

LES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES CONDITIONNANT LA PRÉSENCE DE PROTÉINASE DANS LES CULTURES DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

par

LUIGI GORINI* ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Micrococcus lysodeikticus a été décrit par FLEMING¹ comme n'attaquant ni la gélatine ni l'ovalbumine coagulée. En fait, les essais habituels sur la gélatine, l'ovalbumine et le lait (culture des bactéries en milieux liquides contenant ces substances et placées dans des tubes maintenus verticalement) ne permettent de déceler aucune activité protéolytique de cet organisme. Mais si on utilise la technique de C. GORINI² qui consiste à cultiver les organismes sur gélose inclinée dans un tube, et à introduire du lait sur la culture bien développée, on constate la coagulation de la caséine, suivie de sa liquéfaction, ce qui met en évidence un système protéolytique dans la culture; avec la même technique, en remplaçant le lait par la gélatine, on peut facilement observer la liquéfaction de celle-ci. L'action de *M. lysodeikticus* sur la caséine peut être observée de façon particulièrement nette en cultivant cette bactérie sur plaque de bouillon gélosé additionné de 20% de lait: après une vingtaine d'heures à 33° les colonies sont entourées de halos transparents, dont le diamètre s'accroît avec le temps, et qui correspondent à la zone dans laquelle la caséine a été hydrolysée. L'action protéolytique de *M. lysodeikticus* ne se manifeste donc que dans certaines conditions, à l'étude desquelles est consacré le présent travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Techniques générales

Bactéries. La souche bactérienne employée est une souche de *M. lysodeikticus* cultivée à partir de la souche originale de FLEMING.

Milieux de culture. Les milieux utilisés ici sont: soit un milieu liquide: peptone 10 g, extrait de viande LIEBIG 25 g, NaCl 5 g, eau de source 1 litre, p_H ajusté à 7.3 par addition de soude; soit un milieu liquide glucosé: milieu précédent additionné de 0.8% de glucose; soit un milieu solide, glucosé ou non: l'un des milieux précédents additionné de 2.5% d'agar; soit du lait écrémé.

Ces différents milieux sont répartis dans des récipients appropriés, stérilisés et ensemencés dans les conditions habituelles. Dans quelques cas nous avons suivi l'intensité du développement des cultures en déterminant le taux de croissance $\mu = \Delta \log_2 \text{densité optique/heure}$, mesuré au cours de la phase exponentielle ou en déterminant le poids sec des bactéries après un temps donné.

* En mission de l'Istituto Giuliana Ronzoni, Milano.

Les valeurs de p_H indiquées dans les tableaux sont celles qui ont été mesurées à la fin des périodes d'incubation.

Mesure de l'activité protéolytique. L'action protéolytique de *M. lysodeikticus* a été étudiée ici sur la gélatine et sur le lait. La gélatine utilisée est de la gélatine "pure déminéralisée"*, à point isoélectrique 4.7, résidu fixe après combustion 0.05%. On en dissout 7 g dans une solution tampon de borate d'après CLARK ET LUBBS pour avoir un volume total de 100 ml, le p_H final de la solution de gélatine étant de 8.5. A cette solution on ajoute 0.1 g de thymol pour la conserver. La mesure de l'activité protéolytique est faite soit dans le liquide de culture débarrassé des bactéries par centrifugation, soit dans le liquide de lavage de l'agar obtenu comme il est dit plus loin, et dont le volume total est toujours ramené à 80 ml. Les essais sont faits en mélangeant 5 ml de la solution de gélatine, 1 ml du liquide à étudier, x ml ($x < 1$) d'une solution d'un réactif éventuel, 1-x ml de solution tampon de borate à p_H 8.5, le tout étant maintenu un temps donné à 26°. La protéolyse est mesurée le plus souvent par viscosimétrie; les mesures sont faites à l'aide d'un viscosimètre d'OSTWALD à 35°. La variation relative F

