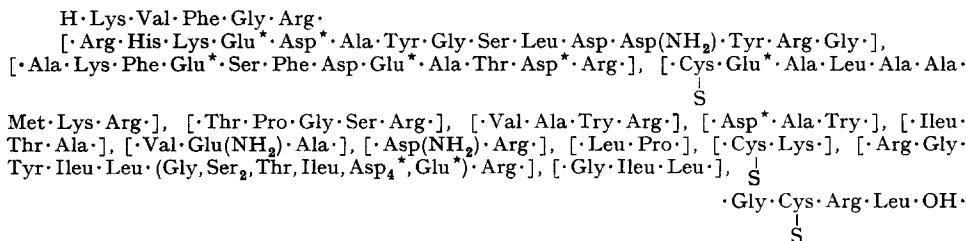


* Il n'a pas été déterminé si ces résidus sont amidés ou non.

SUMMARY

Various peptides, resulting from the hydrolysis of hen's egg lysozyme by pepsin have been separated and isolated in a pure state. The structure of some of them has been established. The results allow us to extend our knowledge concerning the chemical structure of lysozyme and to assign the following partial structure to it:



* It has not been determined whether or not these residues contain an amido group.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 298.
- 2 P. JOLLÈS ET J. THAUREAUX, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1685.
- 3 J. THAUREAUX ET P. JOLLÈS, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1926.
- 4 G. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 95.
- 5 C. H. W. HIRS, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
- 6 F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 511.
- 7 R. ACHER, U. R. LAURILA ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 97.
- 8 P. JOLLÈS, J. JOLLÈS-THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Symposium on Prot. Structure, Paris, Juillet 1957* (sous presse).

Reçu le 10 août 1957

ÉTUDE DE LA FLOCULATION SPONTANÉE DES FORMES R DE CERTAINES ENTEROBACTÉRIACÉES*

J. DIRKX, J. BEUMER ET M. P. BEUMER-JOCHMANS

Institut Pasteur de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Dans un travail récent^{1,2}, nous avons étudié la fixation du phage H-SHPB(Ca) sur différents germes sensibles, dans différentes conditions ioniques et nous avons montré

* Dans ce travail, nous avons utilisé la terminologie généralement en usage dans la science des colloïdes, plutôt que celle de la bactériologie. C'est ainsi que nous appelons flocculation les phénomènes désignés en bactériologie sous les noms d'agglutination, agglomération, etc.

que cette fixation, sur les germes R, pouvait s'expliquer en tenant compte des charges électriques portées respectivement par le phage et les bactéries sensibles, si l'on appliquait la théorie de VERWEY ET OVERBEEK³ à l'étude de cette fixation, envisagée comme un problème de stabilité de colloïdes.

Nous nous sommes demandé si cette même théorie ne permettrait pas d'expliquer la floculation spontanée des suspensions de germes R en fonction des conditions ioniques du milieu de suspension. Jusqu'à présent, le comportement hydrophobe des germes R a été attribué à la présence de lipides à la surface de ces bactéries^{4,5}. Il nous a semblé intéressant de rechercher si le comportement particulier des bactéries R n'était pas susceptible d'une interprétation purement physique.

CONSIDÉRATIONS THÉORIQUES

Il n'entre pas dans le cadre de ce travail de reprendre par le détail la théorie de VERWEY ET OVERBEEK mais nous en rappellerons toutefois l'essentiel. Lorsque deux particules colloïdales chargées, porteuses par conséquent d'une double couche électro-ionique, se trouvent à proximité l'une de l'autre, elles sont soumises à deux forces différentes. La première est une force de répulsion électrique, dépendant de la distance entre les particules, de leur rayon, de leur potentiel et de l'extension plus ou moins prononcée de la partie diffuse de la double couche, elle-même inversement proportionnelle à la racine carrée de la force ionique. L'autre force, attractive cette fois, résulte de l'existence de dipôles électriques transitoires au sein des atomes constitutifs des particules en présence. Elle ne dépend que du rayon de ces dernières et de la distance qui les sépare et est désignée généralement sous le nom de force de LONDON-VAN DER WAALS. Ces deux forces ont pour conséquence l'existence d'énergies potentielles d'attraction et de répulsion auxquelles VERWEY ET OVERBEEK donnent les expressions suivantes:

(a) Pour l'énergie potentielle de répulsion V_r ,

$$V_r = \frac{1}{2} \epsilon \cdot a \cdot \psi_0^2 \cdot \ln(1 + e^{-\kappa \cdot H_0}) \quad (1)$$

où ϵ est la constante diélectrique du milieu, a le rayon de la particule, ψ_0 le potentiel électrique à la surface de la particule, H_0 la plus courte distance entre deux particules et κ le paramètre de DEBYE ET HÜCKEL qui, en milieu aqueux et à la température ordinaire est donné par la relation :

$$\kappa = 0.327 \cdot 10^8 \sqrt{\mu}$$

où μ est la force ionique de la solution.

