

# ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DES BACTÉRIES ACIDO-PROTÉOLYTIQUES

par

LUIGI GORINI ET ANNAMARIA TORRIANI

*Istituto Scientifico di Chimica e Biochimica "Giuliana Ronzoni", Milano (Italy)*

On sait que les *Lactococci* acidoprotéolytiques Gorini sont caractérisés par leur aptitude à hydrolyser la caséine en milieu acide<sup>1,2</sup>. Un travail précédent<sup>3</sup> a montré qu'il était intéressant d'étudier l'action de la pénicilline non pas sur la croissance même de ces microorganismes, mais sur leur activité protéolytique: quand on les cultive sur bouillon gélosé additionné de lait en présence de pénicilline (sel de sodium de la pénicilline G), on constate la formation de halos doubles qui permettent précisément de suivre l'action de la pénicilline sur la protéolyse des microorganismes en question. En l'absence de protéolyse, en effet, le milieu reste opaque; lorsque la protéolyse s'exerce, il devient au contraire plus ou moins transparent, du fait de la solubilisation de la caséine. Lorsqu'on étudie à ce point de vue diverses bactéries acidoprotéolytiques, on observe des halos doubles nettement distincts: l'un opaque, environnant immédiatement le point où a été déposée la solution de pénicilline, et l'autre, transparent, concentrique au premier. Le diamètre de ce dernier est d'autant plus grand que la souche bactérienne utilisée est plus sensible à la pénicilline. L'explication de ces doubles halos est évidemment la suivante: les halos opaques correspondent à une absence totale d'activité biologique, due à l'action inhibitrice brutale de la pénicilline sur les microorganismes, alors que les halos transparents extérieurs sont l'indice d'une exaltation de la protéolyse. Il apparaît ainsi que la pénicilline, à certaines concentrations, provoque l'accroissement de ce phénomène.

Dans le présent travail, nous avons cherché à préciser le mécanisme de cette action de la pénicilline. Les bactéries que nous avons examinées correspondent à neuf souches isolées autrefois par C. GORINI et dont l'origine est indiquée dans la partie expérimentale. De plus, à titre de contrôle, nous avons utilisé une souche de *Staphylococcus aureus* dont on sait<sup>2</sup> que cultivée dans le lait, elle se comporte en acidoprotéolytique.

Aucun des microorganismes en question ne produit de pénicillinase; on peut donc admettre que l'action de la pénicilline sur les cultures s'exerce d'une façon continue pendant au moins les trois ou quatre premiers jours, pour diminuer graduellement et disparaître vers le dixième jour d'incubation.

La sensibilité à la pénicilline des souches examinées est très variable. Pour exprimer cette sensibilité, nous la comparons à celle de *St. aureus*. Cet organisme est complètement inhibé par une dose de 1/50 U.O. par ml, en culture soit dans du lait, soit dans du bouillon. Attribuant la valeur 1 à cette sensibilité nous avons constaté que les sensibilités des diverses souches acidoprotéolytiques correspondent aux valeurs relatives données dans le Tableau I.

*Bibliographie p. 238.*

TABLEAU I  
SENSIBILITÉS RELATIVES A LA PÉNICILLINE DES DIVERSES SOUCHES BACTÉRIENNES

Souche bactérienne	Sensibilité	Souche bactérienne	Sensibilité
<i>St. aureus</i> (Oxford)		M 50	0.013
M 1	1	C 8	0.005
M 2	2	G 1	0.004
E 5	1	G 2	0.004
E 3	0.2	C 2	0.0025

Pour étudier le mécanisme de l'action de la pénicilline, nous avons utilisé ici des cultures non plus sur milieu gélosé, mais en milieu liquide, dans du lait, et nous avons suivi l'action de la pénicilline parallèlement sur la glycolyse et sur la protéolyse.

Si on fait varier la concentration de la pénicilline et que l'on observe ce qui se passe après trois jours, on constate que l'action de l'antibiotique n'est pas la même sur ces deux phénomènes: alors que la glycolyse diminue au fur et à mesure que s'accroissent les quantités de pénicilline introduites, la protéolyse augmente tout d'abord, passe par un maximum puis diminue pour disparaître tout à fait lorsque la concentration de la pénicilline est telle qu'elle entrave complètement tout développement bactérien (Fig. 2 et Tableau III). La concentration de pénicilline correspondant à l'exaltation maximum de la protéolyse, dépend de la sensibilité à la pénicilline de la souche bactérienne. D'une façon générale, on peut dire que cette concentration est la même que celle qui provoque une réduction du tiers de la glycolyse. Elle correspond à une dose de 1/1000 à 1/500 U.O. par ml pour les souches les plus sensibles, et de 1/2 à 1 U.O. par ml pour les souches les moins sensibles. Aux mêmes concentrations, le nombre des bactéries présentes est, par rapport à celui des cultures témoins sans pénicilline, réduit de 10 fois après les 16 premières heures, et de 100 fois environ au bout de 72 heures. L'augmentation de l'activité protéolytique par rapport au nombre des bactéries présentes est donc considérable.

Si d'autre part on suit l'activité glycolytique et l'activité protéolytique d'une culture d'un microorganisme déterminé, en présence d'une quantité de pénicilline, telle qu'elle provoque l'exaltation maximum de la protéolyse, et en fonction du temps, on observe une différence encore plus marquée dans la glycolyse et la protéolyse, différence qui ressort nettement des courbes de la Fig. 3 et des chiffres du Tableau IV.

Ainsi, les résultats obtenus en milieu liquide confirment tout à fait ceux qui ont été précédemment obtenus sur milieu gélosé. Avant de discuter le mécanisme de l'exaltation de la protéolyse par la pénicilline, ainsi mise en évidence, nous rappellerons plusieurs observations qui, apparemment au moins, présentent une certaine analogie avec celles qui font l'objet du présent travail.

