

## UN INHIBITEUR DE LA PÉNICILLINASE DANS LES FILTRATS DE *PENICILLIA* PRODUCTEURS DE PÉNICILLINE

par

SUZANNE HUTTER

*Laboratoire de microbiologie générale du centre de recherches pour la pénicilline et les autres antibiotiques  
du Ministère de la Santé Publique et Institut de Bactériologie de l'Université de Liège (Belgique)*

### INTRODUCTION

Dans une note antérieure<sup>1</sup>, nous avons signalé la présence d'un facteur "anti-pénicillinase" dans les milieux C.D.L. (Czapek-Dox + 10% de Levure sèche), cultivés de *Penicillia* producteurs de pénicilline. Nous avons également démontré son rôle dans les phénomènes de lyse précédemment observés et attribués alors à la "notalysine"<sup>2</sup>.

Sept *Penicillia* sur huit souches examinées (4, 46, 50, 832, 1249, 1951, X-1612 et Cop), cultivés sur C.D.L. secrètent dans ce milieu le facteur inhibiteur: la souche 50 seule fait exception. L'apparition de l'inhibiteur est très lente et fugace: 14<sup>ème</sup>, 17<sup>ème</sup> et parfois seulement 22<sup>ème</sup> jour de la culture. Il disparaît rapidement du milieu de culture, parfois déjà en moins de 24 heures après son apparition. De façon générale, celle-ci coïncide avec un  $p_H$  de 6.8 à 7.0 du milieu de culture, elle suit de près le maximum de production de pénicilline. On n'observe cependant pas de rapport entre la quantité de pénicilline produite par le *Penicillium* et l'activité de l'inhibiteur. Ainsi le filtrat dilué au 1/8 de la souche de Baarn est capable d'empêcher l'action de la pénicillinase, alors que cette souche ne produit même pas 1 U.O. de pénicilline au ml. Le filtrat d'une souche produisant 20 U.O./ml n'a pas une action plus marquée sur la pénicillinase.

Cultivés sur d'autres milieux de culture, ces *Penicillia* produisent également l'inhibiteur de la pénicillinase, mais en moindre quantité. Nous avons ainsi essayé le Czapek-Dox additionné de "corn-steep liquor" et un milieu à base d'extrait de champignons à différentes concentrations.

Trois *Penicillia* non-producteurs de pénicilline ne produisent pas d'"antipénicillinase". Une trentaine d'actinomycètes cultivés sur C.D.L. et choisis parmi les non-producteurs de pénicillinase, n'ont jamais montré trace d'un inhibiteur analogue. Nous n'avons pas étendu cette étude à d'autres microorganismes.

Le facteur inhibiteur peut suivre la pénicilline au cours de son extraction par l'éther à partir d'une solution aqueuse acide\*. Nous avons cependant réussi à séparer cet inhibiteur de la pénicilline en l'extrayant d'une solution neutre ou légèrement alca-

---

\* Nous en avons confirmation par un essai fait avec la pénicilline sodique impure "Roche" (335 U.O./mg), Batch PR8. A la concentration de 25 U.O./ml cette pénicilline empêche le développement du staphylocoque en présence de pénicillinase, alors que la même pénicillinase inhibe totalement l'activité de 25 U.O./ml de pénicilline cristallisée G. Extraite par 3 volumes de chloroforme à  $p_H$  neutre, elle donne un résidu qui, repris par l'acétone, contient encore l'inhibiteur.

line au moyen d'éther ou de chloroforme. On évapore à sec et on reprend le résidu par de l'acétone.

Nous relatons ici l'étude de l'activité du facteur inhibiteur de la pénicillinase, c.à.d. son action sur la pénicilline, sur le staphylocoque, sur la pénicillinase et son intervention dans la réaction de la pénicillinase sur la pénicilline.