(b) Pour l'énergie potentielle d'attraction :

$$V_a = \frac{-A \cdot a}{12H_0} \quad (2)$$

où A est une constante appelée constante de LONDON-VAN DER WAALS. Le signe --- devant l'expression (2) indique que l'énergie d'attraction est de signe opposé à l'énergie de répulsion.

L'énergie totale d'interaction entre deux particules est évidemment donnée par la somme algébrique des deux énergies composantes :

$$V = V_r + V_a \quad (3)$$

Il est à remarquer que l'énergie potentielle de répulsion dépend, entre autres choses, des conditions ioniques du milieu par le facteur κ . L'énergie de répulsion, fonction décroissante de H_0 , diminuera donc d'autant plus vite que la force ionique augmentera, alors que l'énergie d'attraction est indépendante de ces conditions et manifestera, pour un type de particule donné, toujours la même variation en fonction de H_0 . Dès lors, les courbes d'énergie d'interaction entre deux particules, calculées arbitrairement par la formule (3) pour différentes conditions ioniques, peuvent présenter trois aspects bien particuliers tels qu'on peut les voir sur la Fig. 1.

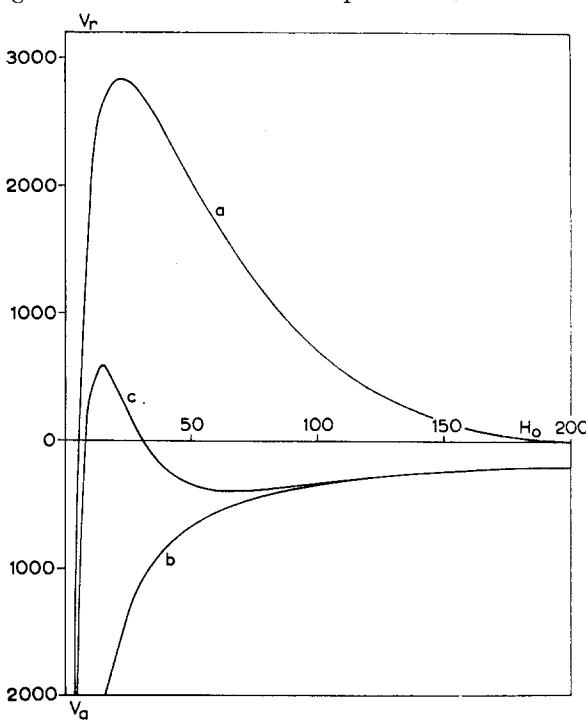


Fig. 1. Energie potentielle d'interaction entre les bacilles F6R en présence du cation Mg^{++} à différentes concentrations. courbe a: $[Mg^{++}] = 10^{-3} M$; courbe b: $[Mg^{++}] = 5 \cdot 10^{-1} M$; courbe c: $[Mg^{++}] = 10^{-2} M$. Ces trois concentrations correspondent à trois aspects typiquement différents des courbes d'énergie d'interaction (voir texte). En abscisses: distance entre les germes en angströms. En ordonnée: énergie potentielle d'interaction. La répulsion a été comptée positivement à partir de l'origine, l'attraction, négativement. Une unité de l'ordonnée vaut 10^{-14} erg.

L'analyse de ces trois aspects conduit aux conclusions suivantes:

(a) Premier cas (Fig. 1, courbe a): faible force ionique, l'énergie de répulsion est toujours supérieure à l'énergie d'attraction et les particules se repoussent. Aucune flocculation ne peut donc avoir lieu.

(b) Deuxième cas (Fig. 1, courbe b): force ionique élevée, l'énergie de répulsion fortement réduite par la haute valeur du facteur κ , est toujours inférieure, en valeur absolue, à l'énergie d'attraction de sorte que cette dernière prédomine fortement à toute distance et conduit à l'agglomération des particules. A l'échelle macroscopique, cette agglomération se traduit par la flocculation de la suspension. Nous proposons de désigner ce phénomène sous le nom de flocculation primaire pour le distinguer du troisième cas envisagé maintenant.

(c) Troisième cas (Fig. 1, courbe c): force ionique intermédiaire entre celles des deux premiers cas. Comme les énergies d'attraction et de répulsion varient suivant des lois complètement différentes, on obtient une courbe complexe qui présente les caractéristiques suivantes: pour une faible distance entre les particules (quelques angströms) l'attraction, comme dans les deux cas précédents, prédomine fortement; à une distance plus grande (15 Å dans le cas présent) on observe un maximum dans

le sens de la répulsion. Si ce maximum est suffisamment élevé (supérieur à 10 kT) les particules ne pourront franchir cette barrière de potentiel et tout contact entre elles est, par le fait même, impossible. Enfin, à une distance encore plus grande (70 \AA) existe un minimum correspondant à une certaine énergie d'attraction. Si ce minimum est suffisamment prononcé, les particules s'aggloméreront, sans, toutefois, entrer réellement en contact si la barrière de répulsion est suffisamment élevée. Dans ces conditions, on observera une flocculation d'un type particulier que nous proposons d'appeler flocculation secondaire. La flocculation secondaire différera sensiblement de la flocculation primaire en ce qu'elle sera beaucoup plus aisément réversible que cette dernière et pourra, par exemple, être redissociée par simple agitation dans le cas de particules assez grosses (de l'ordre du micron). La flocculation secondaire nécessitera également un temps plus long pour se produire.