MILLER et ses collaborateurs<sup>4</sup> ont déjà signalé que la pénicilline, à des concentrations inférieures à la dose inhibitrice, stimule le métabolisme et la croissance de *St. aureus*. D'autre part, ERICKSEN<sup>5</sup> a expliqué la formation des halos doubles que l'on observe dans des cultures de *St. aureus* sur bouillon gélosé, en admettant qu'il s'agit d'une bande circulaire correspondant à une croissance accrue des bactéries, entourant la zone d'inhibition. De tels halos doubles s'observent d'ailleurs avec d'autres antibiotiques<sup>6</sup>. Enfin, DUFRÉNOY et PRATT<sup>7</sup> ont récemment publié une série de travaux sur le mécanisme cytochimique de l'action de la pénicilline. Etudiant l'origine du deuxième halo qui entoure les bandes d'inhibition de *St. aureus*, ils constatent que ce halo correspond à une

zone présentant un pouvoir réducteur relativement élevé. Ils pensent qu'il s'agit là d'une zone où la croissance et le métabolisme des bactéries ont été stimulés par des doses subbactériostatiques de pénicilline. D'après DUFRENOY et PRATT, les cellules de *St. aureus*, sous l'action de l'antibiotique, passeraient ainsi par une période de métabolisme accru, au cours duquel elles consommeraient, en les oxydant, leurs métabolites, plus rapidement qu'elles ne pourraient les synthétiser; de là leur épuisement puis leur inhibition totale.

Dans le cas actuel, la diminution considérable du nombre des bactéries en présence des concentrations de pénicilline exaltant la protéolyse, montre qu'il ne peut s'agir d'une action stimulante de l'antibiotique sur la croissance. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées a priori, comme susceptibles d'expliquer le phénomène en question.

On peut tout d'abord considérer l'influence éventuelle d'une modification du  $p_H$ . Dans le cas des bactéries normales, la glycolyse, en milieu insuffisamment tamponné, provoque un abaissement du  $p_H$  qui peut descendre au-dessous de 5,5,  $p_H$  optimum des protéases des bactéries acidoprotéolytiques<sup>8</sup>. Lorsque la glycolyse est inhibée par la pénicilline, le  $p_H$  du milieu reste au voisinage de  $p_H$  5,5. L'action des protéases devrait donc être sensiblement supérieure à celle que l'on rencontre chez les bactéries normales. Cette explication n'est toutefois pas valable ici, puisque, soit en limitant la glycolyse de telle sorte qu'elle ne dépasse pas la capacité du milieu à fonctionner en tampon, soit en augmentant le pouvoir tampon du milieu, il est possible de réaliser des conditions expérimentales qui permettent une diminution importante dans la glycolyse sans aucune répercussion sur le  $p_H$  du milieu. Nous avons ainsi constaté que la protéolyse dans les cultures en présence de pénicilline, est toujours supérieure à la protéolyse dans les cultures témoins, lorsque le  $p_H$  reste le même (Tableaux V et VI).

D'autre part, la pénicilline n'est pas un activateur des enzymes protéolytiques en question. En effet, la pénicilline n'exerce aucune action favorisante sur les enzymes isolés des bactéries. Que la pénicilline ne soit pas un activateur du système protéasique isolé des cellules bactériennes, mais que le phénomène doive être en quelque façon lié à la vie de la culture elle-même, est démontré par l'observation suivante: si l'on effectue l'addition de la pénicilline à ces cultures dans des phases diverses de développement, soit au moment de l'ensemencement, soit après quelques heures au cours de la phase logarithmique, soit après quelques jours d'incubation, on observe que l'on a une augmentation de protéolyse seulement quand la pénicilline est ajoutée au moment même de l'ensemencement ou durant la phase logarithmique. Au cours de la même expérience, conformément aux faits désormais acquis que la pénicilline agit seulement durant la phase de croissance et pas après<sup>9, 10, 11</sup>, nous avons également constaté que la diminution de la glycolyse, comme celle du nombre des cellules présentes, ne se manifeste que lorsque l'addition de pénicilline est faite au moment de l'ensemencement ou pendant la phase logarithmique, tandis qu'elle n'est pas décelable si elle est effectuée plus tard. Il est évident donc que les trois faits, augmentation de protéolyse, diminution de la glycolyse et diminution du nombre des cellules, sont intimement liés.

On pouvait encore penser que la pénicilline est susceptible d'opérer une sélection de certaines cellules douées d'une activité protéolytique particulièrement prononcée, ou encore qu'elle est capable de provoquer une mutation dans ce sens, des bactéries initialement présentes. Considérant ces hypothèses, nous avons effectué les essais suivants: utilisant des cultures en présence de la quantité optimum de pénicilline fournissant le maximum d'activité protéolytique, nous en avons obtenu des sous-cultures, par des

prélèvements à des temps variant de quelques heures à quatre jours. Toutes les sous-cultures ainsi prélevées ont manifesté une activité protéolytique et glycolytique identique à celle des cultures témoins sans pénicilline. En outre, afin d'isoler une variété éventuelle particulièrement active au point de vue protéolytique, nous avons cultivé quatre de nos souches dans du lait contenant la quantité optimum de pénicilline. Après 24 repiquages successifs, chacun d'eux fournissant une sous-culture réensemencée parallèlement dans du lait sans pénicilline, nous n'avons constaté aucune différence entre l'une quelconque des cultures ainsi repiquées et les cultures témoins. La pénicilline ne provoque donc ni une sélection d'une variété préexistante, ni une mutation saisissable. Si, de plus, on considère que, pour les souches C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>50</sub>, E<sub>3</sub>, le nombre des cellules dans les cultures successives avec pénicilline subit une réduction énorme au premier repiquage et se maintient stationnaire à ce bas niveau sans jamais subir d'accroissement pendant les repiquages successifs avec pénicilline, tandis qu'au contraire il revient au niveau normal dès que l'on passe du milieu avec pénicilline au lait seul, on est conduit à penser que pour ces souches à très faible capacité d'adaptation, la constance du petit nombre de cellules dans les repiquages qui se suivent avec pénicilline, est le résultat d'un équilibre entre les cellules qui viennent de naître et celles qui sont détruites.

