est dépassée.

Il faut aussi comprendre, cette expérience complétant la précédente, que le niveau final de la culture induite ne dépendra que de la concentration de l'inducteur dans le milieu de culture. En revanche, elle ne dépendra ni du nombre des bactéries inoculées, ni de l'état d'adaptation physiologique au milieu plus ou moins avancée auquel seront parvenues ces bactéries en latence vraie. Le niveau de croissance final ne variera plus, même lorsque l'induction aura été faite à 36 heures. L'induction détermine donc une croissance précoce qui exclut tout développement logarithmique normal ultérieur dans les conditions de l'expérience.

Nous nous sommes demandé si le pH atteint par la culture au cours de sa phase logarithmique précoce pouvait être la cause d'une inhibition de croissance ultérieure. Pour examiner ce point, nous avons conduit une culture en ballons de 50 ml, induite avec 0,5 ml de SDD, jusqu'à la 30e heure. Son niveau de croissance donnait une extinction de 0,235, et le pH du milieu était tombé de 6,8 à 5,3. Le pH a été alors ramené à 6,8 par addition de 6 ml de NaOH 0,1 N stérile. La culture a ensuite été continuée. A 60 h, son extinction était de 0,225 et le pH de 5,25, tandis qu'un ballon identique, mais dont le pH n'avait pas été corrigé, se situait respectivement à E= 0,250 et pH 4,80. A 84 h, les extinctions des deux ballons étaient respectivement de 0,240 et 0,255. Le témoin sans inducteur montait normalement alors à E = 0,670. Cet essai montre, d'une part, que le pH acide n'est pas, à ces valeurs, la cause de la cessation de la croissance, et d'autre part, que la bactérie, en phase de latence induite, est active métaboliquement (production d'acide lactique).

Une exception existe à la règle formulée à la fin du paragraphe pénultième: lorsque, après avoir atteint la phase de latence induite, on ajoute à une culture, induite au moment de l'inoculation par une dose de, ici, 0,05 ml de SDD, une nouvelle dose de, par exemple, 0,1 ml de SDD (fig. 6), on observe alors un nouveau départ de la

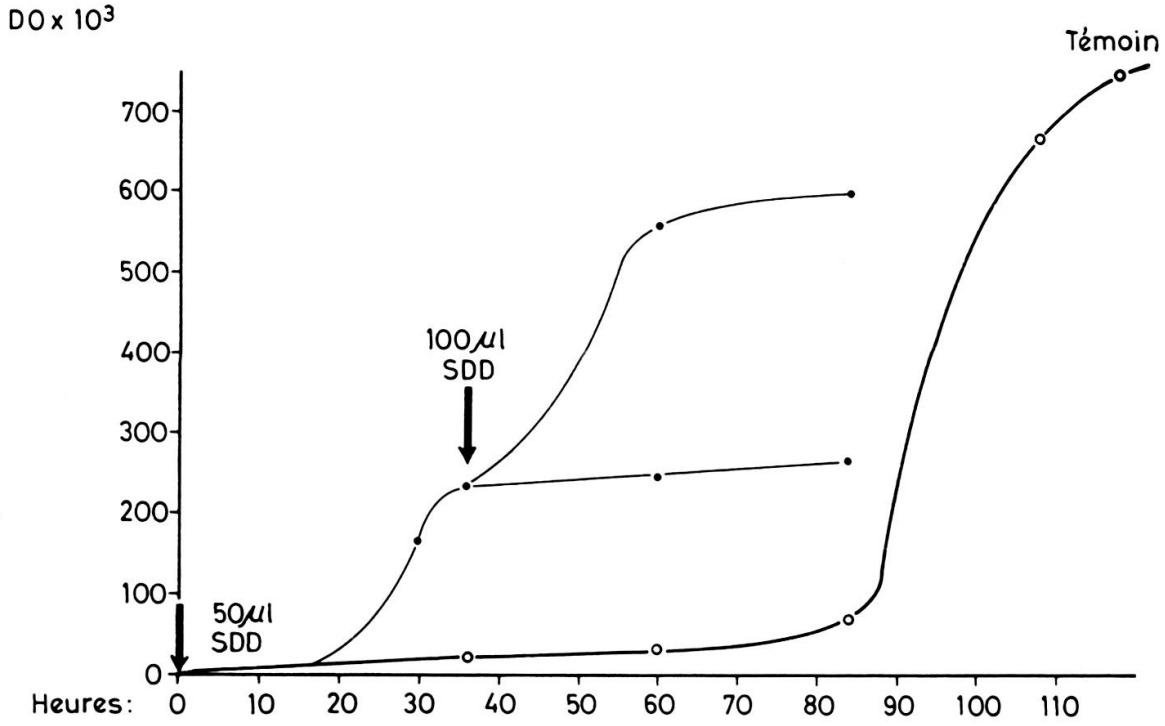

Fig. 6.
Induction surnuméraire par 100µl de SDD d'une culture déjà induite par 50 µl de SDD.

croissance; son niveau final dépend de la concentration totale de l'inducteur, soit 0,150 ml de SDD.

5. Analyses du milieu au cours de la croissance des systèmes témoin et induit.

Pour confronter ces observations sur la croissance bactérienne avec quelques mesures de l'activité métabolique du germe, nous avons procédé à des cultures de 100 ml, les unes induites par une dose de 2 ml de SDD (correspondant à 0,1 ml pour 5 ml de milieu), les autres sans inducteur. Nous avons mesuré dans le milieu, après centrifugation des bactéries, les concentrations en glucose et en protéines et le pH, cela à trois temps:

1) A 0 heure au début de la culture.
2) A 36 heures, c'est-à-dire au début de la phase de latence induite et au cours de la latence vraie.

3) A 126 heures, c'est-à-dire à la fin de la latence induite et après la phase logarithmique, pendant la phase stationnaire.

Les résultats sont rassemblés sur la figure 7.

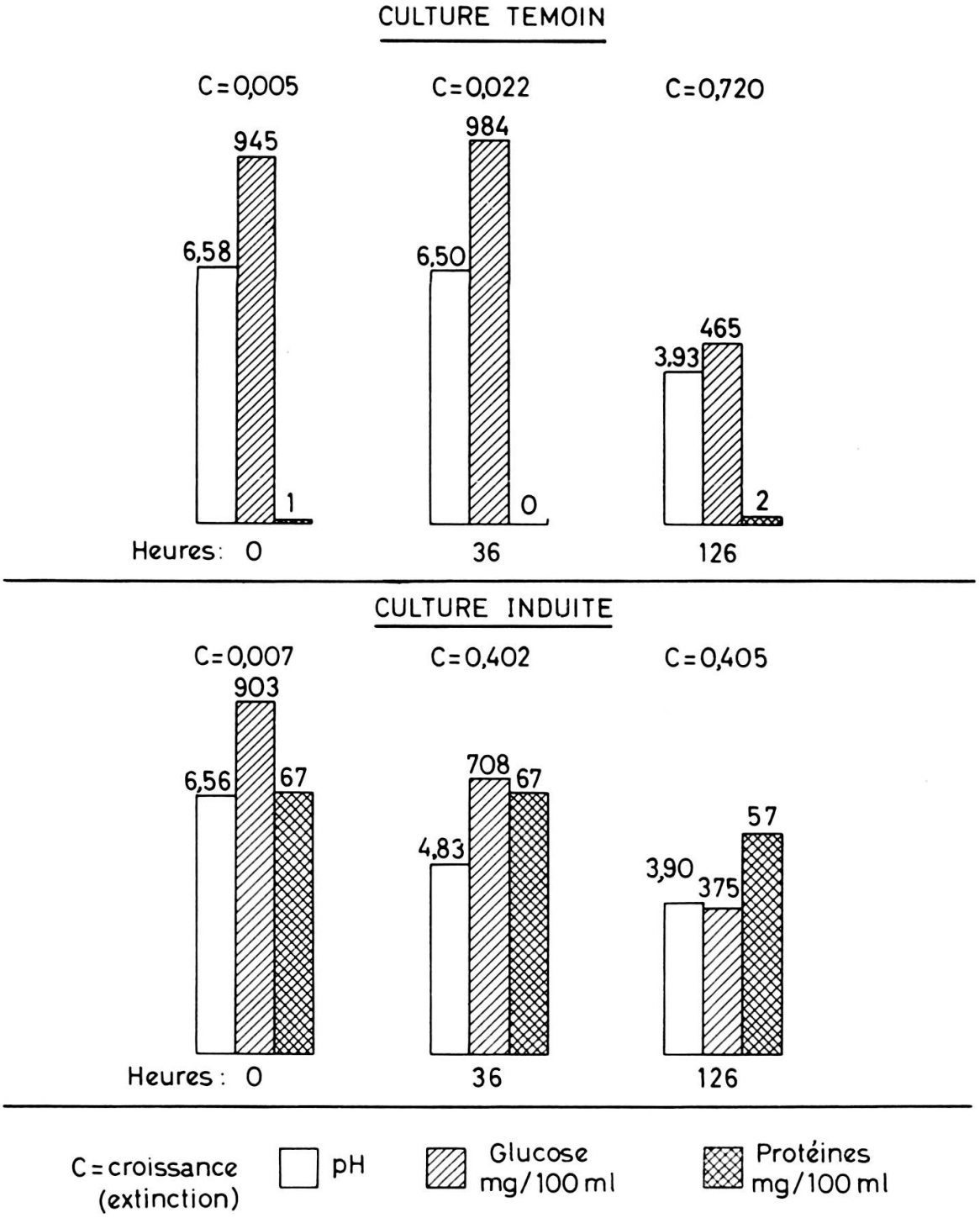

Fig. 7.

Mesures du pH, du glucose et des protéines du milieu à 0, 36 et 126 h. de croissance témoin ou induite par SDD.