Ces dernières caractéristiques sont précisément celles que manifestent les suspensions de bactéries R et, dès lors, nous nous sommes demandés si le minimum dans la courbe des énergies d'interaction, tel que le fait apparaître la théorie de VERWEY ET OVERBEEK, était susceptible d'expliquer le comportement des germes R vis à vis des électrolytes. Le problème présentait, de plus, un certain intérêt théorique, relativement peu de preuves expérimentales de l'existence de ce minimum ayant été données jusqu'à présent.

En se basant sur la théorie de VERWEY ET OVERBEEK et en admettant, de plus, que la flocculation des germes R puisse être attribuée à la flocculation secondaire, il est possible de prévoir les concentrations en différents électrolytes qui provoqueront la flocculation des suspensions de germes R.

Pour établir les courbes d'énergie d'interaction entre les bactéries aux diverses concentrations, il est nécessaire de se fixer, préalablement, un modèle pour la double couche entourant les germes. Nous avons admis le modèle de STERN⁸ qui semble plus proche de la réalité, surtout dans les solutions relativement concentrées (supérieures à $10^{-3} M$). L'adoption du modèle de STERN revient à remplacer le terme ψ_0 de l'équation (1) par le potentiel ψ_δ de STERN. Cette correction présente l'avantage de tenir compte d'une variation éventuelle du potentiel avec la concentration en sel, variation qui semble négligeable dans le cas qui nous intéresse, et, surtout, de tenir compte de l'abaissement considérable du potentiel en présence de cations bivalents. Le potentiel ψ_0 bactérien, déterminé principalement par la dissociation des groupes ionisables portés par la membrane cellulaire, restera indépendant des conditions ioniques du milieu ambiant alors que le potentiel ψ_δ sera, comme il est classique, notamment influencé par ces conditions et montrera un abaissement sensible avec l'augmentation de la charge des ions complémentaires. Bien que, d'une manière générale ils n'utilisent pas la correction de STERN dans leurs calculs, VERWEY ET OVERBEEK admettent cependant que son application conduit à des résultats plus exacts et donne une meilleure concordance entre les valeurs de flocculation prédictes théoriquement et celles trouvées expérimentalement³. De plus, le potentiel ψ_δ est défini comme étant celui régnant au point le plus extérieur de la couche d'ions adsorbée sur la particule, couche à laquelle on assigne une épaisseur du même ordre que le diamètre des ions. Par ailleurs, le potentiel ζ est défini comme étant le potentiel régnant au plan de glissement entre la particule et le liquide environnant. Ce plan est situé, lui-aussi, à quelques angströms de la surface particulaire. On peut donc, en première approximation, assimiler le potentiel ψ_δ de STERN au potentiel ζ des phénomènes électrocinétiques, ces

deux potentiels étant, si pas absolument identiques, au moins très voisins l'un de l'autre. Dans tous nos calculs, nous avons donc remplacé le potentiel ψ_0 de la formule (1) par les potentiels ζ déterminés expérimentalement à l'électrophorèse.

L'adoption du modèle de STERN permet, de plus, de prendre pour la constante de LONDON-VAN DER WAALS une valeur en bon accord avec celle que la théorie permet de prévoir. Nous avons admis pour cette constante la valeur de $5 \cdot 10^{-13}$ erg. Elle est proche de celle de $6 \cdot 10^{-13}$ erg calculée par VERWEY ET OVERBEEK³ pour les molécules d'eau au moyen des formules théoriques de SLATER ET KIRKWOOD⁹. Il est difficile de déterminer la valeur exacte de la constante d'attraction, celle que nous lui assignons est non seulement en bon accord avec les quelques déterminations théoriques qui peuvent en être faites mais se trouve précisément aussi être la moyenne géométrique des valeurs extrêmes que l'expérience conduit à lui attribuer.

D'après les considérations précédentes, les courbes d'énergie d'interaction entre les germes ont été calculées pour différentes concentrations de maléates de cations mono- et bivalents.

Dans ces calculs, nous avons admis comme valeur moyenne du potentiel ζ le chiffre de 103 mV en présence de cations monovalents et celui de 50 mV en présence de cations bivalents. De plus, nous avons supposé que les bactéries se comportaient comme des sphères dont la valeur calculée du rayon équivalent est de $0,8 \mu$ et supposé, enfin, que le potentiel ζ restait constant en dépit des variations de concentration. Précédemment², nous avons pu montrer la validité expérimentale de cette dernière hypothèse, du moins en première approximation.