Si au contraire on a à faire à une bactérie capable de s'adapter à la pénicilline, on observe plus ou moins rapidement, après quelques repiquages en présence de pénicilline, une augmentation graduelle du nombre des cellules, au fur et à mesure que la bactérie s'adapte en modifiant son métabolisme. On vérifie facilement ce phénomène avec *St. aureus* qui, comme on sait, s'adapte facilement à de petites quantités de pénicilline lorsqu'il est cultivé en bouillon ordinaire. Nous avons constaté une adaptation analogue de la même bactérie par repiquages successifs dans du lait contenant 1/250 U.O. par ml: après une réduction importante de leur nombre initial, les cellules, après quelques repiquages, voient leur nombre reprendre celui des cultures témoins. Nous avons constaté que ce même phénomène se manifeste avec les souches E<sub>5</sub>, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, quoique de façon moins marquée. Aussi, au cours du présent travail, avons-nous évité d'utiliser ces souches qui deviennent facilement pénicillo-résistantes. Ces souches donnent en effet des résultats moins réguliers par suite de la superposition de leur résistance à l'antibiotique, aux autres manifestations que nous étudions. Dans le cas de *St. aureus*, comme dans celui des souches E<sub>5</sub>, M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, on constate que lorsque le nombre des cellules dans les cultures en présence de pénicilline tend à se rapprocher de celui des cultures témoins, non seulement la protéolyse mais aussi la glycolyse, s'accroît par rapport aux mêmes phénomènes dans les cultures en absence de pénicilline, d'où l'impossibilité de décider si on se trouve en présence d'un accroissement simultané des deux fonctions dans la cellule devenue résistante à la pénicilline, ou dans la culture, par le simple fait de l'accroissement du nombre des cellules.

Cette difficulté n'existe pas dans le cas des souches qui n'acquièrent pas de résistance à la pénicilline. Dans ce cas, les faits que nous venons d'exposer montrent que l'augmentation de la protéolyse n'est due ni à une modification du métabolisme, ni à une adaptation des rares cellules qui survivent en présence de quantités sublétales de pénicilline. Ces faits conduisent au contraire à penser que l'accroissement de l'activité protéolytique de la culture est due à l'autolyse des cellules sous l'action de la pénicilline. La composition enzymatique du milieu de culture change en effet notablement après la destruction des cellules; les endoenzymes qui étaient en quelque sorte masqués par la structure cellulaire agissent alors dans le milieu de culture, en même temps que les

exoenzymes normalement secrétés pendant la vie des cellules. On a vu précédemment<sup>12, 13</sup> que chez les bactéries acidoprotéolytiques, les protéinases sont des exoenzymes, alors que les peptidases sont des endoenzymes que l'on ne rencontre dans le milieu de culture qu'après destruction des cellules. La différence considérable de l'activité protéolytique des cultures en présence ou en l'absence de pénicilline, inciterait à penser qu'il s'agit plutôt d'une hydrolyse plus profonde, que d'un plus grand nombre de molécules protéiques hydrolysées. Nous avons eu la preuve qu'il en était bien ainsi en travaillant sur des cultures jeunes. On a constaté en elles la présence de peptidases, exerçant leur action sur des dipeptides et sur des tripeptides synthétiques, et ce, uniquement dans les milieux de culture en présence de pénicilline (Tableau IX).

Il apparaît donc que, dans les conditions expérimentales du présent travail, l'accroissement de l'activité protéolytique qui se manifeste dans les cultures où la pénicilline a détruit un nombre considérable de cellules, s'explique par la présence de peptidases libérées par l'autolyse de ces cellules.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Organismes.* Les microorganismes utilisés proviennent de la collection du Professeur C. GORINI. Ils correspondent à neuf souches différentes de *Lactococci* acidoprotéolytiques dont les désignations et les origines sont indiquées ci-dessous:

No. des souches	Origine	No. des souches	Origine
C 2	Fromage	E 5	Intestin de vache
C 8	Fromage	M 1	Mammelle de vache
G 1	Estomac de vache	M 2	Mammelle de vache
G 2	Estomac de vache	M 50	Mammelle de vache
E 3	Intestin de vache		

Nous avons en outre utilisé une culture de *Staphylococcus aureus*, souche Oxford.

*Milieu de culture.* Les cultures en milieu liquide sont faites dans du lait écrémé, stérilisé à 115°. Les plaques de lait gélosé sont préparées en ajoutant 20 % de lait à un bouillon gélosé ordinaire<sup>3</sup>. La pénicilline introduite est le sel de sodium cristallisé de la pénicilline G de la Chemical Solvent & Co., titrant 1630 U.O. par mg.

*Protéolyse et glycolyse.* L'action des peptidases est suivie par l'hydrolyse de la l-leucylglycine et de la l-leucylglycylglycine "Roche". Cette hydrolyse est mesurée par la méthode classique de SØRENSEN. La mesure de la glycolyse est faite par titrage direct de l'acidité apparue au cours du métabolisme des bactéries. La valeur de la protéolyse, déterminée également par la méthode de SØRENSEN, est exprimée, comme celle de la glycolyse, en ml de soude 0.01 N.

*Numération des bactéries.* La numération des cellules bactériennes est faite par dilution sur gélose; les cultures sont diluées de 30 000 à 3 000 000 de fois, selon les cas, de façon à obtenir sur les plaques de gélose un nombre raisonnable de cellules. Les résultats obtenus correspondent ainsi uniquement au nombre des cellules capables de se reproduire.