de la viscosité devrait théoriquement être donnée par la formule $F'_t = \frac{V_o - V_t}{V_o}$ où V_o et V_t sont les vitesses d'écoulement aux temps 0 et t respectivement. En fait, nous utilisons la formule équivalente $F_t = - \frac{(T_t - T_o) \cdot 100}{T_t}$ dans laquelle les temps d'écoulement T sont mesurés en secondes, après les temps t mesurés en minutes. La valeur de T_o est fournie par une solution dont l'enzyme a été préalablement détruit par maintien 10 minutes à 100°. Le signe — et le facteur 100 permettent d'exprimer les résultats par des valeurs positives et sans décimales.

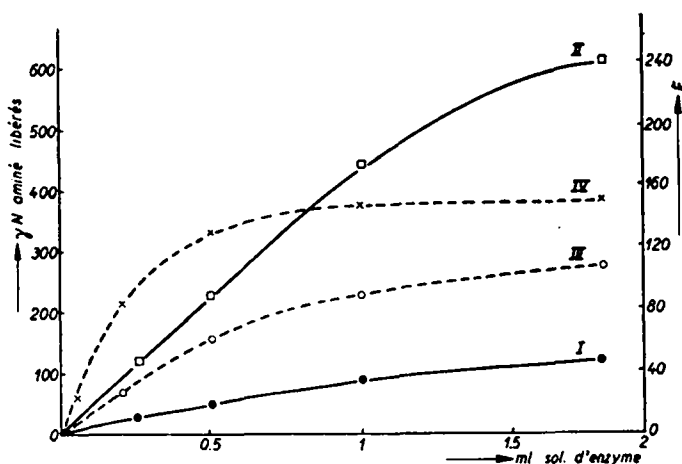


Fig. 1. Comparaison entre les résultats donnés par les mesures de l'activité de la protéinase, soit par la méthode de VAN SLYKE, soit par viscosimétrie.

Hydrolyse de la gélatine en fonction du temps d'action de l'enzyme et de la quantité d'enzyme. Température 26°, tampon borate p_H 8.5.

Courbe I: Temps d'action 1 heure; méthode de VAN SLYKE

Courbe II: Temps d'action 18 heures; méthode de VAN SLYKE

Courbe III: Temps d'action 20 minutes; viscosimétrie

Courbe IV: Temps d'action 18 heures; viscosimétrie

* ROUSSELOT, Paris.

Il ne nous est pas possible de discuter ici comment la diminution de la viscosité d'une solution de gélatine est liée au degré de son hydrolyse; de toute façon, il ne s'agit pas ici d'une fonction simple. On doit donc écarter toute possibilité de calcul basé sur une proportionnalité, même approchée. Remarquons seulement qu'une hydrolyse trop faible pour être décelée avec netteté par la libération de groupes NH_2 est accompagnée déjà d'une chute notable de la viscosité. Ce phénomène est donc très commode pour mettre rapidement et sûrement en évidence une action protéolytique. En outre, la chute de la viscosité est pratiquement indépendante de l'action éventuelle d'enzymes autres que les protéinases et capables de libérer ou de détruire des groupes NH_2 (Fig. 1). La mesure de la chute totale de la viscosité, mesure qui n'a pas d'intérêt dans le cas d'activités enzymatiques assez grandes, donne donc des indications utiles dans le cas d'activités enzymatiques faibles, qu'il serait impossible de déceler autrement.

Les courbes de la Fig. 1 obtenues dans les conditions décrites plus haut, montrent comment varie la viscosité d'une solution de gélatine avec le nombre de NH_2 libérés par la protéinase de *M. lysodeikticus*.