Les courbes ainsi établies sont celles des Fig. 2, pour les cations monovalents et 3 pour les cations bivalents. Comme on le voit toutes ces courbes appartiennent à une même famille et possèdent la même enveloppe. Cette enveloppe correspond à l'énergie d'attraction créée par les forces de LONDON-VAN DER WAALS seules.

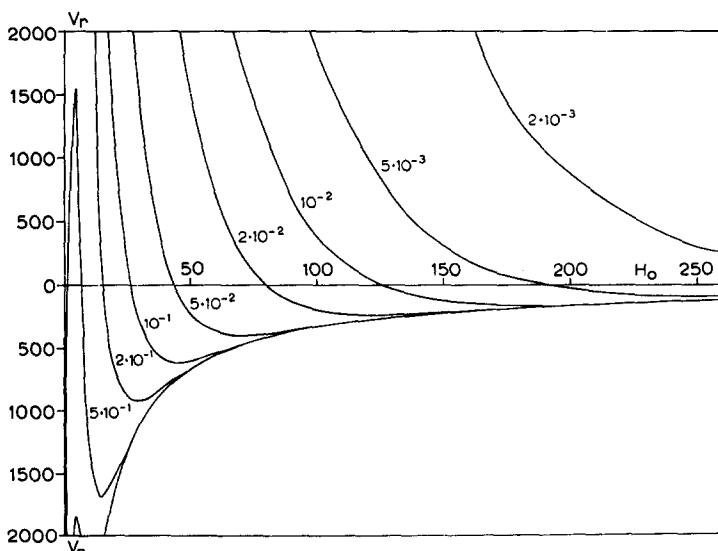


Fig. 2. Énergie d'interaction entre les germes R pour différentes concentrations en ions monovalents. Les différentes concentrations sont indiquées sur les courbes. Les unités sont identiques à celles de la Fig. 1.

Si l'on considère les courbes de la Fig. 2, on voit qu'un minimum assez marqué apparaît pour une concentration en cations monovalents de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2}$ à $10^{-1} M$. Si la flocculation des germes R peut être du type secondaire, on doit donc s'attendre à l'observer dans cette zone de concentration bien qu'une barrière de potentiel, infranchissable jusqu'à la concentration de $0.5 M$, empêche les bactéries d'entrer réellement en contact. On voit également que la zone prévisible où s'observera cette flocculation secondaire s'étend de la concentration $5 \cdot 10^{-2} M$ à $5 \cdot 10^{-1} M$. Aux concentrations supérieures à cette dernière valeur doit avoir lieu la flocculation primaire, caractérisée par le fait qu'elle apparaîtra plus rapidement et sera beaucoup plus difficile à dissocier.

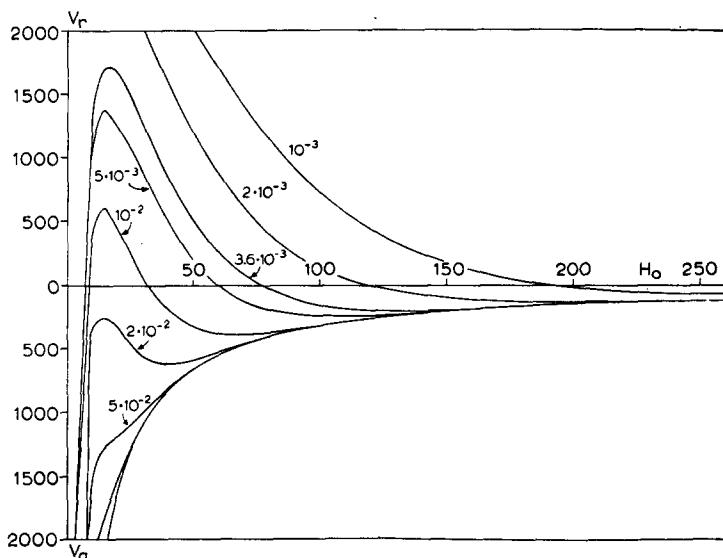


Fig. 3. Énergie d'interaction entre les germes R pour différentes concentrations en ions bivalents. Les différentes concentrations sont indiquées sur les courbes. Les unités sont identiques à celles de la Fig. 1.

Si l'on considère la famille de courbes de la Fig. 3 (cations bivalents), on voit immédiatement que, bien que l'allure générale du phénomène demeure la même, la zone de concentrations où peut avoir lieu la flocculation secondaire est beaucoup plus restreinte et ne s'étend que de $5 \cdot 10^{-3} M$ à $10^{-2} M$. En deçà de cette zone, le minimum n'est pas assez prononcé, au delà aura lieu la flocculation primaire. Ce fait est uniquement dû à l'abaissement considérable du potentiel ζ par les ions bivalents. Il faut également remarquer que les flocculations secondaires échappent à la règle de SCHULTZE ET HARDY puisque nous voyons qu'elles ont lieu pour une concentration en ions bivalents environ dix fois plus faible qu'en ions monovalents au lieu de 64 fois comme la règle de SCHULTZE ET HARDY permettrait de le prévoir.