*Absence de pénicillinase.* Les essais portent sur le liquide provenant de cultures des souches C 8, M 50, E 5, E 3, incubées 3 jours à 37°. Après centrifugation des cultures, les liquides sont stérilisés soit par filtration à travers un filtre Seitz, soit par addition de 0.25 % de phénol<sup>14</sup> pour éviter l'adsorption éventuelle de la pénicillinase par le filtre. On

ajoute 1 U.O. par ml de pénicilline, on abandonne 24 heures à 37°, puis on titre la pénicilline restante par la méthode habituelle, utilisant des plaques de bouillon gélosé ensemencé par *St. aureus*. Des expériences témoins sont faites en maintenant dans les mêmes conditions la pénicilline dans des solutions salines physiologiques, du serum de lait, ou du liquide des mêmes cultures, préalablement porté à l'ébullition. Aucune différence n'est provoquée par le filtre Seitz. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau II.

TABLEAU II  
ACTION DESTRUCTRICE VIS-A-VIS DE LA PÉNICILLINE DES LIQUIDES DE CULTURE DE DIVERSES BACTÉRIES

Nature et origine du liquide	Diamètre du halo d'inhibition (mm)	
	Liquide frais	Liquide bouilli
Eau (témoin)	22	22
Sérum de lait (témoin)	22	21
Souche C 8	19	19
Souche E 3	17	18
Souche E 5	17	17
Souche M 50	17	16

Les chiffres du Tableau II montrent que le serum de lait n'exerce aucune action sur la pénicilline, alors que les quatre souches examinées manifestent une légère action qui se maintient même après ébullition du liquide. Il ne s'agit donc pas ici de pénicillinase, mais d'un facteur thermostable, dont l'action est analogue à celle de la cystéine.

*Stabilité de la pénicilline pendant le développement de cultures.* Les expériences sont faites ici avec les souches M 50, G 1 et C 8, qui ne sont pas inhibées par 1 U.O./ml de pénicilline ajoutée au milieu au moment de l'ensemencement. Des expériences témoins sont faites en ajoutant la même quantité de pénicilline dans de l'eau stérile, du serum de lait stérilisé ou du lait stérilisé. Le dosage de la pénicilline subsistant dans le milieu est fait quelques instants après son introduction, puis après 15 heures, puis chaque jour jusqu'au dixième. On constate ainsi une diminution graduelle de la pénicilline qui, au septième jour, est réduite à moins de 1/3 de sa valeur initiale et a pratiquement disparu le dixième jour.

*Sensibilité à la pénicilline des bactéries selon la nature du milieu de culture.* Nous avons étudié la sensibilité à la pénicilline de *St. aureus*, et des souches M 50 et C 8, cultivées sur les milieux solides suivants: lait gélosé; bouillon + 20 % de lait, gélosé; et bouillon gélosé. Les expériences sont faites à 37°, et le diamètre des halos d'inhibition est mesuré après 40 heures. La Fig. 1, correspondant à *St. aureus*, montre que l'action de la pénicilline est sensiblement moins marquée en présence de lait qu'en son absence.

D'autre part, nous avons étudié l'échelle de sensibilité à la pénicilline des diverses souches utilisées au cours du présent travail. Cette étude a été faite soit à l'aide de plaques de lait gélosé et en déterminant la

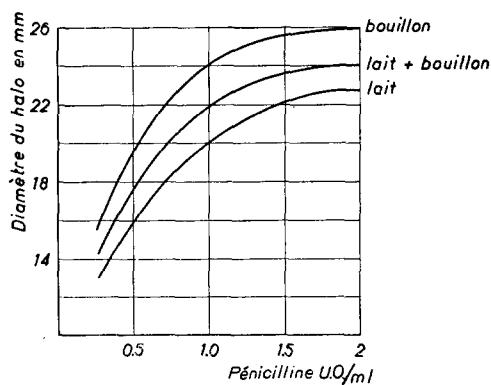


Fig. 1. Diamètre du halo d'inhibition en fonction de la concentration en pénicilline dans différents milieux

concentration de pénicilline nécessaire pour obtenir un halo d'opacité de 22 mm de diamètre, soit dans du lait liquide, en appliquant la méthode des dilutions en série, en déterminant pour chaque souche la quantité minimum de pénicilline nécessaire pour empêcher la coagulation du milieu. Les résultats obtenus par les deux méthodes ont été suffisamment concordantes pour nous permettre d'établir l'échelle de sensibilité relative indiquée plus haut.

TABLEAU III  
VARIATIONS DE LA GLYCOLYSE ET DE LA PROTÉOLYSE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE PÉNICILLINE

G = glycolyse

P = protéolyse

*Première série*

Concentration en pénicilline U.O./ml	C 8		G 1		G 2		M 50	
	G	P	G	P	G	P	G	P
1/50	100	100	95	100	100	100	92	100
1/10	—	—	—	—	—	—	89	110
1/5	—	—	89	132	86	103	84	109
1/2	91	116	73	215	81	110	78	145
1	72	190	52	143	77	127	40	53
2	47	116	23	55	50	65	0	0
5	0	0	0	0	0	0	—	—

*Deuxième série*

	M 1		M 2		E 5	
	G	P	G	P	G	P
1/1000	89	100	31	65	70	100
1/500	71	115	41	70	55	100
1/100	0	0	0	0	27	60
1/50	—	—	—	—	0	0
1/10	—	—	—	—	—	—