On constate, pour la *culture témoin*, que le taux de glucose et le pH demeurent presque stationnaires pendant les phases de latence et tombent après la phase logarithmique. Cela est normal. Pour les *cultures induites*, le pH et la concentration de glucose tombent, dans une proportion moindre, mais déjà à la 36e h, ce qui correspond à une croissance partielle. Ensuite, pendant la latence induite, la bactérie, sans se multiplier, continue de prélever, sur le milieu, le glucose qui lui est nécessaire pour son métabolisme d'entretien, tandis qu'elle produit de l'acide lactique. Ces comportements physiologiques correspondent bien à ce que les courbes de croissance nous laissaient prévoir et illustrent l'épuisement du milieu, en phase de latence induite, épuisement peut-être partiellement responsable de l'incapacité qu'a la bactérie d'entreprendre une croissance logarithmique tardive.

En revanche, les proteines dosées d'après la méthode King-Sanz [46], ne diminuent pas au cours de la croissance induite. Celles-ci proviennent de l'inducteur et, selon notre hypothèse, elles sont le matériel inducteur. Si l'on admet, comme c'est parfois le cas, que les inducteurs peptidiques ou strépogéniques sont utilisés et consommés par la bactérie, qui s'en saisit comme d'aliments de choix, on ne comprend alors pas comment notre inducteur, de nature protéique, peut induire une croissance, de manière en quelque sorte gratuite, sans être utilisé par la bactérie. *L. casei*, évidemment, n'est pas protéolytique. Il faut admettre, dans ce cas, soit qu'une très petite portion de l'ensemble des protéines offertes est utilisée par la bactérie (portion qui ne serait pas détectée à l'analyse), soit que l'action de ces inducteurs protéiques de croissance est « gratuite » dans le sens que Monod [58] donne à ce terme lorsqu'il étudie la biosynthèse d'enzymes adaptatifs. Nous verrons plus loin que cette deuxième hypothèse semble se vérifier.

6. Courbes de croissance de subcultures inoculées a partir de cultures témoin et induite.

On sait, selon Chesney [5], et nous l'avons déjà mentionné, que l'allure d'une culture fille dépend de la phase de la culture mère, au cours de laquelle les bactéries de l'inoculum sont prélevées. Pour vérifier cela, nous avons effectuée deux cultures mères sur notre milieu d'essai, l'une témoin sans inducteur, et l'autre induite par 0,1 ml de SDD pour 5 ml de milieu. Ces cultures mères, diluées de manière à ce que leurs extinctions deviennent identiques, ont servi d'inoculum à deux moments de leur croissance.

Ces quatres cultures ont ensuite servi pour inoculer quatre groupes de cinq tubes contenant le milieu d'essai *sans inducteur SDD*; les croissances qui en ont résulté sont illustrées à la figure 8.

Pour la *culture témoin*, on constate que, si l'inoculum est issu de la phase logarithmique de la culture mère, courbes III, la croissance est presque immédiate, la

latence globale étant pour ainsi dire supprimée. Ceci correspond donc aux observations de Chesney [5]. Si l'inoculum est issu de la phase stationnaire de la culture mère, courbes IV, la latence est courte, ce qui correspond à une adaptation du germe

PRÉLÈVEMENTS D'INOCULA.

N°	Culture mère	Phase où l'inoculum est prélevé	Age de la culture mère au moment du prélèvem.	Extinction de la culture mère avant dilution
I	Culture induite	Ph. log. précoce	29 h.	0,360
II	Culture induite	Latence induite	167 h.	0,485
III	Culture témoin	Phase log.	119 h.	0,435
IV	Culture témoin	Phase stat.	167 h.	0,810

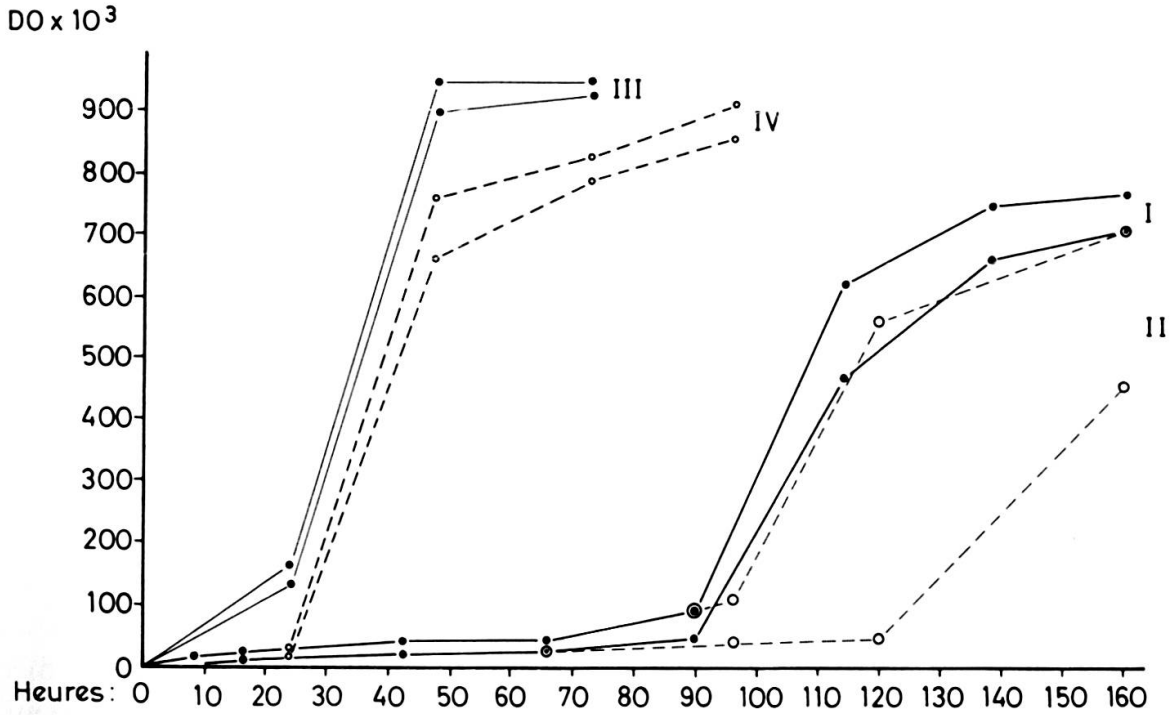

Fig. 8.

Courbes de croissance de 4 subcultures inoculées par des cultures témoins et induites prélevées dans différentes phases — Dispersion des résultats.

au nouveau milieu, adaptation qui s'est faite au cours de toute la croissance de la culture témoin mère.

Au contraire, pour la *culture induite*, que l'inoculum soit issu de la phase logarithmique précoce ou qu'il soit issu, en fin de culture, de la phase de latence induite, nous observons lors de la culture fille, en l'absence d'inducteur, de longues

phases de latence, comparables à celles du témoin dans la culture mère. Ceci signifie, d'une part, que lors de sa croissance rapide, la bactérie induite n'a pas acquis les dispositifs qui permettent à la bactérie non-induite de poursuivre sa croissance logarithmique sur une subculture. D'autre part, cela prouve que, même après 167 heures passées sur le milieu en phase de latence induite, cette bactérie, résultant d'une induction de croissance, ne s'est pas adaptée au milieu. Tout se passe donc comme si la bactérie induite adoptait des comportements aberrants, liés à la présence de l'inducteur de croissance, et reflétant un véritable infantilisme par rapport au milieu de Landy et Dicken [53].

On peut donc parler de deux types de croissance bactérienne se traduisant tous deux évidemment par la multiplication des cellules, mais caractérisés par:

1) Une adaptation préalable au milieu avec acquisition de systèmes métaboliques transmissibles lors d'une subculture.
2) Une croissance précoce liée à la présence et à la concentration d'un inducteur, probablement formateur de systèmes modifiés et non transmissibles ou non utilisables en l'absence de l'inducteur.

Cette description du phénomène est provisoire, nous y reviendrons au cours de notre discussion.

7. L'effet de l'inducteur est-il gratuit ?

L'expérience illustrée à la figure 7 montre que la bactérie n'utilise pratiquement pas les protéines sériques au cours de sa croissance en phase logarithmique précoce. Cette expérience ne suffit toutefois pas pour affirmer soit qu'une petite fraction de ces protéines a été utilisée et représente la véritable activité inductrice, soit que l'inducteur n'est pas consommé par la bactérie.

Pour trancher cette alternative, nous avons fait l'expérience suivante: une culture est préparée dans un ballon de 100 ml, en présence de 2 ml de SDD. Après 36 heures, la culture, stabilisée en latence induite, a atteint une turbidité $\Delta E = Ex\text{-}Et$, exprimée par l'extinction $\Delta E.10^3 = 374$, le contenu du milieu en protéines est de 62 mg/100 ml. L'extinction rapportée à 1 mg de protéines par 100 ml est donc de:

$$\text{Activité relative } 1^{er} \text{ emploi: } \Delta E.10^3/\text{mg Prot.} = 6{,}04$$

Cette culture est centrifugée pour en éliminer les bactéries; le milieu usé surnageant est dialysé contre plusieurs portions d'eau distillée pour en éliminer les constituants diffusibles. Le contenu du sac de dialyse, qui doit alors pratiquement ne plus contenir qu'une solution de macromolécules dans de l'eau distillée, est lyophilisé. Le résidu de lyophilisation est repris dans 100 ml du milieu de Landy et

Dicken [53]. Cette solution est stérilisée par filtration, puis inoculée. La deuxième culture se comporte alors comme si l'inducteur était frais: Δ E.10^3 = 146, concentration en protéines = 29 mg/100 ml.

Activité relative 2e emploi: Δ E.10^3/mg Prot. = 5,04

Cette expérience a été refaite avec une dose double i.e. 4 ml de SDD dans la culture primaire, et nous a donné les résultats suivants:

Inducteur	Protéines dans le milieu	Extinction Δ E.10^3	Activité relative Δ E.10^3/mg Prot.
1er emploi	100 mg/100 ml	661	6,61
2e emploi	47 mg/100 ml	169	3,60

Au cours de cet essai, nous avons, par ailleurs, vérifié que le milieu d'une culture non induite, cultivée jusqu'à la fin de sa phase logarithmique, ne contient aucun inducteur s'il est semblablement centrifugé, dialysé, lyophilisé et son résidu (presque inexistant d'ailleurs) redissout dans un milieu frais. La deuxième culture, en effet, se comporte comme une culture témoin.