Ces prévisions théoriques une fois établies, nous avons cherché à en vérifier expérimentalement le bien fondé en déterminant les valeurs des concentrations cationiques auxquelles floculent une série de germes possédant le caractère R.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel et méthodes

Souches bactériennes. Les souches que nous avons utilisées appartiennent aux groupes *E. coli* et *Shigella* et possèdent le caractère R. Ce sont les souches: coliphage R, SHPB, F6R, Y6R et une souche de *E. coli* φ S cultivée en dessous de 20° et présentant par conséquent le caractère R phénotypique⁶. Ces souches ont été cultivées sur gélose ordinaire, remises en suspension dans l'eau distillée au moment de l'emploi et lavées une fois à l'eau distillée avant d'être remises en suspension dans le milieu à tester.

Electrophorèse, mesures de conductivité, milieux de suspension. Ces méthodes ont été décrites précédemment^{1, 2}.

Mesure de la flocculation. Dans une série de petits tubes étroits, on introduit 0.8 ml du milieu ionique désiré (solution de maléate du cation métallique choisi) et 0.2 ml de germes lavés, en suspension dans l'eau distillée. La concentration ionique finale est calculée en tenant compte de cette dilution. Les tubes sont ensuite mélangés par un léger barbotage d'air et abandonnés de 15 à 20 h à la température ordinaire. Après ce temps, tout le liquide est décanté à la pipette et les culots remis en suspension dans 10 ml d'eau distillée. La lumière diffusée par ces dernières suspensions est mesurée au néphélosmètre COLEMAN et donne une mesure directe de la proportion de germes floclés auxquels s'ajoutent ceux, beaucoup moins nombreux, ayant déposé sous l'action de la gravité. Cette dernière valeur est mesurée au néphélosmètre sur un blanc constitué d'une suspension de germes dans l'eau distillée traitée exactement comme les suspensions en milieu ionique. La valeur de ce blanc est déduite des lectures effectuées sur les suspensions en expérience.

La méthode est assez peu précise sur le plan quantitatif mais nous ne cherchons pas tant à déterminer le nombre exact de germes déposés qu'à mettre en évidence, par un critère objectif, la flocculation elle-même. Tous les résultats ont été calculés en pourcentage de la densité optique correspondant à une flocculation totale.

Il est à remarquer que les chiffres ainsi obtenus n'ont pas une signification absolue puisqu'ils dépendent évidemment du temps. Tout au plus peut-on considérer que, après un temps donné, les valeurs obtenues sont proportionnelles à la grosseur des flocons qui se sont formés et, par conséquent, à la profondeur du minimum de la courbe d'énergie d'interaction.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Résultats d'*electrophorèse*

La plupart de ces résultats ont été publiés précédemment ainsi que la méthode utilisée pour calculer le potentiel ζ^2 . Nous résumons ici, au Tableau I, les valeurs de potentiel trouvées dans différentes conditions ioniques pour les différents germes étudiés.

Comme on peut le voir dans ce tableau, tous les germes R possèdent sensiblement le même potentiel dans les mêmes conditions ioniques et, d'autre part, aux erreurs

TABLEAU I
POTENTIEL ζ DES DIFFÉRENTES BACTÉRIES DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

Milieu	F6R	Germes				
		Coliphage R phénotyp.	Coliphage R génotyp.	SHPB	Y6R	F6S
Na ⁺						
2 · 10 ⁻² M	96.8	123.6	92.1	101.2	103	47.7
K ⁺						
2 · 10 ⁻² M	101.2	—	93.7	112.7	—	36.9
Ca ⁺⁺						
2 · 10 ⁻³ M	48	44.3	49.3	49	63	27.4
Mg ⁺⁺						
2 · 10 ⁻³ M	49.4	—	48.8	48.6	—	24.7

Toutes ces valeurs sont exprimées en mV; elles ont été déterminées à 23° C, à pH 7.3 dans des tampons au maléate. Les valeurs de potentiel du F6S sont données à titre de comparaison.

TABLEAU II

FLOCULATION DES GERMES R POUR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ION Na⁺

[Na ⁺]	F6R	Coli φR phénotyp.	Coli φR génotyp.	SHPB	Y6R
2 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
5 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
10 ⁻² M	0	0	0	0	0
2 · 10 ⁻² M	0	0	0	0	0
5 · 10 ⁻² M	54	0	0	0	0
10 ⁻¹ M	95	0	23	4.5	0
2 · 10 ⁻¹ M	99	102	83	30	0
5 · 10 ⁻¹ M	100	98	98	84	70
1 M	—	—	—	100	100

TABLEAU III

FLOCULATION DES GERMES R POUR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ION K⁺

K ⁺	F6R	Coli φR phénotyp.	Coli φR génotyp.	SHPB	Y6R
2 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
5 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
10 ⁻² M	0	0	0	0	0
2 · 10 ⁻² M	15	0	0	0	0
5 · 10 ⁻² M	110	0	38	38	0
10 ⁻¹ M	106	112	96	44	0
2 · 10 ⁻¹ M	95	118	129	104	124
5 · 10 ⁻¹ M	95	80	88	84	100
1 M	100	88	85	102	42

