

depressorische Wirkung auf die Mitosen der Granulozytopoese schwankten noch im Bereiche der Fehlergrenzen. Beim *Kaninchen* konnte mit täglich 1 g pro 4 kg auch nach einer während 92 Tagen fortgeführten Behandlung keine Veränderungen des Blutbildes hervorgerufen werden. *Zusammenfassend zeigt, also das Urethan in den therapeutisch angewandten Dosen außer einer depressorischen Wirkung auf die Lymphozyten keine deutliche Beeinflussung der normalen Leuko-, Erythro- oder Thrombopoese.*

Bei *chronisch-myeloischen Leukämien* zeigte das Knochenmark- (Myelogramm) und das Milzpunktat (Splenogramm) nach 30–40 Tagen Urethantherapie außer einer deutlichen Zunahme der Erythroblasten keine wesentlichen Veränderungen des weißen Zellbildes. Im besondern fällt im Vergleich zur Arsen- oder Röntgentherapie, wo es zu einer weitgehenden Verschiebung der unreifen weißen Zellreihe nach der reifen Seite hin kommt, beim Urethan das Weiterbestehen des leukämischen, d. h. nach der unreifen Seite hin verschobenen Zellbildes in Knochenmark und Milz auf. Das gleiche gilt auch für die chronisch lymphatischen Leukämien, bei denen die prozentualen Lymphozytenwerte in Milz und Knochenmark im Vergleich mit der starken Abnahme der Zellen im peripheren Blut prozentual relativ nur wenig zurückgehen. Dagegen nehmen auch hier die Erythroblasten deutlich zu. *Das Urethan zeigt also im Gegensatz zum Arsen keinen ausreifenden Einfluß auf die leukämische Zellreihe.*

Die Berechnung der prozentual vorkommenden Mitosen (Mitoseindex) ergab unter dem Einfluß des Urethans für die granulozytopoetische, leukämisch entgleiste Reihe einen Abfall der Mitosetätigkeit um über die Hälfte des früheren Wertes, während der Mitoseindex der Erythropoese auf das Doppelte empor-schnellte. *Die günstige Wirkung des Urethans bei chronisch-leukämischen Erkrankungen ist also, wie damit erstmals nachgewiesen wird, eine Folge der elektiven starken Drosselung der pathologisch entgleisten leukämischen Zellreihe, bei nur wenig oder fehlender depressorischer Wirkung auf die Zellteilung der normalen Blutzellen.*

Dieses Moment ist in Anbetracht der von HADDOW¹ in tierexperimentellen Untersuchungen gefundenen deutlichen Hemmung gewisser Tumoren wahrscheinlich ein weiterer Hinweis dafür, daß wir in den Leukämien eigentliche Neoplasien vor uns haben. In diesem Zusammenhang sei auf die Wichtigkeit dieser Befunde für die weitere Forschung nach ähnlichen Stoffen der therapeutischen Beeinflussung der Mitosetätigkeit der Malignome hingewiesen, indem hier erstmals eine Substanz vorliegt, die imstande ist, die Zellteilung neoplastisch entgleister Zellen in mehr oder weniger starkem Maße *elektiv* zu hemmen. Es ist vielleicht zu hoffen, daß es der weiteren Forschung gelingen wird, mit ähnlichen Stoffen auch bei anderen neoplastischen Erkrankungen eine chemotherapeutische Beeinflussbarkeit zu erzielen, wie dies klinisch schon von PATERSON mit dem Urethan bei gewissen Malignomen beobachtet werden konnte.

SVEN MOESCHLIN

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 22. Februar 1947.

Summary

Examinations of the blood and bone-marrow in healthy persons and patients with chronic leukemia have shown that the remarkable influence of urethane in

chronic leukemias is due to an elective inhibition of the karyokinesis of the leukemic "neoplastic" cells. On the other hand the mitosis of the normal blood-cells is influenced hardly, or not at all, with the same therapeutical doses. Contrary to arsenic, urethane does not cause any increased maturation of the immature leukemic cells. Therefore the cell formula in the bone-marrow and the spleen is very little changed except for a marked increase of the erythroblasts. The importance of this finding (elective inhibition of the karyokinesis) for further investigation in the treatment of neoplastic diseases is discussed.