Nous avons aussi voulu savoir où une perte d'inducteur (protéines sériques) s'est faite au cours de nos manipulations.

	Protéines en % de la dose initiale
Début culture I	100 %
Fin culture I	96,5 %
Après dialyse	78 %
Après lyophilisation et redissolution	47 %

Nous avons donc perdu, surtout au cours de la lyophilisation et de la dialyse, le 53 % des protéines sériques ajoutées à la première culture à titre d'inducteur.

Les protéines, toutefois, ajoutées pour un deuxième emploi à la deuxième culture, ont perdu dans le premier cas 16 %, et dans le deuxième cas 46 %, de leur activité relative.

Nous pensons qu'il ne faut pas, au stade actuel, tenter une interprétation quantitative rigoureuse du phénomène décrit. Il s'en dégage, en revanche, un fait essentiel: l'inducteur de croissance, ici les protéines sériques, peut être réutilisé. Son actvité est conservée en grande partie, bien que ses effets se soient manifestés entièrement sur une première culture. En d'autres termes, il semble bien que l'inducteur de croissance n'est pas « consommé » par *L. casei* et que son activité est de nature gratuite.

Ces expériences ne montrent pas que les 100 % de l'activité relative de l'inducteur de croissance sont conservés. Il est, toutefois, vraisemblable que la perte d'activité relative doive, elle aussi, être attribuée, pour une part, à la lyophilisation. Nous savons

que des fractions de protéines sériques ont été dénaturées et rendues insolubles au cours de celle-ci, mais la fraction qui s'est redissoute peut aussi avoir été plus ou moins dénaturée. La dialyse enfin contre de l'eau distillée provoque la précipitation des euglobulines. Nous montrerons d'ailleurs que l'inducteur de croissance est un produit assez sensible aux agents physiques et chimiques.

8. Effets d'agents physiques, chimiques et biochimiques sur SDD.

Nous avons déjà montré [43] que l'inducteur protéique, contenu dans un extrait placentaire et chauffé à 120° C, perd la totalité de son activité. Nous avons repris cet essai avec le SDD, et nous montrons à la figure 9 qu'en effet l'autoclavage à 120° C

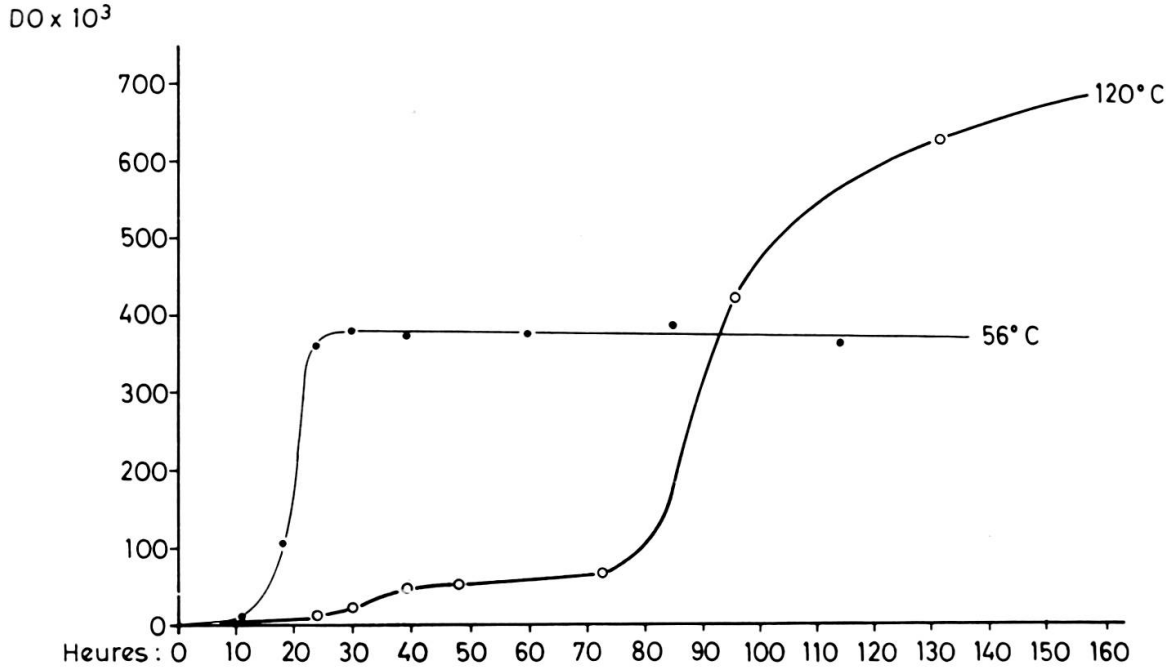

Fig. 9.
Effet de la chaleur à 56° et 120° C sur l'activité de l'inducteur SDD. 100µl de SDD chauffé pour 5 ml de milieu d'essai.

de SDD pendant 15 minutes annule totalement son activité. En revanche, on peut voir sur cette même figure qu'un passage de deux heures à 56° C ne modifie pas sensiblement l'activité de SDD.

Nous avons repris l'essai de la figure 9 en utilisant d'autres traitements susceptibles de modifier les protéines de SDD. L'arrangement expérimental des trois doses avec chacune trois tubes a été utilisé alors comme décrit à la page 275, et les traitements pratiqués sont décrits à la page 269. Les résultats sont groupés sur la figure 10.

Le parallélisme des droites, représentant chacune une préparation à trois doses, traduit la constance du rapport des activités de ces préparations aux différentes doses

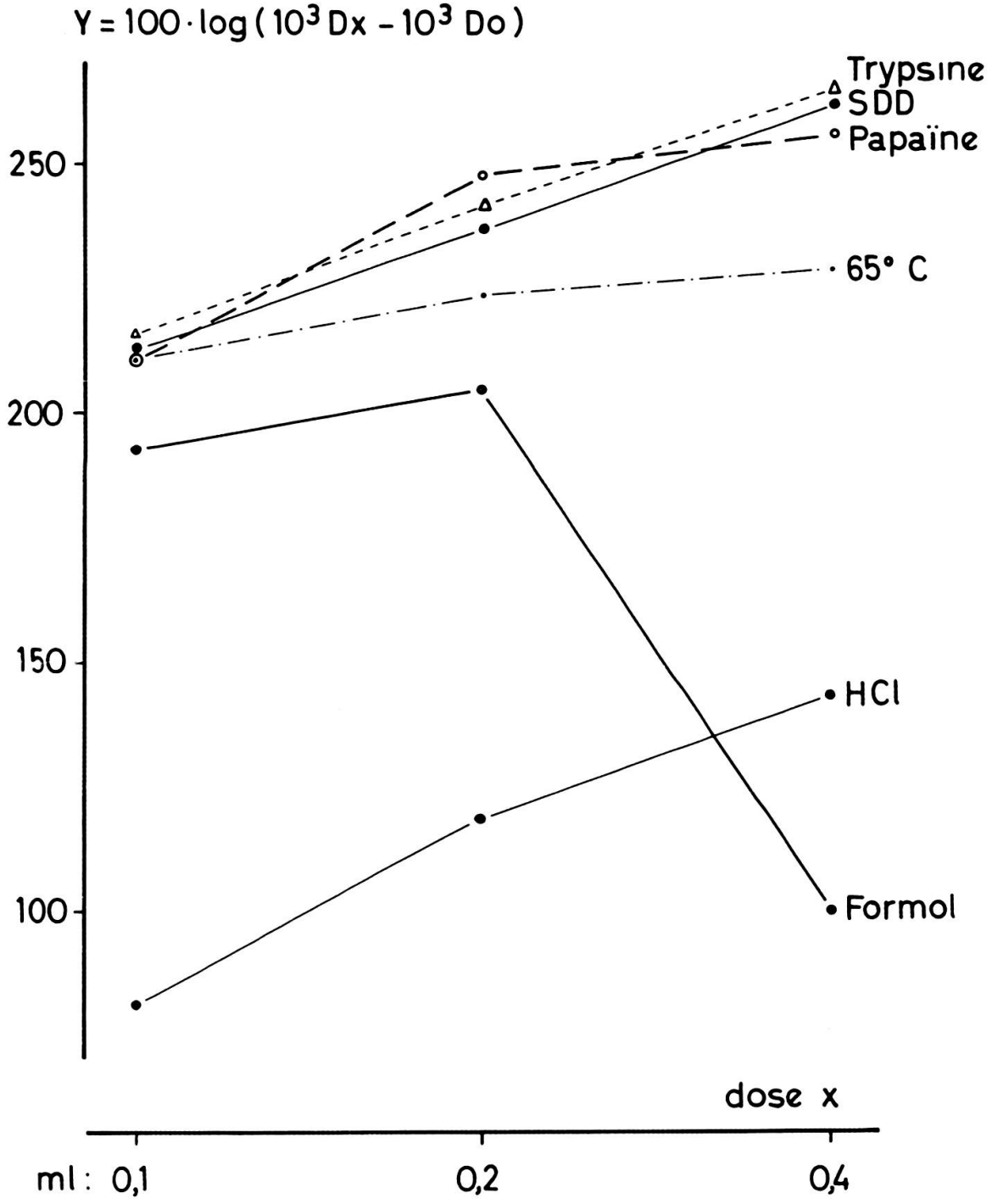

Fig. 10.
Effet de la chaleur, du formol,
d'enzymes protéolytiques et de l'hydrolyse chlorhydrique sur l'activité de
l'inducteur SDD à 3 doses.

utilisées. La constance de ce rapport autorise une comparaison valable entre ces préparations qui sont susceptibles de faire alors l'objet d'un examen statistique. Dans notre cas, il s'agit des préparations n° 1, 4, 5 et 6.

Pour les préparations 2 et 3, en revanche, l'absence de parallélisme entre leurs courbes d'activité et celle de SDD exclut la possibilité d'estimer cette activité par rapport à SDD.

Nos calculs n'ont donc porté que sur les préparations 1, 4, 5 et 6.