TABLEAU IV

FLOCULATION DES GERMES R POUR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ION Ca⁺⁺

Ca ⁺⁺	F6R	Coli φR phénotyp.	Coli φR génotyp.	SHPB	Y6R
10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
2 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
5 · 10 ⁻³ M	40	0	2	0	0
10 ⁻² M	66	94	60	13	54
2 · 10 ⁻² M	97	97	100	100	102
5 · 10 ⁻² M	98	100	119	95	98
10 ⁻¹ M	95	101	97	94	97

TABLEAU V

FLOCULATION DES GERMES R POUR DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ION Mg⁺⁺

Mg ⁺⁺	F6R	Coli φR phénotyp.	Coli φR génotyp.	SHPB	Y6R
10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
2 · 10 ⁻³ M	0	0	0	0	0
5 · 10 ⁻³ M	93	0	0	0	0
10 ⁻² M	105	76	64	0	6
2 · 10 ⁻² M	103	102	87	100	90
5 · 10 ⁻² M	90	93	96	100	94
10 ⁻¹ M	102	98	98	103	100

expérimentales près, le potentiel ζ est approximativement le double, en présence d'ions monovalents, de ce qu'il est en présence d'ions bivalents.

A partir des valeurs du Tableau I on peut calculer que la valeur moyenne du potentiel ζ des germes R est de 103 mV en moyenne, en présence de cations monovalents et d'environ 50 mV en présence de cations bivalents. C'est à partir de ces valeurs moyennes qu'ont été établies les courbes des Figs. 2 et 3 d'après lesquelles nous avons prédict les zones de flocculation.

II. Détermination expérimentale de la flocculation en fonction de la concentration

Nous avons réalisé des suspensions des différents germes dans des solutions de malates de concentrations croissant suivant une progression approximativement géométrique et exprimé le pourcentage de germes floclés après 15 à 20 h suivant la technique décrite plus haut. Les résultats, pour les différents germes et les différents cations sont résumés aux Tableaux II à V. Sur ces tableaux ont été soulignées les valeurs pour lesquelles la flocculation apparaît au cours de la première demi-heure. Il faut remarquer que la distinction expérimentale entre flocculation primaire et flocculation secondaire est assez délicate. En effet, l'augmentation de la force ionique entraîne l'apparition d'un minimum de plus en plus profond dans l'énergie d'interaction, conduisant à une flocculation secondaire de plus en plus rapide, jusqu'au moment où la barrière de potentiel est suffisamment abaissée pour permettre la flocculation primaire. Une flocculation en moins d'une demi-heure dans nos expériences indique donc simplement une présomption de flocculation primaire et non une certitude. En fait, la flocculation primaire ne peut avoir lieu qu'à des concentrations ioniques sensiblement plus élevées que celles rencontrées dans les conditions physiologiques usuelles. Il semble donc hors de doute que la flocculation des germes R dans les conditions salines physiologiques puisse être attribuée au minimum secondaire.

Si l'on considère les Tableaux II et III, relatifs aux ions monovalents, on s'aperçoit immédiatement que, sauf pour Y6R, la flocculation débute dans la zone de concentration prévue par la théorie, avec, pour chaque germe, des fluctuations individuelles. Il en va de même pour les résultats résumés aux Tableaux IV et V pour les cations bivalents.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'examen des Tableaux II et III montre, comme nous venons de le signaler, que les suspensions d'Y6R floquent à des valeurs assez éloignées de celles prévues par la théorie. Nous bornant à considérer ici le phénomène dans ses grandes lignes, nous n'avons pas cherché à expliquer ce fait, pas plus que les petites fluctuations rencontrées parmi les différents autres germes. Il semble évident que les différences observées peuvent être expliquées par différents facteurs dont nous avons délibérément négligé le rôle: l'imprécision expérimentale dans la détermination du potentiel ζ , une certaine variation de ce potentiel avec la force ionique, des variations de taille entre les diverses espèces bactériennes utilisées et surtout l'élongation des cellules bactériennes que nous avons supposées sphériques pour une question de possibilité de calcul. En dépit de ces diverses approximations, il est assez remarquable d'observer une aussi bonne concordance entre les prévisions théoriques et l'expérience. Le comportement du coli φ R phénotypique, floquant, lui aussi à des concentrations supérieures à celles prévues

par la théorie, peut, par contre, être parfaitement expliqué par le potentiel ζ sensiblement plus élevé de ce germe. Rappelons, en effet, que nous avions fait nos prévisions théoriques à partir d'un potentiel de 103 mV alors que le coli φR phénotypique possède un potentiel ζ de 123 mV. Si l'on établit les courbes d'énergie d'interaction à partir de cette dernière valeur, on peut prédire la flocculation secondaire à partir d'une concentration cationique de 0.1 M. Cette dernière valeur est confirmée expérimentalement pour le potassium tandis qu'il faut atteindre la concentration de 0.2 M pour le sodium.