### TECHNIQUES UTILISÉES

1. *Dosage de la pénicilline.* Les dosages de pénicilline ont tous été faits par la méthode des dilutions sériées, en progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  dans du bouillon ordinaire, ensemencé de *Staphylococcus aureus* (No. 79 de la Collection de l'Institut de Bactériologie de Liège). La lecture se fait en notant le premier tube dans lequel le staphylocoque se développe (end-point). S'il y a doute, on a recours à l'examen de frottis fixés et colorés.

2. *Dosage de la pénicillinase.* Les dosages de pénicillinase ont été faits par dilutions sériées en progression géométrique (raison  $\frac{1}{2}$ ) dans du bouillon additionné de pénicilline cristallisée G (200, 20, 2 ou 0.2 U.O.). On ensemence de staphylocoque (No. 79). L'"end-point" correspond au premier tube resté clair.

#### 3. Préparation des pénicillinases

a. Pénicillinase de *B. subtilis*: Selon DUTHIE<sup>3</sup>, on cultive 9 jours à 37° C la souche de *B. subtilis* N. C. T. C. 6346 en bouillon, avec 2 adjonctions de 1000 U.O. chacune de pénicilline/20 ml, espacées de 48 h. On centrifuge, ajuste le pH à 7.0 et filtre sur Seitz ou bougie Chamberland L3.

b. Pénicillinase de *Streptomyces*: Selon WELSCH<sup>4</sup>, une souche productrice de pénicillinase est cultivée sur eau peptonée additionnée d'amidon et de gélose. On centrifuge et filtre sur Seitz ou bougie Chamberland L3.

4. *Dosage de l'inhibiteur.* Le test courant utilisé pour la mise en évidence de l'inhibiteur dans les filtrats de culture comme dans les différentes liqueurs d'extraction est le suivant: On prépare des dilutions sériées en progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  du filtrat ou de aliéquer dans du bouillon contenant 20 U.O./ml de pénicilline cristallisée G; on ajoute à chaque tube 0.1 ml de pénicillinase *B. subtilis*; on ensemence de staphylocoque (No. 79). Après 18 h d'incubation à 37° C, on note les tubes restés clairs. S'il y a doute, on pratique des frottis.

Il est évident que l'on ne peut déceler l'action de l'inhibiteur qu'en présence d'une concentration minimale de pénicilline permettant l'inhibition totale du staphylocoque 79 dont la sensibilité à la pénicilline correspond à 0.02 U.O./ml.

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

a. *Influence de la concentration de l'inhibiteur.* L'inhibition de la pénicillinase dépend directement de la concentration du facteur inhibiteur. Ce dernier interfère dans la destruction de la pénicilline par la pénicillinase proportionnellement à sa concentration. La septième colonne du tableau illustre cette constatation: elle donne les quantités de pénicilline résiduelle lorsque l'on a laissé agir la pénicillinase d'actinomycète pendant 24 h sur différentes quantités de pénicilline en présence de trois concentrations de l'extrait inhibiteur (voir Tableau).

b. *Influence de la concentration en pénicilline.* Quelle que soit la quantité de pénicilline offerte à l'action de la pénicillinase, l'inhibiteur soustrait finalement à la destruction par la pénicillinase à peu près toujours la même quantité de pénicilline (voir Tableau, colonne 7: temps 24 h).

Un filtrat contenant 20 U.O./ml de pénicilline subit et révèle l'action de l'inhibiteur aussi bien qu'un filtrat additionné de 200 U.O./ml de pénicilline.

c. *Influence de la concentration en pénicillinase.* Quelle que la soit la pénicillinase utilisée (*B. subtilis* ou *Streptomyces*), le facteur inhibiteur agit identiquement. Il en est de même si l'activité de la pénicillinase varie dans le rapport de 1 à 100.

*Action de l'extrait inhibiteur sur le staphylocoque.* L'extrait inhibiteur n'a aucune action antibiotique propre.

*Action de l'extrait inhibiteur sur la pénicilline.* Nous n'avons pas noté d'action de l'inhibiteur sur la pénicilline.