SDD modifiés	Activité R*	Activité relative R.100/g protéines	Inducteur Prot. g/l
1) SDD	1	11,6	8,6
2) Chauffage 1h. 65° C	pas de parallélisme		8,5
3) Traitement au formol à 65° C 1 h.	pas de parallélisme		6,8
4) Hydrolyse chlorhydrique	0,036	5,1	0,7
5) Protéolyse trypsine	1,08	12,7	8,5
6) Protéolyse papaïne	0,95	11,2	8,5

*) „R" (potency ratio) exprime l'activité de différentes solutions d'inducteurs à volumes utilisés égaux.

Déviation standard	s_c	= 6,4
Pente combinée	b_c	= 85,1
Indices de précision	λ	= 0,075
	L	= 13,3
Régression combinée	g_c	= 0,011
Pente	F_v	= 2,09
Courbure	F_v	= 1,08

Ces résultats sont suffisants pour valider l'expérimentation concernée. Les limites de confiance de l'activité relative des protéines des trois préparations sont:

Préparation	Activité relative Limites de confiance $P = 0{,}05$
1) SDD	11,6
4) Hydrolyse chlorhydrique	3,9— 7,3
5) Protéolyse trypsine	10,7— 15,2
6) Protéolyse papaïne	9,4— 13,2

Les extinctions à 280 nm de nos solutions déprotéinées (voir page 14) étaient: (temps d'hydrolyse et de protéolyse: 24 heures)

1) Extinction 280 nm = 0,037
2) » = 0,015
3) » = 0,005
4) » = 0,520
5) » = 0,046
6) » = 0,040

La répartition électrophorétique des protéines dans les différentes préparations était:

Préparations N°	1	2	3	4	5	6
Albumines	40,3 %	25,2	46,4	—	36,6	40,3
α^1 globulines	7,0	7,2	21,5	—	9,9	9,4
α^2 globulines	14,5	21,7	32,1	—	11,9	10,8
β globulines	13,4	22,7	—	—	14,8	12,5
γ globulines	24,8	23,2	—	—	26,8	27,0

Les résultats observés peuvent donc être résumés comme suit:

2) *Chauffage à 65° C, 1 heure.*

Le rapport albumine-globulines est diminué sans perte de protéines. Le parallélisme est mauvais, une perte d'activité est certaine, bien qu'il ne soit pas possible de la chiffrer.

3) *Chauffage et formolisation.*

Certaines globulines sont éliminées, il y a augmentation des fractions rapides à l'électrophorèse. Le parallélisme est mauvais. La perte d'activité est importante, et le produit est bactériostatique à forte dose.

4) *Hydrolyse chlorhydrique.*

N-total = 1,73 g/l. N-non précipité par ac. trichloracétique à 10 % W/V = 1,71 g/l. N-aminé = 1,39 g/l. L'hydrolyse est complète, ou presque, la préparation perd les 96 % de son activité.

5) *Hydrolyse trypsique.*

La trypsine a peu d'effet sur les protéines sériques, l'hydrolyse (extinction 280 nm) est négligeable, la distribution électrophorétique est peu modifiée. L'activité relative est légèrement augmentée.

6) *Hydrolyse papaïque.*

Idem 5.

L'inducteur de croissance sérique est donc déjà modifié à 65° C. Il est détruit par hydrolyse acide et dénaturé par le formol. La trypsine et la papaïne à 37° C n'ont pas d'effet sur lui.

Les résultats, concernant l'action enzymatique, doivent toutefois être regardés avec scepticisme; il faudrait, en effet, tenir compte des effets de l'inhibiteur sérique de la trypsine et de la papaïne.

9. Effet de diverses fractions des protéines sériques utilisées comme inducteurs de croissance.

Nous avons essayé à une seule dose l'activité de plusieurs préparations: figure 11.

	Conc. en protéines
Albumine de la Croix-Rouge	19,4 g/l
β transferrine Kabi	9,5 g/l
γ globuline Croix-Rouge	23 g/l
SDD: Précipité entre 0 et 0,75 de saturation en $SO_4(NH_4)_2$	25 g/l

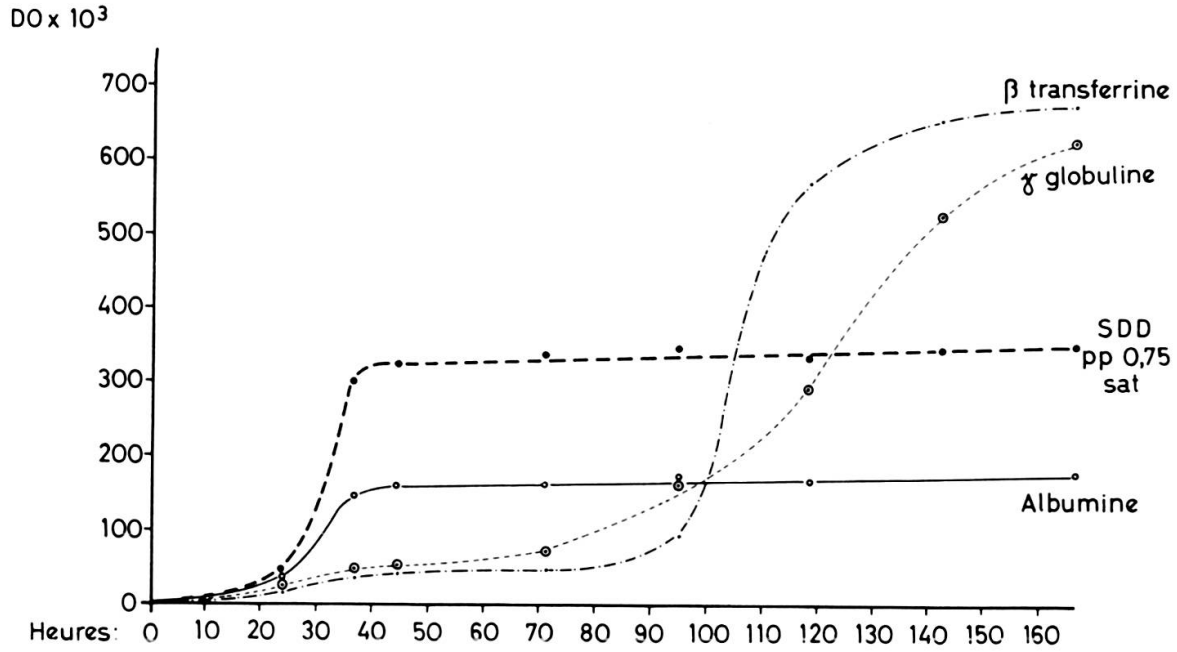

Fig. 11.
Effet de diverses fractions du sérum humain comparées à SDD sur la croissance de *L. casei*.

Ces diverses solutions ont été dialysées avant l'essai contre NaCl 9 g/l.

La figure 11 nous permet de constater que la fraction globale précipitée à 0,75 de saturation en sulfate d'ammonium et l'albumine (Cohn fraction) sont dotées d'activité. En revanche, la β transferrine et la γ globuline sont dénuées d'activité.

Nous avons repris et complété cet essai en utilisant les fractions énumérées ci-après à trois doses chacune, voir figure 12.

L'absence de parallélisme entre les fractions 1 et 5 nous oblige à éliminer de nos calculs la fraction n° 5. Nous n'avons pas non plus tenu compte de la première dose de la fraction n° 2; son activité, en effet, est si faible, à cette dose, qu'il n'est pas possible de l'apprécier.

Fractions	Activité R	Activité relative R.100/g prot.	Prot. g/l
1) SDD	1	10,1	9,9
2) SDD $(NH_4)_2$ SO_4 0 à 0,4 sat.	0,115	1,87	6,14
3) SDD $(NH_4)_2$ SO_4 0,4 à 0,75 sat.	0,461	11,1	4,16
4) Albumine	0,403	3,37	11,95
5) Globulines α	pas de parallélisme		5,08
6) Globulines β	0,112	2,26	4,95
7) Globulines γ	0,085	0,82	10,4
8) Fibrinogène	0,743	13,3	5,6

Déviation standard	s_c =	7,15
Pente combinée	b_c =	101
Indices de précision	λ =	0,07
	L =	14,1
Régression combinée	g_c =	0,006
Pente	F_v =	2,83
Courbure	F_v =	1,49

Ces résultats sont bons, sauf $F_v = 2{,}83$, qui ne devrait pas dépasser 2 pour nos 40 degrés de liberté. La figure 12 nous montre que cette variance trop forte de la pente provient sans doute de la dose 3 de la fraction n° 3. L'élimination toutefois de cette dose nous conduirait à une estimation peut-être trop élevée de cette fraction; nous avons donc préféré conserver cette valeur, quitte à renoncer à un schéma tout à fait formel. Les limites de confiance de l'activité relative des fractions étudiées sont:

Fractions	Activité relative Limites de confiance $P = 0{,}05$
1) SDD	10,1
2) SO_4 $(NH_4)_2$ 0,4 sat.	1,48– 2,38
3) SO_4 $(NH_4)_2$ 0,4 à 0,75 sat.	9,4 – 13,1
4) Albumine	2,85– 4,0
6) Globulines β	1,8 – 2,85
7) Globulines γ	0,63– 1,05
8) Fibrinogène	11,4 – 15,5

La répartition électrophorétique des protéines dans les diverses fractions était:

Préparations N°:	1	2	3	4	5	6	7	8
Albumines	40,3 %	—	74,2	77,2	—	—	—	56,1
α_1 globulines	7,0	—	—	6,1	20,2	—	—	—
α_2 globulines	14,5	—	—	9,1	41,2	—	—	—
β globulines	13,4	24,5	25,8	7,6	38,6	22,4	—	16,3
γ globulines	24,8	75,5	—	—	—	77,6	100	27,6