II. Conditions favorables à la présence du système protéolytique dans les milieux de culture

L'activité protéolytique des cultures de *M. lysodeikticus* ne se manifeste que lorsque les bactéries se sont développées dans des conditions bien déterminées: température, pH , aérobiose, composition du milieu, temps d'incubation. Des observations préliminaires nous avaient montré que dans des cultures de *M. lysodeikticus* sur bouillon gélosé (80 ml répartis sur 200 cm^2 dans des bouteilles de Roux), à 33°, il apparaît une protéinase qui se trouve en partie dans le liquide de condensation en contact avec les cellules bactériennes, et en partie dans l'agar. La totalité de cette protéinase est facilement extraite par trois lavages successifs de la surface de l'agar, à l'eau distillée (25 ml chaque fois, les eaux de lavage étant réunies et leur volume complété à 80 ml), les bactéries étant éliminées par centrifugation. Nous avons recherché les conditions les meilleures pour la production de la protéinase en question.

A. Influence de la température

Les bactéries sont cultivées en aérobiose sur bouillon gélosé (80 ml répartis sur 200 cm^2 , dans des bouteilles de ROUX) aux températures et pendant les temps indiqués dans le Tableau I. L'influence de la température ressort des chiffres de ce tableau.

TABLEAU I
INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE
Culture en aérobiose: bouillon gélosé sans glucose
Activité de protéinase exprimée par F_{15}

Age de la culture (heures)	26°	33°	37°
24 PH	7.9	8.1	8.3
24 F_{15}	57	41	17
48 PH	8.4	—	9.0
48 F_{15}	140	—	33
Taux de croissance:	0.17	—	0.60

Ces chiffres montrent que: 1. La production de protéinase est d'autant plus grande que la température est plus basse, au moins jusqu'à 26°; il n'a pas été possible de descendre au-dessous de cette température, car la croissance des bactéries eût été inhibée. 2. La croissance des bactéries, caractérisée par le taux de croissance augmente au contraire avec la température, entre 26 et 37°; l'accumulation de la protéinase dans le milieu, ramenée à une même quantité de cellules bactériennes, croît donc encore plus que ne l'indiquent les chiffres bruts du tableau, quand la température baisse. 3. Les variations de p_H observées aux diverses températures et aux divers temps sont ici trop faibles pour jouer autre chose qu'un rôle secondaire; le p_H des cultures augmente légèrement avec le temps, et ce d'autant plus vite que les cultures se développent plus rapidement; c'est-à-dire que le p_H croît, après 24 heures et surtout après 48 heures, avec la température; néanmoins, il apparaît qu'à 26°, après 48 heures et à p_H 8.4, il y a considérablement plus de protéinase qu'au même p_H après 24 h à 37°, ou qu'à p_H 9.0 après 48 h à 37°.

B. Influence du temps d'incubation et du p_H

Les cultures de *M. lysodeikticus* se développant sur bouillon gélosé ou en bouillon liquide, alcalinisent notablement le milieu, le p_H passant, en 2 à 4 jours selon la température, de 7.3 à environ 9.5. Pour éviter autant que possible des changements trop grands du p_H au cours de la croissance, nous n'avons pas utilisé les systèmes tampons habituels: ceux-ci sont en effet susceptibles d'agir ici autrement que par la concentration en ions H^+ qu'ils déterminent: les phosphates ont une action inhibitrice, aux p_H supérieurs à 7, due, comme on le verra plus loin, à ce qu'ils fixent le calcium indispensable au fonctionnement et à la stabilité de la protéinase; le citrate présente une action inhibitrice très nette due à la même raison, en outre, le citrate est rapidement métabolisé par *M. lysodeikticus*; quant au véronal, au borate, etc., nous les avons écartés pour ne pas introduire dans le milieu des substances éventuellement toxiques. Nous avons employé l'artifice suivant: *M. lysodeikticus* métabolise le glucose en formant des acides; il en résulte que l'addition de glucose au bouillon permet dans une certaine mesure de contrecarrer l'alcalinisation du milieu et d'obtenir, pour des concentrations en glucose déterminées, et à des temps de développement donnés, des p_H définis. Disons tout de suite qu'une quantité de glucose telle que le p_H tombe nettement en-dessous de 7 supprime toute présence de la protéinase dans le milieu de culture. Les chiffres des Tableaux II et III montrent que la quantité