Nous avons mis en présence pendant 24 heures à 37° C de la pénicilline cristallisée G (10 U.O./ml) et l'extrait inhibiteur (2 concentrations différentes). Des témoins sont constitués par ces deux éléments séparés que l'on réunit après le séjour de 24 h à 37° C. Partout on pratique le test par dilution en présence de pénicillinase *B. subtilis*.

Le contact anticipé n'a pas favorisé l'action de l'extrait inhibiteur: les résultats sont identiques de part et d'autre.

*Action de l'extrait inhibiteur sur la pénicillinase.* L'extrait inhibiteur réduit très faiblement l'activité de la pénicillinase elle-même.

Laissant en contact la pénicillinase et l'extrait inhibiteur pendant 24 h à 37° C et titrant ensuite la pénicillinase en présence de 20 U.O./ml de pénicilline cristallisée G, on observe que la pénicillinase, active à la dilution  $1/64$  dans le témoin, ne l'est plus qu'à la dilution  $1/16$  et  $1/32$ .

D'autres essais analogues montrent toujours un décalage d'un ou de deux tubes en dilutions sériées (raison  $1/2$ ) entre les témoins et la pénicillinase qui a été en contact avec l'extrait inhibiteur.

Si l'on élimine l'extrait inhibiteur par traitement à l'éther après les 24 h de contact avec la pénicillinase active (témoin traité de même), on obtient des résultats similaires: dans le témoin, la pénicillinase est active jusqu'à la dilution  $1/160$ ; traitée par l'extrait inhibiteur, elle n'est plus active que jusqu'aux dilutions  $1/80$  et  $1/40$ . Ce dernier résultat a été obtenu avec un extrait inhibiteur actif jusqu'à la dilution  $1/8$ .

On peut donc conclure à une légère destruction de la pénicillinase.

*Action de l'extrait inhibiteur sur la réaction "pénicillinase-pénicilline".* Nous avons étudié l'action de la pénicillinase en présence de l'extrait inhibiteur en titrant la pénicilline résiduelle au cours de la réaction (1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 24 h). Nous avons établi cette cinétique de la réaction en utilisant la pénicillinase d'actinomycète, thermolabile, ce qui permet d'interrompre la réaction au moment voulu par un simple chauffage d'une minute à 100° C et sans altérer notablement la pénicilline cristallisée G.

Notre premier soin a été de choisir la concentration la plus favorable de pénicillinase qui permette une réaction suffisamment ralentie pour suivre le phénomène.

Remarquant que la réaction est fortement entravée par l'acidification du milieu, nous avons dû renoncer à l'emploi de bouillon comme diluant de base et adopter une solution tampon phosphates M/5 de  $p_H$  7.0. En effet, l'extrait inhibiteur brut (solution dans l'acétone) acidifie considérablement les mélanges en bouillon; tandis qu'en solution tampon de phosphates M/5, le  $p_H$  des mélanges reste constant au cours de la réaction.

Nous avons offert successivement 1, 10, 100 et 1000 U.O./ml de pénicilline cristallisée G à l'action de la pénicillinase d'actinomycète  $1/80$  en la présence (3 concentrations différentes) et en l'absence de l'extrait inhibiteur (voir Tableau et courbes représentées aux Figs 1 à 4).

L'examen des courbes et du tableau nous permet de relever les points suivants:

1. Nous pouvons confirmer l'observation de WELSCH<sup>4</sup>, d'après laquelle la destruction de la pénicilline par la pénicillinase suit, au début, la cinétique d'une réaction d'ordre 1 (log de la concentration en fonction du temps).