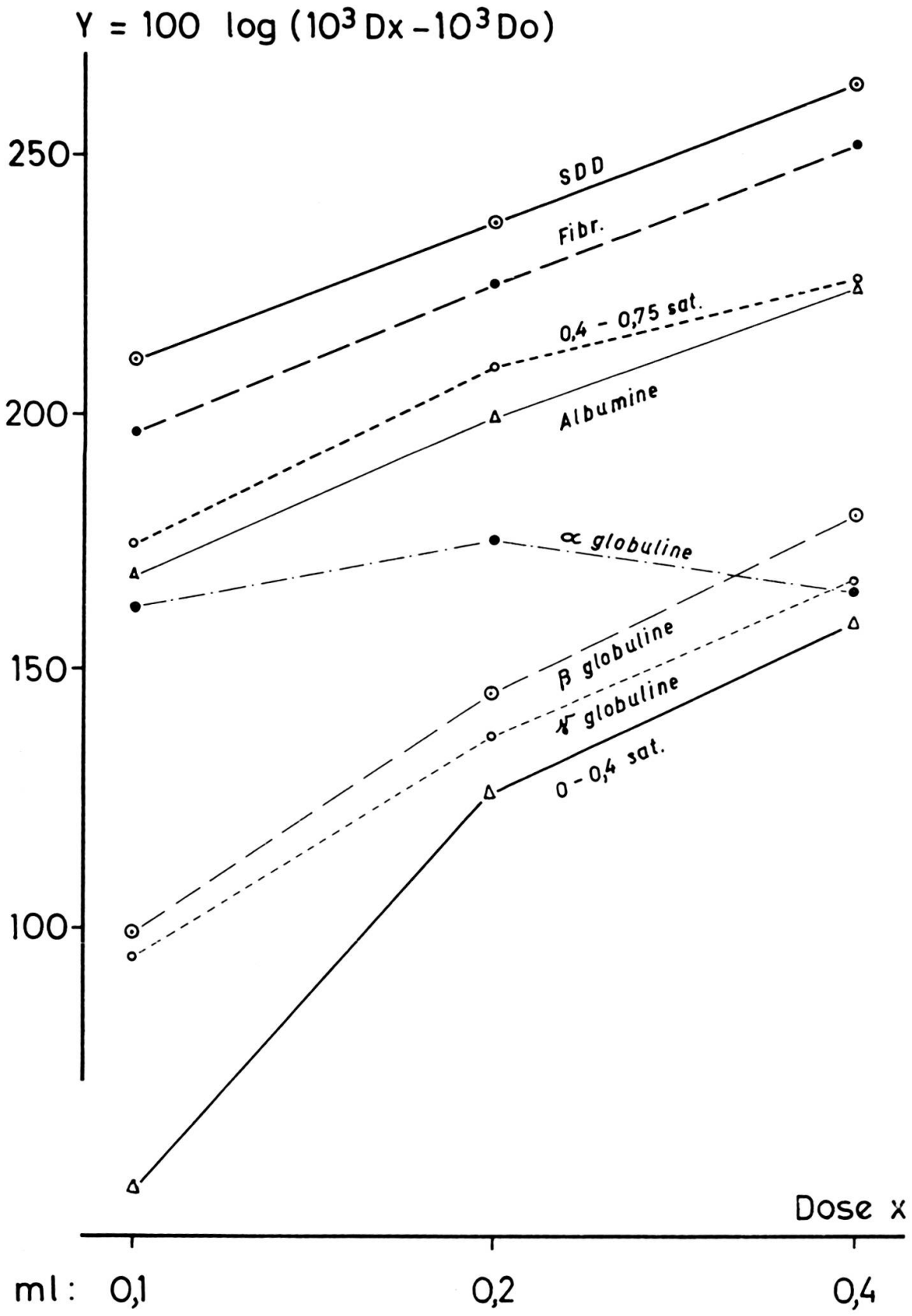

Fig. 12.

Effet de diverses fractions du sérum humain à 3 doses et de SDD sur la croissance de *L. casei*.

On ne peut établir aucune corrélation vraiment significative entre les différentes fractions électrophorétiques et l'activité relative que nous avons observée. Toutefois, il est frappant de constater que les fractions qui contiennent le plus d'albumine sont celles dont l'activité est élevée, et cela même pour la fraction 4 (albumine de la Croix-Rouge), dont on sait qu'elle est pasteurisée, tandis que les fractions 8 et 3 n'ont pas été chauffées. Réciproquement, il semble établi que la γ globuline n'a pratiquement aucune activité.

Pour terminer cet exposé et en complément, nous devons encore signaler un essai *), antérieur à cette thèse, où nous disposions de deux extraits placentaires concentrés par deux procédés différents. Les rapports de leurs protéines (électrophorèse en veine liquide) et de leurs activités étaient les suivants:

$$\text{Protéines totales } \frac{No\ 1}{No\ 2} = 1{,}67$$

$$\text{Albumine } \frac{No\ 1}{No\ 2} = 1{,}13$$

$$\alpha+\beta \text{ globulines } \frac{No\ 1}{No\ 2} = 2{,}10$$

$$\gamma \text{ globulines } \frac{No\ 1}{No\ 2} = 2{,}61$$

$$\text{Activités } \frac{No\ 1}{No\ 2} = 1{,}27$$

Cet essai, qui semble confirmer les observations que nous avons pu faire depuis sur le sérum humain, pourrait permettre de prévoir qu'une corrélation entre l'activité de l'inducteur de croissance et la concentration des albumines sériques existe vraiment. Pour vérifier cela, il nous serait nécessaire d'effectuer un fractionnement plus poussé, où plusieurs méthodes seraient mises en jeu successivement.

Tel n'était pas notre but immédiat. Nous avons surtout voulu étudier comment un inducteur de croissance sérique agissait sur une culture bactérienne, ce qui nous a permis de montrer que cet inducteur était très probablement gratuit, de nature protéique et représenté par certaines protéines seulement.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Nous résumons les observations de la partie expérimentale de ce travail en quelques points:

1) L'inducteur de croissance est contenu dans la fraction non dialysable du sérum sanguin humain. Il est sensible à la chaleur dès 60° C environ; il est détruit par hydrolyse chlorhydrique et partiellement inactivé par le formaldéhyde.

*) Essai effectué chez la firme Lucchini S.A., Genève

2) La résistance de l'inducteur à l'action de la trypsine peut être due à la présence de l'inhibiteur sérique de cet enzyme. Il est aussi probable que la papaïne n'ait pas d'effet sur lui pour la même cause *. Il n'est donc pas possible, pour le moment, de décider si les protéases ont ou n'ont pas d'effet sur l'inducteur.

3) L'inducteur est présent dans la fraction précipitée au sulfate d'ammonium entre 0,4 et 0,75 de saturation. On le retrouve dans les fractions albumine et fibrinogène (contenant 56 % d'albumine) préparées par fractionnement à l'alcool. Ces observations, et celles du point 1), indiquent avec un haut degré de certitude que l'inducteur de croissance est de nature protéique; nous concluons donc qu'il s'agit d'une ou de plusieurs protéines contenues dans le sérum sanguin. L'inducteur n'est pas contenu dans les γ-globulines. En revanche, il est contenu pour la plus grande partie dans la fraction albumine.

4) Son action consiste essentiellement en ce qu'il déclenche la croissance d'une culture de *L. casei*, souche de Lausanne, dès que cette culture a dépassé sa prophase de latence. Le niveau final de la croissance est ensuite une fonction linéaire de la concentration de l'inducteur dans le milieu, dans les limites indiquées, et ceci quels que soient la dimension de l'inoculum ou le moment, en cours de latence vraie, où l'induction est effectuée.

5) L'inducteur agit d'une manière gratuite, au sens donné par Monod [58] à ce qualificatif, c'est-à-dire qu'il provoque une croissance accélérée sans participer à celle-ci en tant que substrat. Bien que conditionnant tant le moment du déclenchement de la croissance que le niveau final de croissance atteint par la culture, il est retrouvé en grande partie intact dans le milieu en fin de croissance; il a pu être réutilisé.

6) La croissance qui résulte de la présence de l'inducteur est l'expression d'un métabolisme cellulaire encore inadapté au milieu de culture. En effet, les cellules qui résultent de cette croissance n'ont pas encore acquis les systèmes métaboliques adaptés à une croissance autonome; leur faculté de se multiplier est liée à l'ajout de l'inducteur. Nous pensons qu'il n'est pas exclu que, à défaut des dits systèmes adaptatifs, d'autres systèmes aient résulté de l'action de l'inducteur de croissance. Dans cette perspective, le mode d'action de l'inducteur de croissance sérique serait de promouvoir la formation rapide de systèmes métaboliques générateurs de croissance et de multiplication. Dans quelle mesure ces systèmes sont-ils différents des systèmes que la bactérie acquière normalement plus tard? Il est encore impossible de le dire.

* Grob [59, 60, 61] a montré que le ou les inhibiteurs sériques, antiprotéinases, sont liés aux fractions IV-1 et IV-4 des protéines plasmatiques et que, si leur pouvoir d'inhibition est plus grand en ce qui concerne la trypsine, il n'est pas négligeable en ce qui concerne la papaïne.

Avant de poursuivre cette discussion, nous voulons présenter deux remarques qui sont en quelque sorte en marge de ce travail. La première concerne le pouvoir inhibiteur exercé par le sérum humain, à faible concentration, sur la croissance de la bactérie. En effet, il est possible, en dessous de 12 μl de SDD par 5 ml de milieu (voir fig. 2), d'observer un pouvoir bactériostatique du sérum sur *L. casei*, pouvoir qui est proportionnel à la concentration du sérum. Le pouvoir bactériostatique du sérum est bien connu pour de nombreuses bactéries; récemment, Waisbren et Brown [62] l'on décrit pour *E. coli*. Dans le cas qui nous occupe toutefois, et au-dessus de doses d'environ 12 μl, la situation est renversée, le sérum devenant un facteur franchement probiotique. Ce paradoxe n'est pas facile à expliquer dans l'état actuel de nos connaissances. Si l'on suppose que l'effet bactériostatique et l'effet d'induction dérivent du même principe, il y aurait lieu — pure hypothèse — d'envisager l'inversion d'effet à partir d'une concentration critique. Nous ne savons pas si cette inversion se reproduirait avec d'autres bactéries ou d'autres souches de *L. casei*, mais nous pensons qu'il n'est pas inutile d'attirer l'attention sur elle et de souligner que le pouvoir bactériostatique du sérum à faibles doses peut ne pas se vérifier à fortes doses.