TABLEAU II
INFLUENCE DU GLUCOSE

Culture en aérobiose: bouillon gélosé, glucosé ou non
Température d'incubation: 26°
Activité de protéinase exprimée par F_{20}

Age de la culture (heures)		Concentration en glucose (%)			
		0	0.04	0.4	0.8
24	PH	7.7	7.5	7.4	7.3
	F ₂₀	35	38	38	33
72	PH	8.9	8.9	8.5	8.1
	F ₂₀	100	95	110	140

maximum de protéinase dans le milieu est obtenue après 3 jours d'incubation à 26° en présence de 0.8% de glucose, en aérobiose, le p_H étant alors voisin de 8. L'ensemble de ces faits correspond à l'instabilité de l'enzyme isolée des cellules aux p_H éloignés de 8.

TABLEAU III

INFLUENCE DU TEMPS

Culture en aérobiose: bouillon gélosé glucosé à 0.8%

Température d'incubation: 26°

p_H à la fin de chaque période, compris entre 8.0 et 8.2

Activité de protéinase exprimée par F_{30}

P = poids total (mg) des bactéries dans chaque essai

Age de la culture (jours)	P	F_{30}
1	161	33
2	411	130
3	500	140
6	533	100

C. Influence de l'aération

Avant d'étudier l'influence de l'aération des milieux de culture sur la quantité de protéinase présente, nous avons constaté que, dans des cultures sur milieu solide, cette quantité est indépendante de l'agent de gélification utilisé (méthyl-cellulose, carboxy-méthyl-cellulose, agar, gélatine). Le Tableau IVa indique à titre d'exemple les résultats fournis par des cultures sur agar et sur gélatine. D'autre part, en ce qui concerne les cultures sur milieu gélatineux, nous avons fait l'expérience suivante: ce milieu, encore solide à 22°, est liquide à 28°; les bactéries sontensemencées et maintenues 3 jours dans 80 ml du milieu gélatiné liquide à 28°, dans des bouteilles de Roux placées verticalement. Au bout de ce temps, on constate qu'il n'y a eu aucune protéolyse notable, car en refroidissant le milieu à 20°, il se solidifie rapidement. Les bouteilles ayant été maintenant disposées horizontalement puis refroidies à 20°, on continue l'incubation à 22° au lieu de 28°; à cette température, le milieu devient solide. On retourne alors les bouteilles comme d'habitude, de telle sorte que le milieu soit à la partie supérieure. Au cours de l'incubation à 22° et sous l'action de la protéinase bactérienne qui se forme alors, le milieu se liquéfie peu à peu et coule à la partie inférieure. Après 3 jours, tout est liquéfié et rien ne peut plus être solidifié par refroidissement même à 10°.

Les expériences concernant l'influence de l'aération sont faites avec les milieux liquides suivants: lait, bouillon glucosé additionné de 10% de gélatine, bouillon glucosé seul. Ces différents milieux sont disposés soit en couche mince, soit en volume profond, ou bien ils sont agités soit en présence d'azote soit en présence d'air:

Lait. Les cultures en couche mince (25 ml de lait répartis sur une surface de 200 cm²) montrent après 2 jours à 26° une hydrolyse nette du lait, qui brunit et devient transparent; dans les cultures en couche épaisse (7 cm de profondeur), au contraire, le lait reste inchangé après 15 jours et davantage, quoique les bactéries s'y soient visiblement développées.