*P ou %*

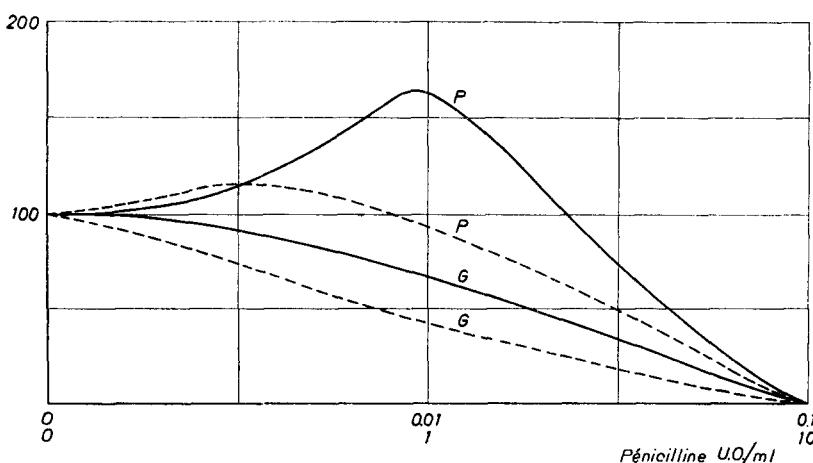


fig. 2. Valeurs relatives de la protéolyse (P) et de la glycolyse (G) en fonction de la concentration en pénicilline, dans des cultures de la souche C 2, en trait plein (concentration en pénicilline variant de 0 à 10 U.O./ml.) et de la souche E 3, en pointillé (concentration en pénicilline variant de 0 à 0.1).

Bibliographie p. 238.

*Variations de la glycolyse et de la protéolyse en fonction de la quantité de pénicilline.* Les mesures de la protéolyse et de la glycolyse sont faites après trois jours à 37°. Les chiffres du Tableau III représentent les valeurs relatives de la protéolyse ou de la glycolyse, dans les essais en présence de pénicilline, calculées en pour cent de la glycolyse ou de la protéolyse des cultures témoins en l'absence de pénicilline.

*Variations de la glycolyse et de la protéolyse en présence d'une quantité donnée de pénicilline, en fonction du temps.* Les expériences portent ici sur les souches C 8, M 50 et G 1. Chacune d'elles est ensemencée dans un Erlenmeyer contenant 50 ml de lait additionné de 1 U.O./ml de pénicilline. On maintient l'ensemble à 37° pendant 18 jours. Les titrages sont faits aux temps indiqués dans le Tableau IV qui, avec la Fig. 3, donnent les résultats obtenus.

Fig. 3. Valeurs de la protéolyse (P) et de la glycolyse (G) en absence de pénicilline (trait plein) ou en présence de 1 U.O./ml de pénicilline (pointillé) en fonction du temps, dans des cultures de la souche G 1

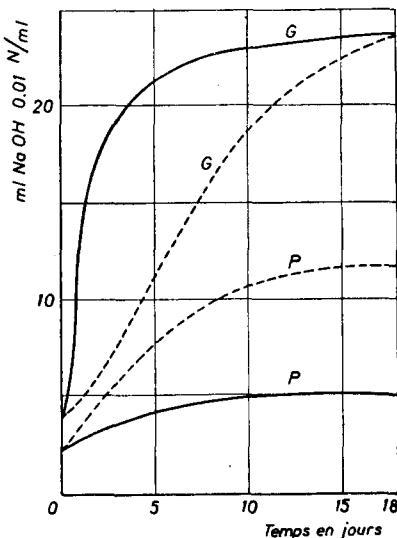


TABLEAU IV

VARIATIONS DE LA GLYCOLYSE ET DE LA PROTÉOLYSE EN PRÉSENCE DE PÉNICILLINE,  
EN FONCTION DU TEMPS

G = Glycolyse

P = Protéolyse

T = Valeur trouvée dans les tubes témoins

A = Valeur trouvée en présence de pénicilline

Résultats exprimés en ml de NaOH 0.01 N pour 1 ml de milieu de culture

Age de la culture (heures)	Souche C 8				Souche M 50			
	G		P		G		P	
	T	A	T	A	T	A	T	A
14	5.8	4.5	3.2	2.7	5.5	3.8	3.3	3.5
21	9.4	6.6	3.9	3.6	10.6	3.8	2.7	3.5
48	16.0	7.4	4.6	4.5	18.4	3.9	3.4	3.4
72	19.2	7.7	5.4	6.3	20.8	5.2	4.0	3.7
96	21.7	9.7	5.7	8.5	20.5	5.5	4.7	3.7
120	21.0	10.7	6.4	8.7	20.0	6.0	4.4	4.3
144	22.1	14.6	6.0	8.9	20.0	—	—	—
240	20.7	12.0	5.0	7.8	23.0	18.0	4.5	12.5
432	26.6	20.5	6.9	13.5	23.0	17.8	4.8	13.2

*L'augmentation de la protéolyse n'est pas due à une différence de  $p_H$  entre la culture en présence de pénicilline et la culture témoin.* Une première série d'expériences est faite avec les souches C 2 et G 1. Les mesures sont faites avant que les variations de la glycolyse n'aient eu d'action sur le  $p_H$  du milieu de culture doué lui-même d'un pouvoir tampon non négligeable. Le Tableau V montre les résultats obtenus.

Les chiffres du tableau V montrent que la protéolyse en présence de pénicilline est toujours supérieure à ce qu'elle est en son absence, bien que le  $p_H$ , mesuré à l'aide d'une électrode à quinhydrone ne soit pas modifié.

Une seconde série d'expériences utilise les souches G 1 et M 50, cultivées dans du lait additionné de carbonate de calcium de telle sorte que le pH se maintienne sensiblement au voisinage de 6. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau VI, qui permet les mêmes conclusions que le Tableau V.