La libération des deux acides nucléiques au cours de l'autolyse des bactéries et sa signification

Nous avons rapporté, ici même, que la culture d'un colibacille, dans le filtrat de culture d'un autre colibacille, peut parfois amener le premier germe à subir une mutation «dirigée» lui imposant les caractères antigéniques propres au second germe et nous avons montré que le principe inducteur en cause est l'acide désoxyribonucléique de ce second germe, considéré sous sa forme originelle hautement polymérisée¹. C'est à partir des bactéries mortes, toujours présentes en plus ou moins grand nombre dans les cultures, que se produit la libération de l'acide désoxyribonucléique, au cours de l'autolyse subie par les germes sous l'action de leurs propres enzymes. Une libération simultanée d'acide ribonucléique se produit (l'acide ribonucléique est inactif dans le processus des mutations dirigées). Toutefois, durant l'autolyse, les deux acides nucléiques tendent non seulement à se détacher, le premier du noyau bactérien, le second du cytoplasme bactérien, pour passer dans le milieu ambiant, mais aussi à subir des dépolymérisations et des décompositions chimiques plus ou moins poussées du fait des enzymes. On se trouve ainsi en présence de phénomènes complexes qui paraissent mériter une étude systématique.

Nous voudrions indiquer, ici, quelques premiers résultats concernant la mise en liberté, dans le milieu ambiant, des deux acides nucléiques, au cours de l'autolyse de diverses bactéries. Nous laisserons actuellement de côté, pour y revenir ultérieurement, l'état de polymérisation sous lequel se trouvent ces acides.

Voici la technique que nous avons adoptée pour la préparation des autolysats. Les bactéries, cultivées sur gélose pendant 20 heures à 37° C, sont recueillies et lavées au sérum physiologique. Après mise en suspension dans 10 fois leur poids de sérum physiologique, elles sont tuées par agitation avec du chloroforme, puis abandonnées à l'autolyse à 37° C pendant 2 jours. On élimine, par centrifugation, les débris bactériens et le liquide clair est additionné d'acide acétique jusqu'à précipitation maximum (p_H quelque peu variable d'une bactérie à l'autre, mais se situant généralement autour de 3,5–4,0). Une fraction nucléoprotéidique précipite², qu'on purifie par une série de redissolutions en milieu faiblement alcalin (p_H 8) et de reprécipitations acétiques. Finalement, on la lave à l'alcool, puis à l'éther et on la dessèche dans le vide. Le rendement en nucléoprotéide est très variable d'un germe à l'autre. L'ana-

¹ A. BOIVIN, A. DELAUNAY, R. VENDRELY et Y. LEHOULT, *Exper.* 1, 334 (1945); 2, 139 (1946). – A. BOIVIN et R. VENDRELY, *Exper.* 3, 32 (1947).

² Après cette précipitation acétique optimum, il ne reste que de petites quantités d'acide nucléique dans le liquide surnageant.

¹ HADDOW, *Nature* 157, 501 (1946).

lyse de la fraction nucléoprotéidique est alors pratiquée et comporte le dosage des matières minérales éventuellement présentes, de l'azote total, du phosphore total, des purines totales (par précipitation cuivreuse), du désoxyribose selon DISCHE (réaction à la diphénylamine) et du ribose selon BIAL-MEJBAUM (réaction à l'orcine). Cela permet de calculer la teneur en protéines, en acide nucléique total, en acide désoxyribonucléique et en acide ribonucléique. Les protéines représentent entre 70 et 80 pour 100 du produit et le bloc des deux acides nucléiques entre 20 et 30 pour 100. Nous nous sommes spécialement intéressé aux proportions relatives des deux formes d'acides nucléiques.