Bouillon glucosé gélatiné. Trois tubes d'environ 60 ml, fermés, du modèle décrit antérieurement³ contiennent 30 ml de bouillon glucosé gélatiné; après ensemencement, ils sont agités au thermostat à 28° pendant 5 jours, chacun d'eux renfermant un type différent d'atmosphère. On observe tous les jours leur comportement après maintien pendant 30 minutes à 15° et à 23°. A partir du troisième jour, ce comportement, indiqué dans le Tableau IVb, reste constant. Des repiquages montrent qu'après 5 jours, les bactéries ont gardé leur vitalité dans chacun des tubes. Les résultats obtenus montrent nettement que la protéolyse de la gélatine n'a lieu que lorsque la culture est suffisamment aérée.

Bouillon glucosé. Le bouillon est soit réparti dans des bouteilles de Roux à raison de 25 ml par 200 cm² (couche mince), soit placé dans des tubes à essais ayant alors une profondeur de 7 cm (culture profonde); soit introduit dans un tube agité comme dans le cas précédent, en présence d'air libre. Les résultats, qui se passent de commentaires, sont donnés par le Tableau IVc.

TABLEAU IV
INFLUENCE DE L'AÉRATION

Concentration du glucose: 0.8% Température d'incubation: 26°
Durée d'incubation: 3 jours Activité de protéinase exprimée par F₂₀ et F_{total}

	a. Milieux solides		
	gélifié à 2.5%	gélifié à 10%	
PH	8.0	8.0	
F ₂₀	140	78	
F _{total}	230	200	
	b. Milieu liquide gélifié agité dans:		
	Azote	Air confiné	Air libre
PH	7.3	7.9	7.9
Consistance du milieu après refroidissement à:			
15°	solide	solide	liquide
23°	solide	liquide	liquide
Croissance bactérienne:	+	++	++
	c. Milieu liquide		
	profond	en couche mince	agité
PH	7.3	7.8	7.8
F ₂₀	0	43	63
F _{total}	0	100	230

L'ensemble des données expérimentales précédentes montre que les conditions optimum pour obtenir la protéinase de *M. lysodeikticus* sont: une température de 26°, un p_H maintenu aux environs de 8 par addition de 0.8% de glucose, un temps d'incubation de 3 jours et surtout une aérobose aussi bonne que possible, cette dernière condition s'obtenant commodément par l'emploi de cultures à la surface d'un bouillon gélosé.

III. Substances s'opposant à la présence de la protéinase dans les cultures de *M. lysodeikticus*

Lorsque les conditions précédentes, particulièrement favorables à l'accumulation de la protéinase dans les milieux de culture de *M. lysodeikticus*, sont remplies, il est possible de supprimer pratiquement cette accumulation par addition au milieu de diverses substances qui, d'autre part, n'exercent aucune action toxique sur les bactéries, ou qui même favorisent leur croissance. Ces substances sont les suivantes: phosphates, citrates, oxalates, et dans certaines conditions, glucose. Les détails et les résultats des expériences concernant l'influence de ces substances sont donnés dans les Tableaux V à VIII.

TABLEAU V

ACTION DES PHOSPHATES

Culture en aérobose: bouillon gélosé

Température d'incubation: 26°

Activité de protéinase exprimée par F_{90} A: en présence de phosphates $M/10$ B: en présence seulement des phosphates contenus naturellement dans le bouillon ($\sim M/136$)

Age de la culture (jours)	PH	F_{90}	
		A	B
1	7.5	5	33
2	7.8	19	130
5	8.0	0	120

TABLEAU VI

ACTION DE L'OXALATE

Culture en aérobose: bouillon glucosé en couche mince, avec ou sans oxalate

Température d'incubation: 26°

Age de la culture: 4 jours

Activité de protéinase exprimée par F_{total} , la solution enzymatique étant en présence ou non de $CaCl_2$ $M/200$

Oxalate	F_{total}	
	Protéinase seule	Protéinase + $CaCl_2$
0	210	240
$M/500$	210	240
$M/200$	0	35
$M/20$	0	38