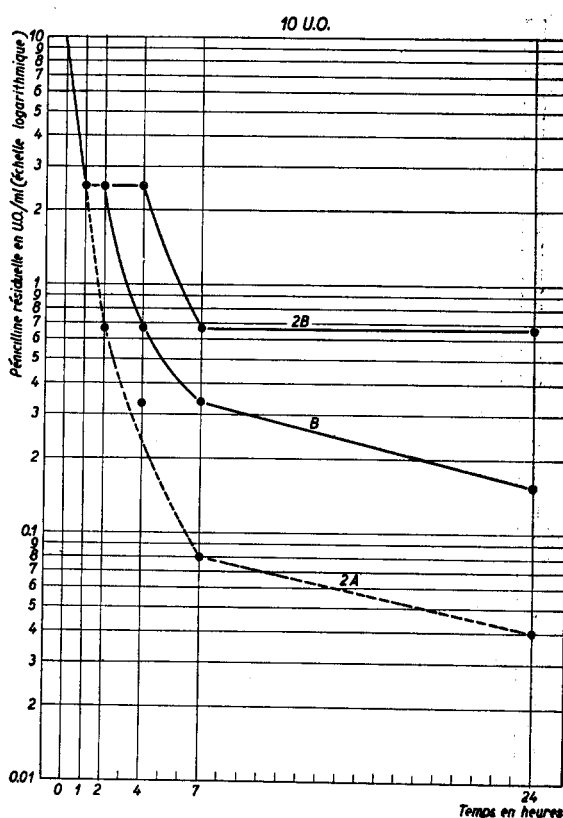
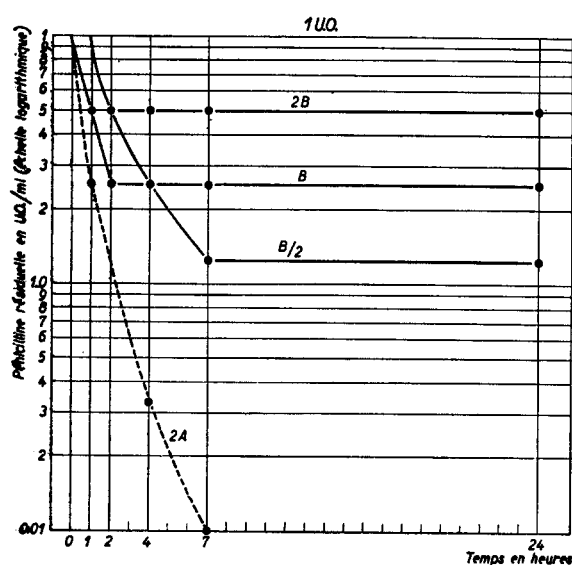
2. En fin de réaction, la quantité de pénicilline résiduelle varie assez proportionnellement avec la concentration de l'extrait inhibiteur. Cette pénicilline "préservée" de

l'action de la pénicillinase est finalement du même ordre de grandeur, quelle que soit la teneur en pénicilline initiale.

En concentrant 5 fois l'extrait inhibiteur, nous avons mieux marqué encore la relation entre la teneur en pénicilline résiduelle et la concentration de l'inhibiteur.

Nous avons offert également à la réaction  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$  d'U.O. de pénicilline cristallisée G dans l'espoir de protéger ainsi totalement la pénicilline incorporée, de la pénicillinase. Si la réaction se déroule d'abord normalement, elle laisse cependant, après 24 heures, 0.16 U.O., alors qu'il n'en reste plus trace dans le témoin.

3. La concentration en pénicilline la plus favorable à l'observation et à la mise en évidence du phénomène d'inhibition est celle qui correspond à 1 U.O. Le pourcentage d'inhibition rapporté dans la partie droite du tableau est plus élevé avec 1 U.O. au départ qu'avec 10, 100 ou 1000 U.O. L'imprécision relative du dosage des grandes quantités de pénicilline limite malheureusement l'interprétation de ces résultats.