TABLEAU V  
PROTÉOLYSE ET GLYCOLYSE A PH CONSTANT

Résultats exprimés en ml de NaOH 0.01 N pour 1 ml de milieu de culture

G = glycolyse

P = protéolyse

Mesures après 72 heures à 37°

	Souche G 1			Souche C 2		
	pH	G	P	pH	G	P
Lait seul (témoin) . . . . .	5.3	19.0	3.8	5.0	21.2	5.3
Lait + pénicilline (0.5 U.O./ml) .	5.2	18.3	5.1	5.1	19.5	6.5

TABLEAU VI

PROTÉOLYSE ET GLYCOLYSE A PH CONSTANT, EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CALCIUM  
Mêmes conditions que dans le Tableau V

	Souche G 1			Souche M 50		
	pH	G	P	pH	G	P
Lait seul (témoin) . . . . .	5.0	19.0	3.8	4.9	19.8	4.0
Lait + pénicilline (1 U.O./ml) . . . . .	5.5	14.5	9.1	—	—	—
Lait + CO <sub>3</sub> Ca . . . . .	6.0	15.1	8.9	6.0	14.1	9.0
Lait + CO <sub>3</sub> Ca + pénicilline (1 U.O./ml) . .	6.0	11.2	14.8	6.0	9.7	12.4

*La pénicilline n'est pas un activateur des protéases des bactéries acidoprotéolytiques.*

Comme solutions de protéases, nous avons employé les liquides provenant des cultures des souches C 8, M 50, G 1, maintenues trois jours à 37°; ces liquides sont obtenus par filtration sur filtre Seitz. Les essais de protéolyse portent sur 5 ml de lait auxquels on a ajouté des quantités de pénicilline variant de 1/10 à 4 U.O./ml, 1 ml de la solution de protéase et quelques gouttes de toluène. Deux séries d'expériences témoins sont faites, l'une sans ajouter de solution de protéase, et l'autre sans ajouter de pénicilline. L'action enzymatique se poursuit pendant 8 jours à 37°. Le titrage de la protéolyse et de la glycolyse montre que l'addition de pénicilline n'a aucune influence sur l'activité de ces deux phénomènes: les valeurs obtenues pour les six essais avec pénicilline sont en effet identiques à celles fournies par les expériences témoins sans pénicilline.

*Action de la pénicilline ajoutée à différentes phases du développement de la culture.*

Dans une première série d'expériences, les cultures des souches M 50, C 8 et G 1, sont additionnées d'une dose sublétale de pénicilline (1 U.O./ml) soit au moment de l'ensemencement, soit après 1, 2, 3 ou 4 jours. La numération des cellules montre que la pénicilline abaisse à environ 1/10 le nombre des cellules si on l'ajoute immédiatement, tandis qu'elle ne le diminue absolument pas si on l'ajoute à des cultures qui ont déjà subi un jour d'incubation. La protéolyse et la glycolyse ont été mesurées d'une part après 3 jours de contact avec la pénicilline, et d'autre part après 17 jours. Les résultats, exprimés en ml de NaOH 0.01 N, pour 1 ml de milieu, sont donnés dans le Tableau VII.

Les chiffres du Tableau VII montrent que la pénicilline agit exclusivement sur les

TABLEAU VII

## ACTION DE LA PÉNICILLINE AJOUTÉE A DIFFÉRENTES PHASES DU DÉVELOPPEMENT

Les résultats sont exprimés en ml de NaOH 0.01 N pour 1 ml de culture

G = glycolyse

P = protéolyse

A-0 = pénicilline ajoutée au moment même de l'ensemencement

A-1 = pénicilline ajoutée après 1 jour

A-4 = pénicilline ajoutée après 4 jours

	Souche M 50		Souche C 8		Souche G 1	
	G	P	G	P	G	P
<i>Analyse après 3 jours</i>						
Témoin	20.0	4.0	21.3	4.9	19.4	3.6
A-0	15.8	5.0	17.5	5.8	15.7	4.3
A-1	20.3	4.0	19.9	4.5	20.7	4.0
A-4	19.5	3.8	21.7	5.0	20.9	4.0
<i>Analyse après 17 jours</i>						
Témoin	22.5	4.5	22.5	5.6	21.2	4.3
A-0	22.4	5.4	24.0	7.5	18.0	8.3
A-1	23.0	4.6	—	—	—	—
A-4	21.7	4.0	25.2	6.0	17.7	4.0

cellules jeunes des cultures en phase de croissance; ceci ressort de la numération des bactéries et de la mesure de la glycolyse. L'augmentation de la protéolyse s'observe uniquement quand la pénicilline est ajoutée à des cultures jeunes, et cette augmentation se manifeste davantage avec le vieillissement des cultures. Au contraire, dans les cultures où la pénicilline est ajoutée après la phase de croissance, on n'observe aucune augmentation de la protéolyse ni immédiatement, ni au cours du vieillissement des cultures. Il apparaît ainsi que l'action de la pénicilline sur le système protéolytique ne se manifeste que simultanément avec son action sur la croissance.

Une deuxième série d'essais portant sur les mêmes souches, sur la souche E 5 et sur *St. aureus*, a été faite en employant des doses de pénicilline 15 fois supérieures à la dose minimum léthale, à savoir: 0.3 U.O./ml pour *St. aureus* et la souche E 5, 22 U.O./ml pour la souche M 50 et 75 U.O./ml pour la souche G 1. Ces quantités de pénicilline sont ajoutées aux différentes cultures au moment de l'ensemencement, ou après 3, 5, 7 ou 9 heures. La numération des cellules présentes dans les cultures témoins montre que, au cours des trois premières heures, le nombre des cellules reste pratiquement égal au nombre des cellules au moment de l'ensemencement. Après 5 heures, on observe le début de la phase de croissance, le nombre des bactéries étant quintuplé; entre 7 et 9 heures, la phase logarithmique est en plein développement, et le nombre des cellules devient de 100 à 200 fois plus grand. Enfin, après 24 heures, le nombre des bactéries est environ 500 fois le nombre initial. Quand on dénombre les bactéries dans les cultures en présence de pénicilline, 24 heures après leur ensemencement, on constate un arrêt complet de toutes les cultures en question, lorsque la pénicilline a été introduite au début de la phase logarithmique. Toutefois, les souches étudiées présentent des différences remarquables: les souches M 50 et G 1 restent inhibées quand la pénicilline est ajoutée plus tard, en pleine phase logarithmique; le nombre des cellules atteint à peine le double de ce qu'il était initialement. *St. aureus* au contraire, perd sa sensibilité à la pénicilline lorsque l'addition de cette dernière est faite 5 heures ou davantage après l'ensemencement. Il en résulte que, après 24 heures, le nombre des cellules est le même dans les cultures témoins de *St. aureus* et dans les cultures du même organisme additionnées de pénicilline

après 5 heures d'incubation. Quant à la souche E5 dont la sensibilité à la pénicilline est à peu près égale à celle de *St. aureus*, elle occupe ici une position intermédiaire, comme il ressort du Tableau VIII.