Parallèlement, nous avons analysé les corps bactériens non autolysés, pour déterminer leur teneur en acide désoxyribonucléique, en mettant en œuvre la technique indiquée antérieurement par nous¹. Enfin, et à titre comparatif, nous avons isolé, pour analyse, le bloc des deux acides nucléiques extrait des bactéries par une technique «à la soude» de type classique. Pour cela, les germes ont été tout d'abord traités pendant 3 heures par de l'acide trichloracétique N/4, afin d'en éliminer au maximum les matières glucidiques macromoléculaires (polysaccharides spécifiques libres des germes à «Gram positif», complexes antigéniques glucido-lipido-peptidiques des germes à «Gram négatif»), puis soumis à l'action de la soude N à 0° C, pendant une heure. Après neutralisation, puis acidification nette par l'acide acétique, on a centrifugé, pour séparer un liquide clair, qu'on a additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à virage au bleu du papier au rouge congo, puis de son propre volume d'alcool à 95° C, dans le but d'assurer la séparation de l'acide nucléique. Le produit a été recueilli par centrifugation, lavé à l'alcool, à l'éther, puis desséché dans le vide. A l'analyse, il apparaît comme renfermant entre 85 et 95 pour 100 d'acide nucléique.

Nous groupons, dans le tableau ci-dessous, les données que nous ont fournies diverses bactéries, en indiquant, dans chaque cas, le rapport de l'acide désoxyribonucléique à l'acide nucléique total.

Tableau I

Nom des germes	Rapport $\frac{\text{ac. désoxyribo}}{\text{ac. nucl. total}}$ dans:		
	les bactéries	la fraction nucléoprotéidique libérée par autolyse	l'acide nucléique total extrait à la soude
Staphylocoque (S. 72)	0,24	0,54	0,12
Colibacille (K ₂) . . .	0,30	0,69	0,21
Bacille typhique . .	0,29		0,15
Bacille pyocyanique .		0,64	

Ainsi, la technique à la soude, qui permet de retirer des bactéries la majeure partie de l'acide nucléique, fournit un mélange trop pauvre en acide désoxyribonucléique, par rapport aux germes totaux. Cela tient à la libération plus aisée de l'acide ribonucléique cytoplasmique et moins aisée de l'acide désoxyribonucléique nucléaire. Par contre, la technique par autolyse, qui ne livre jamais qu'une petite partie de l'acide nucléique

bactérien total, conduit à un mélange beaucoup plus riche en acide désoxyribonucléique que les germes originaux. Sans doute, est-ce l'effet de processus enzymatiques détruisant plus rapidement l'acide ribonucléique que l'acide désoxyribonucléique. Nous avons en cours des recherches destinées à suivre les phénomènes d'autolyse en fonction du temps et à voir dans quelle mesure la destruction des deux acides nucléiques peut être prévenue par des inhibiteurs enzymatiques divers (en particulier par le citrate de sodium, inhibiteur de la désoxyribonucléase d'après McCARTY¹) ou leur sortie favorisée par des teneurs diverses en électrolytes du milieu². Nous avons déjà retiré du Colibacille une ribonucléase, dont nous avons poussé assez loin la purification; nous reviendrons ultérieurement sur elle.

Quoiqu'il en soit, un fait apparaît en pleine lumière: la mise en liberté, dans le milieu ambiant, au cours de l'autolyse de diverses bactéries, de quantités notables d'acide désoxyribonucléique d'origine nucléaire et capable d'agir éventuellement sur les cultures des germes voisins pour les faire entrer en mutation dirigée.

La facile mobilisation de l'acide désoxyribonucléique bactérien, par autolyse, explique certaines constatations familières à ceux qui tentent de colorer les noyaux des bactéries. On sait comment ROBINOW³ a pu obtenir de magnifiques images des noyaux bactériens, en colorant les germes au Giemsa après action ménagée de l'acide chlorhydrique. Nous avons donné l'explication chimique du succès de cette technique⁴ et notre collègue TULASNE⁵ a retrouvé des noyaux chez plusieurs espèces bactériennes en utilisant la technique de ROBINOW légèrement modifiée. Or, il faut opérer sur des cultures toute jeunes (tout petit nombre d'heures) pour bien voir les noyaux. Dès qu'on s'adresse à des cultures de 24 heures, on ne rencontre que peu d'éléments montrant le gros noyau arrondi caractéristique. Pour une part, cela peut tenir au fait que les bactéries des cultures toute jeunes, encore en phase de latence préparatoire à la multiplication, sont de taille bien plus grande (2, 3, 4 ou 5 fois) que les bactéries en multiplication exponentielle ou que les bactéries en repos; cela facilite beaucoup la distinction du noyau et du cytoplasme. Mais pour une très large part, certainement, intervient cet autre fait que dans une culture de 24 heures beaucoup de germes (la grande majorité souvent) sont déjà morts et en voie d'autolyse et que par conséquent leur noyau a plus ou moins subi une désorganisation avec départ extracellulaire (ou au moins diffusion intracellulaire) de son constituant caractéristique, l'acide désoxyribonucléique. Il sera intéressant – nous avons amorcé l'étude de la question avec TULASNE – de voir dans quelle mesure la cytologie des bactéries peut permettre de déterminer la

¹ M. McCARTY, J. gen. Physiol. 29, 123 (1946).