Au sujet des différences observées entre le sodium et le potassium, nous nous sommes demandés si l'explication ne résidait pas dans une différence dans les degrés de dissociation des deux maléates. Toutefois, des mesures de conductivité effectuées sur les solutions indiquent, aux erreurs d'expérience près, le même coefficient de dissociation pour ces deux sels, aux concentrations produisant la flocculation. Il doit donc s'agir d'un effet spécifique dont ne tient pas compte la théorie de VERWEY ET OVERBEEK qui ne fait intervenir les ions que par leur charge.

Les mêmes remarques peuvent être formulées pour les résultats résumés aux Tableaux IV et V (cations bivalents), mais ici encore, le comportement des germes R est, dans l'ensemble, conforme aux prévisions de la théorie.

Nous avons vu précédemment que, dans les cas limites, la distinction expérimentale entre flocculation primaire et flocculation secondaire n'est pas aisée. Dans les conditions éloignées de la zone limite, certaines différences fondamentales peuvent cependant être mises en évidence. Tout d'abord, la flocculation primaire se caractérise par le temps relativement court qu'elle met à se manifester (en général 20 à 30 min aux concentrations étudiées par nous). Ce fait est cohérent avec la durée du libre parcours moyen des germes si l'on admet que, dans ce cas, toutes les collisions conduisent à une agrégation irréversible. La flocculation secondaire, au contraire, exige plusieurs heures pour devenir apparente et ce temps dépend, dans une plus large mesure, des conditions ioniques. Une autre différence entre les deux phénomènes réside dans la plus ou moins grande facilité de resuspension des agrégats dans l'eau distillée. Cette répeptisation est extrêmement aisée pour les flocculats secondaires, fait en parfait accord avec la théorie puisque la remise des culots dans l'eau distillée revient à élargir rapidement une barrière de répulsion située entre les germes et, par conséquent, à séparer ces derniers. Au contraire, dans le cas de la flocculation primaire, les germes étant en contact, il subsiste toujours une forte attraction entre eux et la redispersion est beaucoup plus difficile. Nous avons pu vérifier expérimentalement ce dernier point. Des suspensions ayant floqué dans une concentration en ions Na⁺ de 1 M ou de 4 M, par exemple, ne peuvent être remises en suspension dans l'eau distillée qu'après une agitation longue et énergique alors qu'il suffit d'un simple mélange pour redisperser complètement les culots de germes floqués dans des solutions 0.1 ou 0.2 M.

Appliquée aux germes R, la théorie de VERWEY ET OVERBEEK permet également de rendre compte de la flocculation de ces bactéries dans les cultures en bouillon. En effet, des analyses de bouillon effectuées par spectrophotométrie de flamme permettent d'évaluer à 0.2 M la concentration totale de ce milieu en ions monovalents. Ce chiffre est d'ailleurs cohérent avec des mesures de conductivité effectuées sur le même bouillon. Il est facile de voir sur la Fig. 2 qu'à cette concentration existe un minimum bien accentué qui doit être responsable de la flocculation observée en bouillon. Cette dernière est d'ailleurs bien du type secondaire, lente à se manifester et facilement dissociée par agitation.

Signalons, enfin, le comportement absolument inattendu des germes S vis à vis des électrolytes. Les bactéries possédant le caractère S ont, en effet, un potentiel ζ moins élevé que les germes R. Nous avons pu, dans le cas du F6S, confirmer ce fait déjà signalé par MOYER pour le colibacille⁷. De cette propriété devrait, logiquement, découler une plus grande facilité à la flocculation, cette dernière devant se manifester à des concentrations de l'ordre de $10^{-2} M$ pour les cations monovalents. Or, on sait, qu'une des caractéristiques des germes S est précisément l'absence de flocculation sous l'influence des électrolytes. Nous avons d'ailleurs vérifié que des suspensions de F6S et de coli φS restaient parfaitement stables même à des concentrations de $5 M$ en NaCl et $1 M$ en CaCl₂. Par contre, des suspensions de F6S et de divers coli S sont précipitées par le sulfate d'ammonium saturé. Ces propriétés semblent conférer aux germes S les caractéristiques des colloïdes lyophiles, ce qui serait attribuable à la présence, à leur surface, des antigènes responsables du caractère S. Le rôle de ces antigènes dans le comportement anormal des germes S est démontré par le fait que le coli φS , cultivé en dessous de 20° , n'élabore pas d'antigène appartenant au groupe S ainsi que l'a montré BORDET⁸ et que, corrélativement, il se comporte phénotypiquement comme un germe R, sa flocculation par les électrolytes s'effectuant d'une manière conforme à la théorie de VERWEY ET OVERBEEK.