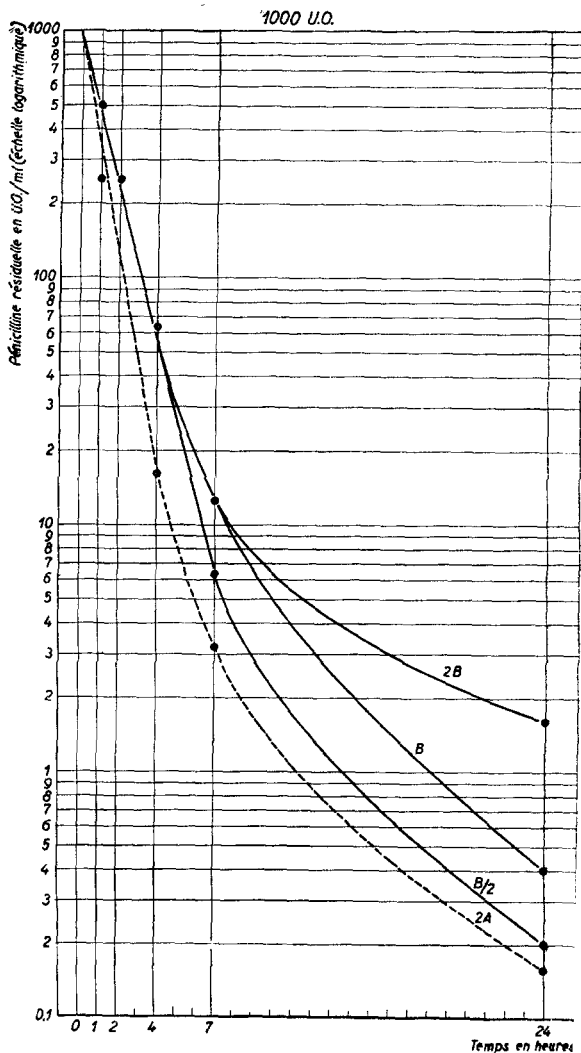
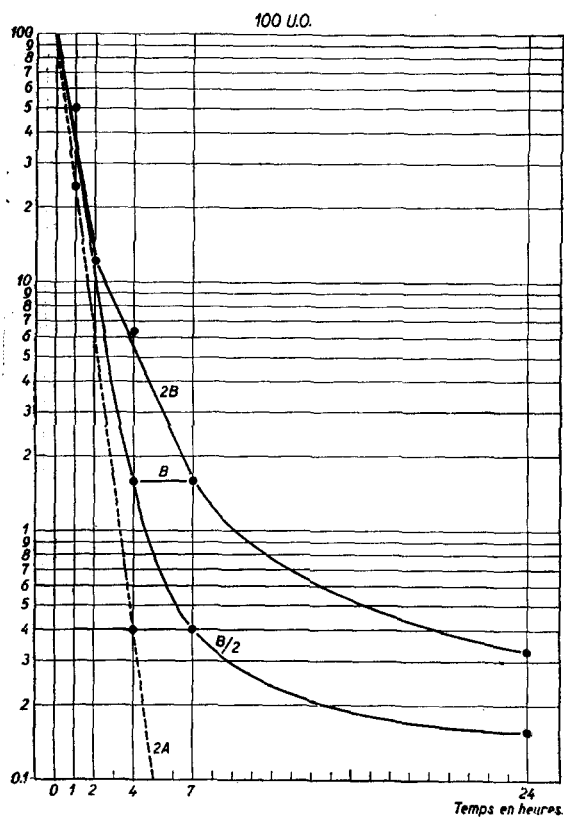
Figs 1-4. Destruction de la pénicilline par la pénicillinase en présence de l'inhibiteur. 2A = témoin sans inhibiteur/ml. Les conditions expérimentales

#### DISCUSSION

Nous nous avons donc mis en évidence un facteur inhibiteur de la réaction de la pénicillinase sur la pénicilline. Cette "antipénicillinase" est sécrétée dans le milieu de culture par le *Penicillium* producteur de pénicilline. Elle peut suivre la pénicilline au cours de sa purification. Nous l'avons également retrouvée dans un échantillon de pénicilline sodique impure "Roche" (335 U.O./mg). Cette observation est peut-être à rapprocher des résultats aberrants de HUNWICK<sup>5</sup> qui utilise une pénicilline impure (700-

Bibliographie p. 578.