TABLEAU VII

ACTION DU CITRATE

Culture en aérobiose: bouillon gélosé, seul ou additionné de citrate M/10

Température d'incubation: 26°

Activité de la protéinase exprimée par F_{total} , la protéinase étant soit seule, soit en présence de CaCl_2 M/200, soit en présence de citrate M/200

Age de la culture (jours)	Cultures					
	Sans citrate		Avec citrate			
	PH	F_{total}	PH	F_{total}		
				Protéinase sans addition	Protéinase + CaCl_2	Protéinase + citrate
1	7.4	68	7.5	9	65	
3	8.6	300	8.4	260	290	4

TABLEAU VIII

ACTION DU GLUCOSE

Culture en semi-anaérobiose: bouillon glucosé ou non en culture profonde

Température d'incubation: 26°

pH final = 7.7

Activité de la protéinase exprimée par F_{total} , la protéinase étant soit seule, soit en présence de CaCl_2 M/200

Age de la culture (jours)	Cultures			
	Sans glucose		Avec glucose 0.8%	
	F_{total}		F_{total}	
	Protéinase sans addition	Protéinase + CaCl_2	Protéinase sans addition	Protéinase + CaCl_2
3	9	27	0	10
7	70	68	34	34

IV. Remarques sur la croissance de *M. lysodeikticus*

A 26°, la croissance des bactéries, même en aérobiose, est trop faible pour fournir un poids mesurable de microorganisme. Nous avons donc étudié cette croissance à 37°, en présence de glucose et de citrate. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau IX. Quoique ces résultats ne soient pas immédiatement comparables avec ce qui se passe à 26°, ils montrent néanmoins que la croissance est sensiblement accrue en présence de ces deux métabolites.

Les chiffres du Tableau IX donnent en particulier à ceux des Tableaux II et VII, toute leur signification.

TABLEAU IX

INFLUENCE DU GLUCOSE OU DU CITRATE SUR LA CROISSANCE DE *M. lysodeikticus*

Culture en aérobiose en bouillon agité

Température de croissance: 37°

pH variant avec le temps de 7.5 à 8.1

Les chiffres correspondent à la quantité de bactéries (mg poids sec/ml)

Age de la culture (heures)	Témoin	Concentration en glucose		Citrate M/10
		0.04	0.8	
24	3.4	3.4	4.0	3.5
48	5.0	5.4	8.2	5.1
72	4.8	—	10.8	4.5
Taux de croissance	0.60	0.65	—	0.66
Durée de latence	1 heure	0	0	0

DISCUSSION

L'ensemble des résultats expérimentaux précédents prend une signification particulièrement intéressante si on les examine à la lumière d'un fait dont nous avons déjà brièvement signalé l'existence⁴, à savoir que la protéinase de *M. lysodeikticus* non seulement n'est active, mais aussi n'est stable, que si elle est liée à une certaine quantité de calcium. De nombreuses expériences qui seront prochainement publiées montrent qu'une telle combinaison protéinase-calcium existe chez plusieurs autres bactéries, et qu'elle est plus ou moins dissociable selon les espèces; chez *M. lysodeikticus*, cette combinaison est particulièrement dissociable. Il en résulte que la présence de toute substance capable de fixer d'une façon quelconque le calcium, et par conséquent capable d'entrer suffisamment en concurrence avec la protéinase vis à vis de ce métal, doit provoquer l'inactivation plus ou moins réversible de la protéinase. De telles substances n'agissent donc pas, vraisemblablement, en s'opposant à la synthèse de l'enzyme en question, mais en rendant le milieu inapte à son accumulation.

Ceci étant dit, l'action du phosphate, de l'oxalate et du citrate s'explique d'elle-même, le milieu de culture étant légèrement alcalin. C'est l'action du phosphate qui est la moins marquée; les milieux de culture contiennent toujours un peu de cette substance ($\sim M/136$) sans laquelle tout développement des bactéries serait impossible. Le mécanisme de l'action inhibitrice du phosphate est d'autre part corroboré par l'allure de la courbe représentant la stabilité de la protéinase isolée des cellules en présence de cette substance, courbe qui montre que cette stabilité tombe brusquement du côté alcalin*. En ce qui concerne l'influence de l'oxalate, on voit qu'elle apparaît pour une concentration qui est pratiquement la même que celle du calcium contenu naturellement dans le milieu de culture ($\sim M/160$).