Rappelons qu'une anomalie semblable se présente dans le cas de la fixation du phage H-SHPB(Ca) sur les germes S sensibles, laquelle exige, pour s'effectuer, des concentrations ioniques beaucoup plus fortes que celles que la théorie de VERWEY ET OVERBEEK permet de prévoir. Nous avons, à ce moment, émis l'hypothèse que les antigènes associés au caractère S devaient être responsables des anomalies observées en créant un obstacle à la fixation du phage².

En conclusion, nous pouvons affirmer que le comportement des germes R, en présence d'électrolytes, est conforme aux prévisions que permet de faire la théorie de VERWEY ET OVERBEEK. La flocculation des suspensions de germes R peut être qualifiée de flocculation secondaire et son existence apporte une preuve expérimentale supplémentaire de la réalité physique du minimum à grande distance prévu par les précédents auteurs. La flocculation spontanée des germes R peut donc être expliquée à partir de données purement physiques, le potentiel ζ , entre autre, indépendamment de la nature chimique des constituants cellulaires superficiels responsables de ce potentiel. Cette explication présente l'avantage de revêtir un caractère plus général que celles proposées antérieurement.

RÉSUMÉ

La théorie de stabilité des colloïdes de VERWEY ET OVERBEEK permet de rendre compte de la flocculation spontanée des germes R en présence d'électrolytes, et ce, uniquement à partir du potentiel ζ de ces germes. Cette étude apporte, corrélativement, une preuve expérimentale supplémentaire du minimum à longue distance dans la courbe des énergies d'interaction entre les germes. Les germes S, par contre, ont, vis à vis des mêmes électrolytes, un comportement diamétralement opposé à celui que la théorie permet de prévoir. Ce comportement anormal est rapproché des particularités présentées par les germes S au cours de la fixation du phage H-SHPB (Ca).

SUMMARY

The flocculating ability of R-bacteria as a function of electrolyte concentration can be fully explained with the aid of the VERWEY AND OVERBEEK theory of lyophobic colloids stability and

is based only on the ζ -potential of these bacteria. Our results also afford experimental evidence of the long-range minimum in the interaction energy curves. S-forms, on the other hand behave in a completely different way from that predicted by the theory. These abnormalities seem to be similar to those observed in the fixation of the H-SHPB (Ca) phage on the S-forms of the same bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BEUMER, M.-P. BEUMER-JOCHMANS ET J. DIRKX, *Ann. inst. Pasteur*, 93 (1957) 36.
- ² J. DIRKX, J. BEUMER ET M.-P. BEUMER-JOCHMANS, *Ann. inst. Pasteur*, 93 (1957) 168, 340.
- ³ E. J. W. VERWEY ET J. TH. G. OVERBEEK, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Publ. Co., Inc. Amsterdam, 1948.
- ⁴ R. J. DUBOS, *The Bacterial Cell*, Harvard Univ. Press, 1947, p. 54.
- ⁵ G. S. WILSON ET A. A. MILES, *Topley's and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, Edward Arnold Ltd. Londres, 1955, p. 354.
- ⁶ P. BORDET, *Bull. acad. roy. méd. Belg.* 6 (1941) 258.
- ⁷ L. S. MOYER, *J. Bacteriol.*, 32 (1936) 433.
- ⁸ O. STERN, *Z. Elektrochem.*, 30 (1924) 508.
- ⁹ J. C. SLATER ET J. G. KIRKWOOD, *Phys. Rev.*, 37 (1931) 397.

Reçu le 11 juin 1957

THE ACID MUCOPOLYSACCHARIDES OF EMBRYONIC SKIN

GERALD LOEWI* AND KARL MEYER

*Department of Medicine, Columbia University College of Physicians and Surgeons,
and Edward Daniels Faulkner Arthritis Clinic of the Presbyterian Hospital, New York, N.Y. (U.S.A.)*

The biological significance of the varied patterns of acid mucopolysaccharides occurring in connective tissue of different organs is still unknown. Various observations, as for example in scorbutic animals and in hypercorticism, of the failure of collagen fiber formation have been correlated with the failure of the production of sulfated mucopolysaccharides. On the basis of the occurrence of chondroitin sulfate B (ChS-B) in tissues containing coarse mature collagen bundles and its absence in organs containing only thin and immature collagen fibers, it was suggested that ChS-B might be causally connected with the production of the coarse type of collagen¹. The low concentration of ChS-B in pigskin of embryos at term has been reported². In continuation of such studies, the polysaccharide pattern of skin of various stages of embryonic development has been investigated.

EXPERIMENTAL

Embryo pigs, obtained fresh from the slaughterhouse, were rapidly skinned in the cold. The skins were divided into three groups, according to embryonic age, as estimated by measurement of crown-to-rump length. The skins were processed in a meat grinder.

The analytical procedures have been given elsewhere^{3,4}. Digestion with pepsin and trypsin was used throughout this work. The procedures for removal of nitrogenous contaminants and for the separation of the mucopolysaccharide fractions from each other were also similar to those

* Fellow of the Empire Rheumatism Council, London.

Supported in part by U.S. Public Health Grant A-570.