TABLEAU VIII

## ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR LE NOMBRE DES CELLULES

Numération effectuée après 24 heures d'incubation. Dilution 1/500 000

A-3 = pénicilline ajoutée après 3 heures

A-5 = pénicilline ajoutée après 5 heures

A-7 = pénicilline ajoutée après 7 heures

Nombre de cellules par ml/500 000

	<i>St. aureus</i>	E 5	M 50	G 1
Témoin	11500	11900	10800	7100
A-3	—	—	—	—
A-5	11200	111	—	4
A-7	11300	456	47	74

Ainsi, les souches G 1 et M 50 restent sensibles à la pénicilline, alors que *St. aureus* et à un moindre degré la souche E 5, s'adaptent à l'antibiotique.

*Etude des peptidases présentes dans le milieu de culture.* L'action peptolytique du milieu est étudiée sur la 1-leucyl-glycine et sur la 1-leucyl-glycyl-glycine; les solutions enzymatiques correspondent aux milieux de cultures stérilisés par filtration à travers un filtre Seitz. Le milieu est tamponné par du borate à pH 7.8; la durée de l'hydrolyse est de 24 heures à 40°. Les souches bactériennes utilisées ont été cultivées à 37° soit pendant 18 heures, soit pendant 3 jours. Les résultats, exprimés en ml de NaOH 0.01 N pour 1 ml de milieu réactionnel, sont donnés dans le Tableau IX.

TABLEAU IX

## HYDROLYSE DE LA LEUCYLGlyCINE ET DE LA LEUCYLGlyCYLGlyCINE PAR LES LIQUIDES DE CULTURE DE DIVERSES SOUCHES

Hydrolyse exprimée en ml de NaOH 0.01 N pour 1 ml de milieu

L'hydrolyse totale correspond à 2.0 ml de NaOH 0.01 N

n-A = nombre de U.O. de pénicilline/ml

Temps de culture	Leucylglycine		Leucylglycylglycine	
	18 h	72 h	18 h	72 h
<b>Souche:</b>				
G 1 témoin . . . . .	0.1	0.3	0.0	0.2
G 1 + 2 A . . . . .	1.7	1.7	0.3	0.7
G 1 + CO <sub>3</sub> Ca . . . . .	—	0.7	—	—
G 1 + CO <sub>3</sub> Ca + 2 A . . . . .	—	2.0	—	—
C 2 témoin . . . . .	0.0	0.3	0.0	0.0
C 2 + 2 A . . . . .	1.7	1.7	0.1	0.5
C 8 témoin . . . . .	—	0.4	—	—
C 8 + 2 A . . . . .	—	1.6	—	—
M 50 témoin . . . . .	—	0.4	—	—
M 50 + 2 A . . . . .	—	1.4	—	—
M 50 + CO <sub>3</sub> Ca . . . . .	—	1.0	—	—
M 50 + CO <sub>3</sub> Ca + 2 A . . . . .	—	2.0	—	—
E 5 témoin . . . . .	0.1	0.1	0.0	0.0
E 5 + 0.002 A . . . . .	0.0	0.3	0.2	0.5
<i>St. aureus</i> témoin . . . . .	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>St. aureus</i> + 0.002 A . . . . .	0.0	0.0	0.0	0.2

## RÉSUMÉ

Quand on cultive les *Lactococci* acidoprotéolytiques Gorini ou *St. aureus* souche Oxford, sur du bouillon gélosé additionné de lait en présence de pénicilline, on observe un double halo, dont la partie extérieure est due à l'augmentation de la protéolyse de la caséine du lait, provoquée par la pénicilline. Quand on cultive les mêmes bactéries, en milieu liquide, dans du lait, et en présence du même antibiotique, on observe une baisse de la glycolyse en même temps que la chute du nombre des cellules bactériennes; cette baisse est d'autant plus marquée que la concentration en pénicilline est plus forte. On constate au contraire un accroissement de la protéolyse qui passe par un maximum pour une concentration de pénicilline telle qu'elle abaisse d'un tiers environ la glycolyse, et telle qu'elle maintienne un certain équilibre entre le nombre des cellules naissantes et le nombre des cellules autolysées. L'accroissement de la protéolyse par la pénicilline en quantité sublétale, ne s'explique ni par l'influence d'une modification du pH, ni par une activation des protéases normalement secrétées dans le milieu, ni par une action sélective de la pénicilline sur certaines cellules qui seraient plus particulièrement riches en protéases, ni par la formation de mutants sous l'influence de l'antibiotique. L'accroissement de protéolyse dont il s'agit ici correspond essentiellement à la mise en liberté, par les cellules autolysées sous l'action de la pénicilline, de peptidases dont l'activité se trouve ainsi accrue. Ces résultats, obtenus en milieu liquide, expliquent ainsi tout à fait ceux qui sont fournis par les cultures sur milieu gélosé additionnés de lait. Le double halo observé doit être interprété comme une zone unique d'action bactériostatique décroissante. Autour de la goutte de pénicilline, là où la bactériostase est la plus forte et où la multiplication des cellules est complètement inhibée, on n'a même pas une activité protéolytique. Dans les zones plus extérieures, là où la pénicilline arrive en doses plus diluées, les cellules, tout en se multipliant, sont détruites en grande quantité et leur autolyse provoque une protéolyse plus grande dans le milieu.