L'action du citrate est particulièrement intéressante du fait que cette substance

* Les détails concernant cette courbe seront donnés dans une prochaine publication.

est métabolisée par *M. lysodeikticus*. Dans le Tableau VII, on voit en effet que, le développement des bactéries étant pratiquement le même avec une tendance à être légèrement supérieur en présence de citrate, l'activité de la protéinase ne peut être mise en évidence dans le milieu, lorsque celui-ci contient du citrate, qu'après un certain retard. Ce retard correspond précisément au temps nécessaire à *M. lysodeikticus* pour métaboliser le citrate. Mais quoiqu'inactive, la protéinase existe dans le milieu de culture car l'addition de calcium au liquide de culture privé des bactéries, suffit pour faire apparaître une activité protéolytique analogue à celle que l'on observe indépendamment de toute addition de calcium dans le liquide obtenu parallèlement avec des cultures non additionnées de citrate. Dans les deux cas, il s'agit d'ailleurs de cultures très jeunes chez lesquelles les quantités d'enzyme sont encore faibles. En outre, une nouvelle addition de citrate au liquide de culture devenu actif après la consommation du citrate ajouté initialement, supprime de nouveau toute activité protéolytique. L'action antagoniste du citrate vis à vis de l'enzyme est donc nette.

Toutes les expériences qui viennent d'être discutées ont été faites en aérobiose. Pour mettre en évidence l'influence du glucose, nous avons dû opérer au contraire en une semi-anaérobiose qui déjà entraîne une réduction considérable du développement des microorganismes; en anaérobiose complète, ce développement eût été trop faible. Quoique l'activité de la protéinase soit alors réduite précisément du fait du petit nombre de bactéries présentes, elle suffit à montrer ici encore l'antagonisme entre la présence de glucose et celle du calcium. D'après les résultats précédents, l'explication de cet antagonisme paraît être la suivante: le métabolisme du glucose en semi-anaérobiose donne lieu à la formation plus ou moins transitoire d'une série de substances (esters phosphoriques, acides hydroxylés, etc.) capables de fixer le calcium concurremment à la protéinase; le degré de l'aérobiose conditionne la formation ou la durée de vie de ces substances, qui disparaissent rapidement en présence d'oxygène. On comprend ainsi qu'en aérobiose intense, il n'y ait guère d'action inhibitrice du glucose sur la protéinase.

Il est d'ailleurs probable que le même mécanisme explique que les cultures de *M. lysodeikticus* en bouillon ordinaire non glucosé, ou dans du lait, contiennent d'autant plus de protéinase que l'aération est meilleure, toutes sortes de substances capables de fixer le calcium pouvant se former et s'accumuler en anaérobiose dans de tels milieux. En particulier cette conception explique le succès de la méthode de COSTANTINO GORINI² pour la mise en évidence d'une activité protéolytique chez certains microorganismes qui, lorsqu'ils sont cultivés en profondeur, ne possèdent apparemment pas cette activité.

Enfin, le rôle du calcium apparaît comme particulièrement important pour expliquer chez *M. lysodeikticus* la suspension bien connue de la protéolyse lorsqu'il y a glycolyse active; cette suspension n'est pas due ici, comme cela a été supposé dans d'autres cas, à un simple abaissement de p_H du milieu, qui deviendrait alors défavorable à l'activité de la protéinase, mais, comme on l'a vu plus haut, à une immobilisation du calcium. Ce métal semble donc jouer un rôle fondamental dans l'orientation du métabolisme cellulaire.