800 U.O./mg) en grandes concentrations. SUREAU ET BOYER<sup>6</sup> mentionnent d'ailleurs que les impuretés de la pénicilline inhibent la pénicillinase. En outre, d'autres auteurs



inhibiteur;  $B/2 = 0.05$  ml extrait inhibiteur/ml;  $B = 0.10$  ml extrait inhibiteur/ml;  $2B = 0.20$  ml extrait sont identiques à celles rapportées dans le tableau.

ont remarqué certains avantages de la pénicilline commerciale qui ne se retrouvent plus dans la pénicilline cristallisée G<sup>7</sup>.

L'inhibiteur n'a aucune action antibiotique propre. Il ne semble pas agir sur la pénicilline. Il entrave la réaction de la pénicillinase sur la pénicilline en laissant des quantités de pénicilline résiduelle qui varient avec la concentration de l'inhibiteur. La destruction de la pénicilline par la pénicillinase est d'autant plus entravée, cependant, que la concentration initiale de pénicilline est plus faible; ceci serait en faveur de l'hypothèse d'un phénomène d'inhibition compétitive. Cependant nous observons une

TABLEAU I

Pénicilline initiale (U.O./ml)	Inhibiteur (ml/ml)	Pénicilline résiduelle (U.O./ml) après:					Pénicilline détruite (U.O./ml) après:					Inhibition (en %) après:				
		1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h	1 h	2 h	4 h	7 h	24 h
I	0.00	0.25	0.125	0.033	0.00	0.00	0.75	0.875	0.966	1.0	1.0	—	—	—	—	—
	0.05	0.5	0.25	0.125	0.125	0.125	0.50	0.75	0.75	0.875	0.875	33	14	22	12.5	12.5
	0.10	—	0.5	0.25	0.25	0.25	—	0.5	0.75	0.75	0.75	—	33	22	25	25
	0.20	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	100	33	48	50	50
10	0.00	2.5	0.67	0.33	0.08	0.04	7.5	9.33	9.66	9.92	9.96	—	—	—	—	—
	0.05	—	—	—	—	0.16	—	—	—	—	9.84	—	—	—	—	—
	0.10	2.5	2.5	0.67	0.33	0.16	7.5	7.5	9.33	9.66	9.84	0	20	3.5	2.5	1
	0.20	2.5	2.5	2.5	0.67	0.67	7.5	7.5	7.5	9.33	9.33	0	20	22	6	6
100	0.00	25.0	12.5	0.4	0.00	0.00	75.0	87.5	99.6	100.0	100.0	—	—	—	—	—
	0.05	50.0	12.5	1.6	0.4	0.16	50.0	87.5	98.4	99.6	99.84	33	0	1	0.4	0.16
	0.10	50.0	12.5	1.6	1.6	0.33	50.0	87.5	98.4	98.4	99.66	33	0	1	1.6	0.33
	0.20	50.0	12.5	6.25	1.6	0.33	50.0	87.5	93.75	98.4	99.66	33	0	5	1.6	0.33
1000	0.00	250.0	250.0	16.0	3.2	0.16	750.0	750.0	984.0	996.8	999.84	—	—	—	—	—
	0.05	250.0	250.0	62.5	6.2	0.2	750.0	750.0	937.5	993.8	999.8	0	0	5	0.3	0
	0.10	500.0	—	62.5	12.5	0.4	500.0	—	937.5	987.5	999.6	33	—	5	1	0
	0.20	250.0	250.0	62.5	12.5	1.6	750.0	750.0	937.5	987.5	998.4	0	0	5	1	0.1

Pénicilline d'actinomycète 1/50; 0.1 ml/ml partout

pH = 7.0; tampon phosphates M/5

Acétone: 0.2 ml/ml partout

légère destruction de la pénicillinase elle-même, en présence de l'inhibiteur. Il se peut toutefois que cette altération soit due à un facteur secondaire présent dans l'extrait utilisé.