La deuxième remarque concerne les effets du sérum sanguin sur les cultures de cellules ou de tissus. On sait qu'une certaine quantité de sérum est nécessaire, dans la plupart des cas, pour obtenir la croissance des cultures de tissus. En 1957, Shiman Chang et Geyer [63] ont montré que, pour la croissance de cellules épithéliales, le sérum sanguin pouvait être remplacé par une solution contenant une fraction non précipitée par SO_4Na_2 à 22 g/100 ml de sérum, à 37° C. Cette fraction se rapproche évidemment de notre fraction précipitée entre 0,4 et 0,75 de saturation en $SO_4(NH_4)_2$. Une parenté entre notre inducteur de croissance bactérienne et les fractions sériques nécessaires à la croissance cellulaire semble donc exister.

Nous appuyant sur les six points énumérés au début de la présente discussion, nous voulons tenter d'examiner si des réponses peuvent être partiellement données aux questions qui suivent et qui sont apparentées à celles que nous formulions dans l'introduction de ce travail.

Y A-T-IL UNE SIMILITUDE ENTRE L'INDUCTEUR DE CROISSANCE SÉRIQUE ET LES STRÉPOGÉNINES?

Dans les deux cas, il s'agit d'inducteurs de croissance. Nous pensons toutefois qu'il existe une différence de nature et de mode d'action entre les strépogénines et SDD.

En effet, les strépogénines sont caractérisées par des chaînes peptidiques relativement courtes si on les compare aux protéines de SDD. Ces peptides sont souvent dialysables et généralement thermostables, tandis que SDD n'est ni l'un ni l'autre.

En revanche, les informations dont nous disposons concernant l'hydrolyse ménagée de SDD sont insuffisantes pour affirmer que celle-ci ne conduirait pas à la formation de strépogénines actives. Nous pensons toutefois que, même si cela devait être le cas, il faudrait faire une distinction entre les strépogénines peptidiques d'une part, et l'inducteur sérique d'autre part, cela moins sur la base de leur nature ou de leur provenance que sur la base de leur mode d'action.

Probst [64], en étudiant l'effet de l'extrait placentaire décrit par Zender et Borth [43], a observé, au cours d'expériences préliminaires, que *L. casei* ATCC 7469 est sensible à la fraction dialysable, tandis que *L. casei* de Lausanne est au contraire sensible à la fraction non dialysable de cet extrait. Ces expériences, si elles se vérifiaient, seraient importantes pour distinguer deux inducteurs de croissance. Quoi qu'il en soit, la distinction essentielle qu'il faut faire entre les strépogénines et SDD semble bien être que celles-là pénétreraient dans la bactérie et seraient consommées par elle pour sa croissance, tandis que celui-ci ne pénètre pas dans la bactérie et n'est pas consommé. En effet, il n'est pas douteux que les peptides sont utilisés par les cellules en général. Outre les travaux mentionnés plus haut [34, 35, 36, 37, 38], il faut citer à ce sujet Schechtman [65], qui a démontré que mêmes des protéines intactes pouvaient être transférées à travers la paroi cellulaire et incorporées à des cellules embryonnaires. Il est vrai que la cellule embryonnaire est plus « perméable » que l'adulte; mais que savons-nous des variations de perméabilité qui peuvent se produire dans la membrane et dans la paroi de la cellule bactérienne au cours de sa latence? Par ailleurs, et malgré l'impressionnant nombre de démonstrations qui veulent que la synthèse protéique se fasse directement à partir d'acides aminés libres, il n'est pas exclu que certains peptides jouent le rôle d'intermédiaire dans cette synthèse [42], ou peut-être dans certaines synthèses protéiques seulement. Ce sont ces raisons qui nous font incliner vers une interprétation assimilant la strépogénine à un substrat préférentiel de la croissance et de la synthèse protéique bactériennes. Cette interprétation ne peut toutefois être considérée comme univoque, et il n'est pas exclu non plus que certaines macromolécules, classées comme strépogénines, agissent au contraire comme des inducteurs gratuits. Cela pourrait être le cas, par exemple, avec les hauts peptides isolés par Gonin [23] ou encore avec les facteurs non dialysables de Woolley [10].

L'inducteur de croissance sérique, en revanche, ne pénètre pas, dans sa totalité du moins, dans la cellule bactérienne, et son influence sur le métabolisme endocellulaire s'exerce vraisemblablement à la surface de la bactérie. Nous avons apporté deux preuves de cette action gratuite; la première était que les protéines sériques ajoutées au milieu ne sont pas consommées par la bactérie en cours de croissance; la deuxième, plus déterminante, est que l'inducteur, après avoir provoqué une croissance dans une première culture, peut être réutilisé et a conservé une activité relative, sinon totale, du moins très importante.

Nous pensons donc que s'il existe une parenté entre les strépogénines peptidiques et l'inducteur que nous avons décrit, celle-ci demeure énigmatique. Les

modes d'action de ces deux types d'inducteurs semblent fort différents, bien que convergents dans leurs effets.

EXISTE-T-IL UNE PARENTÉ ENTRE L'INDUCTEUR DE CROISSANCE SÉRIQUE ET LES INDUCTEURS DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE ?

Nous ne tenterons pas ici de décrire le phénomène de la synthèse induite des enzymes, nommée aussi formation d'enzymes adaptatifs. Les deux enzymes les mieux étudiés dans ce domaine sont la pénicillinase et la β-galactosidase, dont la biosynthèse, dans des souches bactériennes « inductibles », est induite respectivement par la pénicilline et le galactose. Nous renvoyons le lecteur aux revues de Sevag [66] 1946, Stanier [67] 1951, Monod et Cohn [58] 1952, Pollock [68] 1959, Halvorson [69] 1960, Pardee [70] 1961 et d'autres. Toutefois, certains aspects de la formation induite d'enzymes doivent retenir notre attention.

Rickenberg et coll. [71], étudiant la biosynthèse de la β-galactosidase induite par un inducteur « gratuit », ont mis en évidence l'induction simultanée d'un système « galactosido-perméase » nécessaire pour le transfert de l'inducteur sur le site intracellulaire de son action. Cette observation est intéressante dans ce sens qu'elle implique une action de l'inducteur en question sur la cellule bactérienne, précédant le transfert de l'inducteur à l'intérieur de la cellule. Le système « galactosido-perméase » doit en effet, à priori, être induit par le galactoside avant sa pénétration dans la bactérie.

Stanier [67 bis] montre chez *Pseudomonas fluorescens* que l'acide mandélique, fonctionnant comme inducteur, provoque la biosynthèse induite de sept enzymes, nécessaires à l'oxydation de l'acide mandélique en acide β-cétoadipique. Il s'agit donc ici d'une induction en chaîne où chaque métabolite intermédiaire fonctionne comme inducteur de la synthèse de l'enzyme immédiatement nécessaire dans la chaîne. Dans cette perspective, il n'est pas impossible de penser que toute synthèse enzymatique requière la présence d'un inducteur présent dans le suc cellulaire. En revanche, l'existence de souches « constitutives » contenant la pénicillinase, par exemple, affaiblit cette dernière hypothèse, du moins dans la forme qui lui est donnée ici. Ce qui nous intéresse, toutefois, c'est que la présence d'un seul inducteur enzymatique est suffisante pour déclencher la biosynthèse dans la bactérie d'une série de protéines, c'est-à-dire d'enzymes différents.

Pollock [72], Pollock et Perret [73] ont montré, en 1950 et 1951, qu'un contact transitoire entre l'inducteur, la pénicilline et la bactérie, *B.cereus*, était suffisant pour induire la bactérie à continuer la production de l'enzyme en l'absence de l'inducteur. C'est ce que l'on nomme depuis l'effet Pollock, qui montre le mieux la gratuité de l'action de l'inducteur. Dans ce cas, il n'y a, en effet, pas de relation entre la quantité d'inducteur, environ 200 molécules de pénicilline sont fixées par bactérie, et la quantité d'enzyme synthétisé. Si nous exprimions ceci autrement,

nous dirions que l'inducteur pénicilline détermine une synthèse enzymatique sans participer plastiquement à celle-ci.

Kramer et Straub [74, 75] ont préparé un *B. cereus* induit par la pénicilline. Ces germes, devenus dès lors riches en pénicillinase, ont été extraits dans un milieu salin à 100° C. Cet extrait s'est révélé capable d'induire, en l'absence de la pénicilline, la biosynthèse de pénicillinase chez la même souche de *B. cereus* inductible. Par ailleurs, l'extrait perd son activité lorsqu'il est traité par la RNA-ase. Ce dernier fait tend à prouver que les RNA, issus de l'induction, extraits par la solution saline, lysables par la RNA-ase, constituent les médiateurs de la biosynthèse de la pénicillinase induite et que, par conséquent, l'effet de l'inducteur sur la bactérie serait de promouvoir la formation de RNA nouveaux. C'est l'effet Kramer où l'inducteur est constitué par les polynucléotides issus du RNA induit.

Pour revenir au problème de la gratuité de l'induction, gratuité sur laquelle insistent Monod et Cohn [58], il faut toutefois signaler que celle-ci est très souvent difficile à mettre en évidence. La pénicilline et le galactose, par exemple, ne sont pas considérés comme des inducteurs gratuits; tandis que le phényl-β-D-thio-galactoside entre dans cette catégorie. Cette distinction toutefois trahit la réalité. Rappelons ici que l'inducteur enzymatique joue un double rôle: susciter la formation d'une protéine enzyme nouvelle et servir de substrat à cet enzyme. Un certain nombre de molécules n'assurent cependant que l'une de ces deux fonctions, la protéosynthèse: ce sont les inducteurs gratuits *sensu stricto*. Néanmoins, ces inducteurs gratuits sont, pour la plupart, encore capables de se combiner à l'enzyme induit en tant qu'inhibiteurs compétitifs. C'est pourquoi Pollock [68] estime: « it cannot therefore be rigorously maintained... that combination (of the inducer) with the enzyme is not a necessary prerequisite for the manifcstation of inducing activity».