² On sait comment A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER (p. ex. Biol. Symp. 10, 247 (1943) et Adv. Enzym. 3, 1 [1943]) sont parvenus à isoler des nucléoprotéides à base d'acide désoxyribonucléique à partir de tissus animaux, en recourant à CNa N. Appliquée directement au colibacille, la même technique – nous nous en sommes assuré – ne conduit à aucun résultat et A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER (J. gen. Physiol. 30, 117 (1946) viennent de s'en convaincre à leur tour. Quant aux petites quantités de désoxyribonucléoprotéide obtenues par ces auteurs, à partir des pneumocoques, elles proviennent probablement d'une simple autolyse de ces germes, si sensibles à l'autodésintégration enzymatique.

³ C. F. ROBINOW, Proc. Roy. Soc. London B 130, 299 (1942); J. Hyg. 43, 413 (1944); Addendum, par ROBINOW, au livre de DUBOS: The bacterial Cell (1 vol., 1945).

⁴ R. VENDRELY et J. LIPARDY, C. r. Acad. Sci. 223, 342 (1946).

⁵ R. TULASNE, C. r. Soc. Biol., sous presse (1947). – R. TULASNE et R. VENDRELY, C. r. Soc. Biol., sous presse (1947).

¹ R. VENDRELY et Y. LEHOULT, C. r. Acad. Sci. 222, 1357 (1946). – R. VENDRELY, Bull. Soc. Chim. biol. 1946 (sous presse) (Communication au Congrès de Chim. biol. de Liège, 1946).

proportion de germes encore vivants¹ et de substituer, au moins de façon approximative, une rapide coloration sur lame à la laborieuse numération des microbes vivants par les procédés usuels.

R. VENDRELY

Institut de chimie biologique de la Faculté de médecine de Strasbourg, le 28 février 1947.

Summary

The existence of a process of directed mutation for a *Bacterium coli* through the action of the desoxyribonucleic acid released by another *Bacterium coli* during its autolysis raises the question of the behavior of the two sorts of nucleic acids during the autolytic desintegration of the bacterial cell. Working with several germs, we have seen that autolysis releases a nucleoproteidic fraction containing from 20 to 30 per cent of nucleic acid. The desoxyribonucleic acid represents 50 to 70 per cent of the total nucleic acid; this value is very much higher than that of the initial germs, which contain but 20 to 30 per cent. The signification of the easy mobilization of the desoxyribonucleic acid by autolysis is discussed, according to the observations made in using ROBINOW's method of nuclear staining.

¹ Dans le cas spécial des levures *S. STRUGGER* (Flora 37, 73 [1943]) a déjà montré que l'emploi de certains colorants acridiniques permet de distinguer aisément cellules vivantes et cellules mortes.

Essais de solubilisation et de détoxification de la Tyrothricine

La Tyrothricine¹ est un antibiotique extrait du *Bacillus brevis* par DUBOS². Cet extrait s'oppose au développement de micro-organismes gram-positifs, *in vivo* et *in vitro*, et agirait à la façon d'un principe toxique plutôt que comme une enzyme. La Tyrothricine est un mélange de deux composants, actifs séparément, la gramicidine et la tyrocidine, obtenables sous forme cristalline. En général, à côté d'autres substances inactives, la gramicidine et la tyrocidine représentent respectivement 20 % et 50 % du poids total de la Tyrothricine totale. Ces substances peuvent être séparées et cristallisées en utilisant le fait que le chlorhydrate de la tyrocidine est beaucoup moins soluble dans l'éther que la gramicidine.