Nous exprimons ici notre reconnaissance à la FONDATION POUR LES BOURSES EN BIOLOGIE ET EN MÉDECINE DE L'ACADÉMIE SUISSE DES SCIENCES MÉDICALES, qui nous a généreusement accordé une Bourse en Biologie nous permettant de poursuivre ce travail à Liège.

Nous tenons à remercier le Dr. MAURICE WELSCH, agrégé, Chef de Travaux à l'Institut de Bactériologie de l'Université de Liège et Directeur au C.R.P.A. pour ses conseils et l'intérêt constant qu'il a bien voulu accorder à notre travail; nous remercions également Mr. J. A. AESCHLIMANN, Director of Chemical Research, Hoffmann-La Roche, Inc., New Jersey, U.S.A., pour son aimable envoi d'échantillons de pénicilline.

#### SUMMARY

1. A factor present in filtrates of various *Penicillia* producing penicillin was shown to inhibit the destruction of penicillin by penicillinase.

2. This factor had no effect either on penicillin, nor on *Staphylococci* but slightly inactivated penicillinase itself.

3. Incubation for 24 hours of penicillin with penicillinase in the presence of the inhibiting factor resulted in residual penicillin values proportional to the concentration of inhibitor and independent of the amount of initial penicillin.

#### RÉSUMÉ

1. Il a été démontré qu'un facteur, présent dans les filtrats de diverses espèces de *penicillium* produisant de la pénicilline, est capable d'inhiber la destruction de la pénicilline par la pénicillinase.

2. Ce facteur n'exerce aucune action sur la pénicilline ni sur les staphylocoques, mais inactive légèrement la pénicillinase elle-même.

3. Lorsqu'on effectue l'incubation de la pénicilline avec la pénicillinase pendant 24 heures en présence du facteur d'inhibition, on constate une teneur en pénicilline résiduelle proportionnelle à la concentration de l'inhibiteur, et indépendante de la quantité initiale de pénicilline.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Filtrate von verschiedenen Penicillin erzeugenden *Penicillia* enthalten einen Faktor, welcher den Abbau von Penicillin durch Penicillinase hemmt.

2. Dieser Faktor ist ohne Einfluss auf Penicillin oder auf Staphylokokken. Er inaktiviert jedoch Penicillinase selbst ein wenig.

3. Nach 24-stündiger Bebrütung von Penicillin und Penicillinase in Gegenwart des hemmenden Faktors, ist die Menge unveränderten Penicillins der Konzentration der hemmenden Substanz proportional und von der ursprünglichen Penicillinmenge unabhängig.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> S. HUTTER, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 560.
- <sup>2</sup> S. HUTTER, *Schweiz. med. Wochschr.*, 75 (1945) 411; *ibid.*, 76 (1946) 1138.
- <sup>3</sup> E. S. DUTHIE, *Brit. J. Exptl Path.*, 25 (1944) 98.
- <sup>4</sup> M. WELSCH, *4th. Internat. Congr. Microbiol. Copenhagen, Abstr. Comm.*, (1947) 21.
- <sup>5</sup> R. F. HUNWICKE, *Brit. Med. J.*, (1946) 855.
- <sup>6</sup> B. SUREAU ET F. BOYER, *Ann. inst. Pasteur*, 73 (1947) 1167.
- <sup>7</sup> W. B. DUNHAM AND G. RAKE, *Am. J. Syphilis, Gonorrhea, Venereal Diseases*, 29 (1945) 214.  
D. M. HAMRE AND G. RAKE, *J. Infectious Diseases*, 81 (1947) 175.  
G. BARAC, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 950.  
G. L. HOBBY, E. BROWN, AND R. A. PATELSKI, *Proc. Soc. Exptl Path. Biol.*, 67 (1948) 6.

Reçu le 9 février 1949