## SUMMARY

When acido-proteolytic *Lactococci* Gorini or *St. aureus* (sub Oxford) is grown on gelatinised broth with the addition of milk in the presence of penicillin, there is observed a double halo of which the outer part is due to the increase in proteolysis of the milk casein brought about by the penicillin. When the same bacteria are grown in liquid medium, in milk, and in the presence of the same antibiotic, there is a lowering of the glycolysis simultaneously with a fall in the number of bacterial cells; this lowering becomes more marked as the concentration of penicillin is increased. On the other hand there is an increase in proteolysis, which attains a maximum at a penicillin concentration corresponding to a lowering of glycolysis by about one-third, and at this concentration there is a certain equilibrium between the number of new cells and the number autolysed. The increase in proteolysis by penicillin in sublethal quantity can be explained neither by the effect of change of pH, nor by an activation of the proteases normally secreted in the medium, nor by a selective action of penicillin on certain cells more particularly rich in proteases, nor by the formation of mutants under the influence of the antibiotic. The increase in proteolysis which occurs here corresponds essentially to the liberation, by cells autolysed under the action of penicillin, of peptidases whose activity is thereby increased.

These results obtained in liquid medium thus quite explain those given by cultures on gelatinised medium with added milk. The double halo is to be interpreted as a single zone of decreasing bacteriostatic action. Around the drop of penicillin, where bacteriostasis is strongest and cell multiplication is completely inhibited, there is not even any proteolytic activity. In the outer regions, which are reached by penicillin at lower concentrations, the cells are largely destroyed as they multiply and their autolysis brings about a greater proteolysis in the medium.

## ZUSAMMENFASSUNG

Wenn man *Lactococci acidoproteolytici* Gorini oder *St. aureus* (sub Oxford) auf gelatinierter Bouillon, woran Milch hinzugefügt ist, bei Anwesenheit von Penicillin züchtet, nimmt man einen doppelten umringenden Schein wahr, dessen äußerer Teil durch die Zunahme der Proteolyse des Kaseins der Milch, die durch Penicillin hervorgerufen wird, verursacht ist. Wenn man dieselben Bakterien in flüssigem Milieu, in Milch, züchtet, und bei Anwesenheit desselben Antibiotikums, nimmt man gleichzeitig mit der Verminderung der Anzahl der Bakterienzellen eine Verminderung der Glykolyse war; diese Verminderung ist desto stärker ausgeprägt, je höher die Penicillinkonzentration ist. Im Gegensatz dazu beobachtet man eine Zunahme der Proteolyse, die bei einer Penicillinkonzentration, wobei die Glykolyse um ein Drittel abgenommen ist, ihr Maximum hat. Bei dieser Konzentration tritt auch ein gewisses Gleichgewicht zwischen der Anzahl der entstehenden und der der autolyzierten Zellen auf. Die Zunahme der Proteolyse durch Penicillin in sublethaler Menge kann weder durch den Einfluss einer pH-Veränderung, noch durch die Aktivierung von normal in das Medium abgeschiedenen Proteasen, noch durch eine selektive Wirkung von Penicillin auf gewisse Zellen, die

besonders reich an Proteasen wären, noch durch die Bildung von Mutanten unter Einfluss des Antibiotikums erklärt werden. Die Zunahme der Proteolyse, um die es sich hier handelt, entspricht wesentlich der Freisetzung von Peptidasen von den autolytierten Zellen durch die Einwirkung von Penicillin. Diese in flüssigem Medium erhaltenen Resultate bestätigen also vollständig die bei Kulturen auf gelatiniertem Medium unter Zufügung von Milcherlangten. Der doppelte umringende Schein muss als eine einzelne abnehmende bakteriostatische Aktivierungszone ausgedeutet werden. In der Umgebung des Penicillintropfens, wo die Bakteriostase am stärksten ist und die Zellenvermehrung vollkommen gehemmt wird, tritt keine proteolytische Aktivität auf. In den weiterliegenden äusseren Zonen, wo das Penicillin in mehr verdünnten Dosen auftritt, werden die sich vermehrenden Zellen in grösserer Menge vernichtet, wobei ihre Autolyse eine grössere Proteolyse im Milieu verursach.:

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> C. GORINI, *Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett.*, 79 (1945-46) 309.
- <sup>2</sup> C. GORINI, *Enzymologia*, 12 (1947) 82.
- <sup>3</sup> A. TORRIANI, *Nature*, 161 (1948) 275.
- <sup>4</sup> W. S. MILLER, C. A. GREEN ET H. KITCHEN, *Nature*, 155 (1945) 210.
- <sup>5</sup> K. R. ERIKSEN, *Acta Path. Microb. Scand.*, 23 (1946) 284.
- <sup>6</sup> P. R. BURKHOLDER, *Am. J. Botany*, 31 (1944) 555.
- <sup>7</sup> J. DUFRENOY ET R. PRATT, *J. Bact.*, 53 (1947) 657; 54 (1947) 127 et 283.
- <sup>8</sup> L. GORINI, *Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett.*, 68 (1935) 115; 72 (1938) 133.
- <sup>9</sup> S. W. LEE, E. J. FOLEY ET J. A. EPSTEIN, *J. Bact.*, 48 (1944) 393.
- <sup>10</sup> G. L. HOLBY, K. MEYER ET E. CHAFFEE, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 50 (1942) 281.
- <sup>11</sup> T. YANAGITA ET Y. SUZUKI, *J. Penicillin*, 1 (1947) 34.
- <sup>12</sup> C. GORINI, W. GRASSMANN, H. SCHLEICH, *Z. physiol. Chem.*, 205 (1931) 133.
- <sup>13</sup> L. GORINI, *Enzymologia*, 10 (1942) 192.
- <sup>14</sup> A. BONDI Jr ET C. DIETZ, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 56 (1944) 132.

Reçu le 12 mars 1948