La Tyrothricine, la tyrocidine et la gramicidine – cette dernière beaucoup moins cependant – donnent dans l'eau distillée exempte d'électrolytes, de très stables solutions colloïdales. La gramicidine et, tout spécialement, la tyrocidine, se comportent comme des substances modifiant la tension superficielle. Cette propriété de la tyrocidine permet à la gramicidine de se maintenir d'une façon stable en solution colloïdale. Elle explique également l'action biologique de la tyrocidine: au point de vue physico-chimique, la substance se comporte comme un détergent cationique et possède les propriétés toxiques de ce genre de composé. Dans toutes les applications de la gramicidine, cette substance a été employée sous

forme de Tyrothricine, c'est-à-dire en association avec la tyrocidine,

1° parce que la présence de tyrocidine dans le mélange augmente la stabilité de la solution colloïdale de gramicidine;

2° parce que la tyrocidine possède, par elle-même, une certaine activité *in vivo*, même contre les gram-négatifs;

3° parce que la Tyrothricine pourrait contenir des substances actives autres que la gramicidine et la tyrocidine, substances que la purification de l'extrait pourrait enlever.

La Tyrothricine ne peut être injectée en raison de son action hémolytique et de son action toxique sur les globules blancs. A l'heure actuelle, son emploi est limité aux infections localisées, accessibles à l'irrigation ou à l'application directe. Son emploi par injection serait intéressant à deux points de vue: le prix de la Tyrothricine est très inférieur à celui de la Pénicilline et son action n'est pas limitée par les conditions de conservation requises pour la Pénicilline.

Ceci étant, il nous a paru intéressant d'éprouver la possibilité d'employer, sous certaines conditions, la Tyrothricine en injection. Pour cela:

1° la suspension colloïdale n'était pas souhaitable et

2° l'action toxique sur les globules sanguins devait être annihilée.

Il semblerait que ce double but peut être atteint en un temps. Les solutions obtenues sont d'une limpidité parfaite et l'action toxique sur les érythrocytes et les polynucléaires suspendus dans du Ringer glucosé contenant 100 γ par cm³ de Tyrothricine traitée se révèle nulle. – D'autre part, la Tyrothricine ainsi traitée maintient *in vitro*, aux mêmes dilutions, la même action antibiotique que la Tyrothricine native. Il en est de même pour l'injection intrapéritonéale, chez la souris, contre plusieurs doses léthales de pneumocoques. Les essais en injection dans la circulation sont en cours.

Les souris injectées sous la peau avec la Tyrothricine pure perdent, à l'endroit de l'injection et parfois à d'autres places, leurs poils sur une surface d'environ 1,5 cm². La peau est à nu sans irritation visible. – Les souris traitées à la Tyrothricine formolée n'offrent pas cette particularité.

Nous relatons dans le protocole ci-après, le mode opératoire et le résultat obtenu qui nous ont permis de faire état des épreuves positives relatées ci-haut.

L'activité antibactérienne de la tyrocidine est inactivée par les protéines sériques. Au contraire, celle de la gramicidine est exaltée par l'addition au milieu-test de 1 % d'albumine sérique. Le milieu de culture fut donc le suivant: Peptone 1 %, Na₂HPO₄ 1,5 %, Glucose 0,5 % (filtré Seitz), Albumine sérique 1 % (filtré Seitz).

On dissout les deux premières substances dans l'eau distillée, on ajuste à p_H 7, on autoclave à 120°, 20'. A 80 cm³ de milieu, on ajoute 20 cm³ de solution d'albumine sérique à 5 % (Bovine Plasma-fraction F. Armour, Chicago) et 10 cm³ de glucose à 5 %. On inocule avec 1 cm³ de culture de 12 h. On répartit stérilement par 5 cm³ dans des tubes contenant 0,1 cm³ des différentes dilutions de la solution-mère de Tyrothricine, à 2 % dans l'alcool, dans l'eau distillée.

L'activité d'une bonne Tyrothricine descend généralement à 0,1 à 0,2 γ par cm³.

*

E. HERRELL, Penicillin and other antibiotic Agents. W. B. Saunders Cy., Philadelphia and London, 1946.

¹ J. HENDERSON, The Statue of Tyrothricin as an Antibiotic Agent for Topical Application, J. Am. Pharmac. Ass. 35, 141 (1946).

² J. DUBOS and R. D. HORCHKISS, Origin, Nature and Properties of Gramicidin and Tyrocidin, Trans. a. Stud. College Phys. Philadelphia, 4 Ser., 10, 11 (1942).