Loin de nous l'idée, dans l'état actuel de nos travaux, de vouloir établir une similitude trop audacieuse entre les inducteurs de la biosynthèse d'enzymes d'une part, et l'inducteur de croissance sérique d'autre part. Leur nature, tout d'abord, est fort différente; nous avons dans le premier cas des substrats ou des substances chimiquement apparentées à ces substrats, dans le second cas l'inducteur est une ou plusieurs protéines qui n'ont aucun rapport connu avec les systèmes métaboliques dont ils vont promouvoir la formation précoce dans la bactérie. Néanmoins, quelques liens semblent exister entre ces deux types d'induction. Le premier et le plus évident c'est que leur action résulte dans les deux cas en la formation accélérée de protéines et des systèmes métaboliques qui conduisent à cette formation. L'inducteur d'enzymes déclenche la formation d'un ou de plusieurs systèmes spécifiques qui, sans que la bactérie se multiplie forcément, donnent naissance à des protéines nouvelles. L'inducteur de croissance, au contraire, promeut la biosynthèse en général de systèmes protéino-formateurs; une multiplication cellulaire en résulte.

Cet effet non spécifique sur la biosynthèse protéique ne signifie toutefois pas obligatoirement qu'il y a identité entre les systèmes, résultant de l'induction, et ceux

qui apparaissent, en temps voulu, dans une culture témoin. Nous avons, en effet, observé que le degré d'adaptation au milieu était fort différent selon qu'une culture était ou n'était pas induite. Cette différence de comportement adaptatif doit correspondre, à un niveau quelconque du métabolisme cellulaire, à des systèmes biosynthétiques distincts. Il n'est pas exclu, par conséquent, que l'inducteur sérique conditionne l'apparition dans la cellule de structures métaboliques originales, qui peuvent être génétiquement potentielles dans la bactérie non induite. Dans cette perspective, une similitude entre les deux types d'inducteurs, enzymatique et sérique, serait évidente, puisque dans les deux cas il y aurait apparition de systèmes protéinoformateurs originaux.

Une autre similitude est la « gratuité » que l'on peut rencontrer dans les deux types d'induction. En effet, il semble très probable que l'inducteur d'enzyme agisse gratuitement, provoquant une synthèse protéique que la bactérie n'effectuait pas, mais qu'elle gardait comme une réserve potentielle. La gratuité de l'action de l'inducteur sérique est également très probable d'après nos expériences. L'existence simultanée de cette gratuité et de la relation linéaire qui existe entre la dose d'inducteur et l'effet observé parle en faveur d'un processus de nature catalytique.

Plusieurs auteurs, dont Pollock [68], ont souligné que les mécanismes présidant d'une part à l'induction enzymatique, et d'autre part à la formation d'anticorps, devraient pouvoir être apparentés. Nous ne voulons pas quitter ce sujet sans avoir évoqué cet aspect, surtout si nous songeons que l'inducteur de croissance est une protéine, dont l'effet consiste à déclencher la biosynthèse d'autres protéines dans des cellules bactériennes qui lui sont hétérologues au sens immunologique du terme.

Quelles indications avons-nous concernant le mode d'action de l'inducteur de croissance sérique?

L'hypothèse la plus vraisemblable, pour répondre à cette question, serait que l'inducteur de croissance sérique accélère ou promeut la formation dans la bactérie de systèmes protéinoformateurs, c'est-à-dire qu'il agit sur la biosynthèse du RNA et des protéines bactériens. Nous nous référons dans ce domaine aux revues de Herrmann [76], Novelli [77], Harris [78], Chantrenne [79] et surtout à celle de Gale [80], parue en 1962.

Malmgren et Heden [81] ont montré, par microphotographie, à 258 nm, que le contenu de la cellule bactérienne en acides nucléiques varie entre le début et la fin de la période de latence. Il est plus élevé, en effet, en fin de latence, et, à ce moment, la RNA-ase est capable de lyser ces acides nucléiques, la DNA-ase ne l'est pas. Caldwell et Hinshelwood [82] ont, en outre, montré qu'il existe une corrélation entre le contenu de la cellule en RNA et sa rapidité de multiplication; le DNA, lui, demeure

constant. Ces observations ont été confirmées. en particulier, par Kjeldgaard, Maaløe et Schaechter [83, 84]; elles tendent à nous faire comprendre le rôle de l'inducteur de croissance comme celui d'une substance capable d'accélérer la formation de l'un ou l'autre, ou de l'ensemble, des agents responsables de la synthèse protéique. En effet, si un taux critique de RNA est nécessaire pour que la phase logarithmique de croissance puisse démarrer, il faut penser que l'inducteur permet à la bactérie d'atteindre plus rapidement ce taux.

Reprenant et formulant ici une hypothèse de travail que nous avons élaborée au long de cet exposé, nous pouvons alors suggérer l'interprétation suivante: les expériences qui précèdent ont montré que la bactérie, mise en présence de l'inducteur sérique, révèle un métabolisme de croissance vif, mais inadapté; nous pensons que cette déficience du germe induit traduit chez lui une synthèse modifiée ou incomplète du RNA. L'effet de l'inducteur serait, par conséquent, de déterminer la formation brusque de certains acides ribonucléiques suffisants pour permettre une croissance induite, mais insuffisants, en qualité ou en nombre, pour déterminer une croissance autonome, c'est-à-dire en l'absence de l'inducteur.

Les premières études concernant les sites bactériens de la biosynthèse protéique tendaient à localiser ceux-ci au niveau de la membrane bactérienne. En revanche, il était déjà connu que cette biosynthèse s'effectuait surtout au niveau des microsomes dans toutes les autres cellules examinées. Depuis, les méthodes de fractionnement s'étant améliorées, il a été possible de prouver que la cellule bactérienne ne se distingue pas des autres cellules, et que les microsomes y sont bien le site par excellence de cette biosynthèse. Leur proximité de la membrane, due aux traitements, était responsable de ces premières interprétations, conférant à cet appareil un rôle particulier qui ne lui est généralement plus reconnu.

Toutefois, Mc Quillen [85] a montré, en 1959, que l'addition à une suspension de ribosomes de matériaux provenant de la membrane augmente la captation d'acides aminés. Beljanski [86] a montré que des fragments de paroi et de membrane d'*Alcaligenes faecalis* incorporent tous les acides aminés naturels et que cette incorporation est stimulée par une fraction thermolabile du suc cellulaire. Spiegelmann [87] et Nisman [88] retrouvent dans la membrane de *E. coli* les facteurs nécessaires à cette incorporation. Wachsmann [89], en 1960, a préparé une fraction de la membrane de *B. megaterium*, contenant 17% des protéines, 12% du RNA et 32% du DNA de la cellule bactérienne, fraction dont le pouvoir d'incorporation d'acides aminés est plus élevé que celui de toutes les autres fractions bactériennes. Il semble donc bien que le rôle des structures de surface de la bactérie dans la synthèse protéique ne puisse être minimisé, soit que ces structures, associées ou non à des ribosomes, puissent synthétiser des protéines du suc cellulaire, soit qu'elles fabriquent les polypetides et les protéines spécifiques de la membrane, soit encore qu'elles contiennent des activateurs de la synthèse protéique endocellulaire. N'oublions pas non plus le rôle qu'elles jouent forcément par le truchement des perméases.

Si l'inducteur de croissance sérique, comme nous l'avons rendu probable, ne pénètre pas dans la cellule bactérienne, il faut penser que son action a lieu au niveau de la paroi ou de la membrane cellulaire.

Résumé

L'auteur a étudié la croissance de *L. casei* (souche de Lausanne) en la présence et en l'absence de sérum humain dialysé ou de solutions de protéines sériques diverses. Il a montré:

1. Qu'en l'absence de l'inducteur de croissance sérique la latence de la croissance bactérienne se divisait en deux phases nommées ici prophase de latence et latence vraie.
2. Que la présence de sérum dialysé dans le milieu détermine une croissance rapide qui démarre dès que la prophase de latence est terminée.
3. Que le degré de croissance est proportionnel à la concentration du sérum contenu dans le milieu quelle que soit la dimension de l'inoculum et quel que soit le moment, en cours de latence vraie, où l'inducteur est ajouté au milieu.
4. Que l'inducteur n'est vraisemblablement pas utilisé par la bactérie pour sa croissance et qu'il s'agirait donc d'une induction « gratuite ».
5. Que la croissance induite de la bactérie se fait sans que celle-ci soit déjà adaptée au milieu. Par conséquent, il faut penser que le métabolisme adaptatif nécessaire à la croissance induite d'une bactérie diffère de celui d'une bactérie témoin.
6. Que l'inducteur est une ou plusieurs protéines.
7. Que l'inducteur est contenu, pour une part importante, dans la fraction albumine et qu'il est absent de la fraction γ-globuline du sérum humain.

Les phénomènes décrits sont discutés, et il est conclu provisoirement: que l'inducteur de croissance décrit diffère sensiblement des strépogénines quant à son mode d'action et à sa nature; qu'il peut être apparenté aux inducteurs de la synthèse d'enzymes adaptatifs par son mode d'action; que son action porte vraisemblablement sur l'un ou l'autre des agents de la synthèse protéique, et ceci au niveau de la membrane ou de la paroi cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERTALANFFI, L. VON, ds *Fund. aspects of normal and malignant growth* (W. W. Nowinski ed.), (1960).
2. HINSHELWOOD, C. N., ds *The chem. kinetics of the bact. cell*, (Clarendon Press), (1946).
3. RAHN, O., *Zentr. Bakt. Parasitenk.*, Abt. II *16*, 417, (1906).
4. BARBER, M. A., *J. Infectious diseases*, *5*, 379, (1908).
5. CHESNEY, A. M., *J. exptl. med.*, *24*, 387, (1916).
6. CLARK, P. F. *et* RUEHL, W. H., *J. bact.*, *4*, 615, (1919).
7. SHERMAN, J. M. et ALBUS, W. R., *J. bact.*, *8*, 127, (1923).
8. HENRICI, A. T., ds *Morphologic variation and the rate of growth of bacteria*, (Chas. C. Thomas), (1928).
9. HEGARTY, C. P., *J. bact.*, *37*, 145, (1939).
10. WOOLLEY, D. W., *J. exptl. med.*, *73*, 487, (1941).
11. GROSSOWICZ, N., *Proc. soc. exptl. biol. med.*, *49*, 8, (1942).
12. SPRINCE, H. et WOOLLEY, D. W., *J. exptl. med.*, *80*, 213, (1944).
13. *idem 12)*.
14. SPRINCE, H. et WOOLLEY, D. W., *J. am. chem. soc.*, *67*, 1734, (1945).
15. WOOLLEY, D. W., *J. biol. chem.*, *171*, 443, (1947).
16. WOOLLEY, D. W., *Suppl. bull. soc. chim. biol.*, *11-12*, 101, (1948).