RÉSUMÉ

Micrococcus lysodeikticus est une bactérie dont l'activité protéolytique ne se manifeste que dans des conditions bien définies. Cette activité protéolytique peut être étudiée commodément soit sur la caséine, soit sur la gélatine. Les conditions optimum pour obtenir la protéinase de *M. lysodeikticus* sont, les bactéries étant cultivées sur bouillon gélosé, une température de 26°, un p_H maintenu aux

environs de 8 par addition de 0.8% de glucose, un temps d'incubation de 3 jours; l'aérobiose est ici particulièrement importante. D'autre part, lorsque ces conditions sont réalisées, la suppression de toute protéinase dans le milieu de culture est provoquée par addition à ce milieu de diverses substances qui n'exercent aucune action toxique sur les bactéries, ou qui même favorisent leur croissance: phosphates, citrates, oxalates. En semianaérobiose, le glucose exerce une action inhibitrice remarquable. L'ensemble des résultats obtenus s'explique lorsqu'on les rapproche du fait que la protéinase de *M. lysodeikticus* non seulement n'est active, mais aussi n'est stable, que si elle est liée à une certaine quantité de calcium. Les expériences faites ici avec le citrate sont particulièrement illustratives à cet égard.

SUMMARY

The proteolytic activity of *Micrococcus lysodeikticus* can only be seen under very definite conditions. This activity can easily be studied on casein or gelatin. The best conditions for obtaining the proteinase of *M. lysodeikticus* are: agar-broth as culture medium for the bacteria, temperature: 26° C, pH maintained at about 8 by addition of 0.8% glucose, time of incubation: 3 days; aerobiosis is particularly important. On the other hand, once these conditions are established, suppression of the proteinase of the culture medium is obtained by addition of such substances, as phosphates, citrates or oxalates, which either are not toxic for the bacteria or even stimulate their growth. At semianaerobiosis glucose acts as an important inhibitor. All these results can be explained in relation to the fact that the proteinase of *M. lysodeikticus* is active and stable only when bound to a certain quantity of calcium. Our experiments with citrate are particularly elucidative in this respect.

ZUSAMMENFASSUNG

Micrococcus lysodeikticus ist ein Bakterium, dessen proteolytische Aktivität sich nur unter ganz bestimmten Bedingungen zeigt. Diese Aktivität kann an Casein oder Gelatin bequem untersucht werden. Die günstigsten Bedingungen um die Proteinase aus *M. lysodeikticus* zu erhalten sind: die Bakterien sollen auf Agar-Bouillon gezüchtet sein, Temperatur 26°, pH um 8 konstant gehalten durch Zugabe von 0.8% Glucose, Inkubationszeit 3 Tage; Aerobiose ist besonders wichtig. Sind diese Bedingungen erfüllt, so wird die vollständige Unterdrückung der Proteinase im Kulturmedium durch Zugabe von Substanzen wie Phosphate, Citrate, Oxalate erreicht, die auf die Bakterien keine Giftwirkung ausüben oder deren Wachstum sogar beschleunigen. Bei Semianaerobiose übt die Glucose eine bedeutende Hemmwirkung aus. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse lässt sich erklären, wenn man sie mit der Tatsache in Verbindung bringt, dass die Proteinase von *M. lysodeikticus* nur aktiv und auch stabil ist, wenn sie an eine bestimmte Menge Calcium gebunden ist. Die hier mit Citrat ausgeführten Versuche sind in diesem Zusammenhang besonders aufschlussreich.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. FLEMING, *Proc. Roy. Soc. (London)* B 93 (1922) 306.
- ² C. GORINI, *Rend. accad. naz. Lincei*, 15 (1932) 1000.
- ³ P. DESNUELLE ET C. FROMAGEOT, *Enzymologia*, 6 (1939) 80.
- ⁴ L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Compt. rend.*, 229 (1949) 559.

Reçu le 19 Janvier 1950