17. WOOLLEY, D. W., *J. biol. chem.*, *172*, 71, (1948).
18. Mistry, S. P. et KODICEK, E., *Biochem. J.*, *49*, XVIII, (1951).
19. BORSOOK, H. et coll., *J. biol. chem.*, *179*, 705, (1949).
20. KARRER, W. et PFALTZ, H., *Helv. chim. acta*, *34*, 273, (1951).
21. KODICEK, E. et MISTRY, S. P., *Biochem.* J., *51*, 108, (1952).
22. TRITSCH, G. L. et WOOLLEY, D. W., *J. am. chem. soc.*, *80*, 1491, (1958).
23. GONIN, J., *Thèse n° 1290*, Genève, (1958).
24. BAUDET, P. et CHERBULIEZ, E., *Helv. chim. acta*, *43*, 904, (1960).
25. BAUDET, P. et CHERBULIEZ, E., *Helv. chim. acta*, *43*, 1795, (1960).
26. MERRIFIELD, R. B. et WOOLLEY, D. W., *J. am. chem. soc.*, *78*, 358, (1956).
27. MIKES, O., SCHUH, V. et SORM, F., *Czechoslov. chem. commun.*, *24*, 583, (1959)
28. MIKES, O. et SORM, F., *Czechoslov. chem. commun.*, *24*, 1525, (1959).
29. MIKES, O. et SORM, F., *Czechoslov. chem. commun.*, *24*, 1897, (1959).
30. MIKES, O. et coll., *Czechoslov. chem. commun.*, *25*, 1938, (1960).
31. MIKES, O. et coll., *Czechoslov. chem. commun.*, *25*, 1946, (1960).
32. BAUDET, P. et CHERBULIEZ, E., *Actes soc. helv. sci. nat.*, 229, (1959).
33. BAUDET, P. et CHERBULIEZ, E., *Helv. chim. acta*, *44*, 1142, (1961).
34. LEACH, F. R. et SNELL, E. E., *Biochim. biophys. acta*, *34*, 292, (1959).
35. KIHARA, H. et SNELL, E. E., *J. biol. chem.*, *235*, 1409, (1960).
36. LEACH, F. R. et SNELL, E. E., *J. biol. chem.*, *235*, 3523, (1960).
37. KIHARA, H., IKAWA, M. et SNELL, E. E., *J. biol. chem.*, *236*, 172, (1961).
38. GOUDA, S. et CHODAT, F., *VIes Journées biochim. latines*, 35, (1961).
39. TURBA, F. et ESSER, H., *Biochem. Zeitsch.*, *327*, 93, (1955).
40. TURBA, F. et coll., *Biochem. Zeitsch.*, *327*, 410, (1955).
41. TURBA, F., LEISMANN, A. et KEINBENZ, G., *Biochem. Zeitsch.*, *329*, 97, (1957).
42. MCMANUS, I. R., *J. biol. chem.*, *231*, 777, (1958).
43. ZENDER, R. et BORTH, R., *Helv. physiol. pharmacol. acta*, *20*, 83, (1962).
44. POLLOCK, M. R., *The enzymes*, *1*, 679, (Acad. press), (1959).
45. GRASSMAN et HANNIG, *Dtsch. med. Wschr.*, *76*, 333, (1951).
46. SANZ, M. C., *communication personnelle*, (1959).
47. DUBOWSKI, K. M., *Clin. chem.*, *8*, 215, (1962).
48. ZENDER, R., *Clin. chim. acta*, (1963).
49. SCHALES et SCHALES, *J. biol. chem.*, *140*, 879, (1941).
50. SOMMER, A. J., *Am. j. med. tech.*, *20*, 244, (1954).
51. NGUYEN THRONG THU et ARDRY, R., *Bull. soc. chim. biol.*, *43*, 75, (1961).
52. KISTLER, P. et NITSCHMANN, H., *Vox sang.*, *7*, 414, (1962).
53. LANDY, L. et DICKEN, D. M., *J. lab. and clin. med.*, *27*, 1086, (1942).
54. BLISS, C. I., *The statistics of bioassay*, N.Y., (1952).
55. GADDUM, J. H., *Pharmacol. rev.*, *5*, 87, (1953).
56. BORTH, R., *Acta endocrinol.*, *35*, 454, (1960).
57. PENFOLD, W. J., *J. hyg.*, *14*, 215, (1914).
58. MONOD, J. et COHN, M., *Adv. in enzymol.*, *13*, 67, (1952).
59. GROB, D., *J. gen. physiol.*, *29*, 219, (1945).
60. GROB, D., *J. gen. physiol.*, *29*, 249, (1945).
61. GROB, D., *J. gen. physiol.*, *33*, 103, (1949).
62. WAISBREN, B. A. et BROWN, I., *J. of immunol.*, *88*, 249, (1962).
63. CHANG SHIMAN, R. et GAYER, R. P., *J. of immunol.*, *79*, 455, (1957).
64. PROBST, W., *communication personnelle*, (1962).
65. SCHECHTMAN, A. M., ds *Biol. specificity and growth*, (Princeton univ. press), (1955).
66. SEVAG, M. G., *Adv. in enzymol.*, *6*, 33, (1946).
67. STANIER, R. Y., *Ann. rev. microbiol.*, *5*, 35, (1951).
67 *bis*) STANIER, R. Y., *Aspects of synthesis and order in growth*, 43, (Princeton univ. press), (1955).
68. POLLOCK, M. R., *The enzymes*, *1*, 619, (1959).
69. HALVORSON, H. O., *Adv. in enzymol.*, *22*, 99, (1960).

70. PARDEE, A. B., ds *Microbial reaction to environment*, 19, (Cambridge univ. press), (1961).
71. RICKENBERG, H. V. et coll., *Ann. inst. Pasteur*, *91*, 829, (1956).
72. POLLOCK, M. R., *Brit. j. exptl. pathol.*, *31*, 739, (1950).
73. POLLOCK, M. R. et PERRET, C. J., *Brit. j. exptl. pathol.*, *32*, 387, (1951).
74. Kramer, M. et STRAUB, F. B., *Biochim. biophys. acta*, *21*, 410, (1956).
75. KRAMER, M. et STRAUB, F. B., *Acta physiol. acad. sci. Hung.*, *11*, 139, (1957).
76. HERRMANN, H., ds *Fund. aspects of normal and malignant growth*, (W. W. Nowinski ed.), (1960).
77. NOVELLI, G. D., *Ann. rev. of microbiol.*, *14*, 65, (1960).
78. HARRIS, R. J. C., *Protein biosynthesis*, (Acad. press), (1961).
79. CHANTRENNE, H., *Adv. in enzymol.*, *24*, 1, (1962).
80. GALE, E. F., ds *The bacteria*, *3*, 471, (1962).
81. MALMGREN, B. et HEDEN, C. G., *Acta pathol. microbiol. scand.*, *24*, 417-437-488, (1947).
82. CALDWELL, P. C. et HINSHELWOOD, C., *J. chem. soc.*, 3156, (1950).
83. KJELDGAARD, N. O., MAALØE, O. et SCHAECHTER, M., *J. gen. microbiol.*, *19*, 607, (1958).
84. SCHAECHTER, M., MAALØE, O. et KJELDGAARD, N. O., *J. gen. microbiol.*, *19*, 592, (1958).
85. MCQUILLEN, K., ROBERTS, R. B. et BRITTEN, R. J., *Proc. natl. acad. sci. U.S.*, *45*, 1437, (1959).
86. BELJANSKI, M. et OCHOA, S., *Proc. nat. acad. sci. U.S.*, *44*, 496, (1958).
87. SPIEGELMAN, S., ds *Recent progress in microbiol.*, (G. Tunevall ed.), 81, (1959).
88. NISMAN, B., *Biochim. biophys. acta*, *32*, 18, (1959).
89. WACHSMANN, J. T., FUKUHARA, H. et NISMAN, B., *Biochim. biophys. acta*, *42*, 388, (1960).

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 263
MATERIEL ET MÉTHODES 267
1. Méthodes analytiques 267
2. Préparation du sérum inducteur 268
3. Analyse du sérum dilué et dialysé (SDD) 268
4. Préparation des solutions à partir de SDD 269
5. Souches 270
6. Milieux 271
7. Technique de mesure 274
8. Les dosages biologiques et leur évaluation 274
EXPERIENCES BIOLOGIQUES 276
1. Effet général de SDD à diverses doses sur la croissance de *L. casei*. Description des phases de croissance. 276
2. Variation du taux de croissance de cultures témoin et induite par 0,1 ml de SDD. . . 280
3. Effet, sur la croissance induite, de la variation du volume d'inoculum. 281
4. Ajouts de l'inducteur à différents moments de la latence. Effet d'une induction surnuméraire 282
5. Analyses du milieu au cours de la croissance des systèmes témoin et induit. 284
6. Courbes de croissance de subcultures inoculées à partir de cultures témoin et induite 286
7. L'effet de l'inducteur est-il gratuit ? 288
8. Effets d'agents physiques, chimiques et biochimiques sur SDD. 290
9. Effets de diverses fractions des protéines sériques utilisées comme inducteurs de croissance 294
DISCUSSION DES RÉSULTATS 297
RÉSUMÉ 305
BIBLIOGRAPHIE 305