

## Oxydations microbiennes des stéroïdes

Par CARLO ARNAUDI<sup>1</sup>, Milan

La notable diffusion du cholestérol dans les tissus des végétaux et des animaux, ainsi que ses rapports avec des substances importantes (telles que les acides biliaires, la vitamine D et quelques hormones – entre autres le corticostérone et surtout les hormones sexuelles) ont posé depuis longtemps le problème des modalités de sa synthèse, de son évolution chimique et de sa décomposition.

Nos connaissances à ce sujet sont toutefois très lacunaires. Cela tient en partie au fait que l'étude des transformations et dégradations enzymatiques du cholestérol, qui nous intéressent ici plus spécialement, est rendue particulièrement difficile par l'insolubilité presque totale du cholestérol dans l'eau.

Alors qu'une faible hydrolyse transforme les graisses dans des composés plus ou moins hydrosolubles, la dégradation du cholestérol implique l'intervention, bien plus énergique, d'enzymes oxydo-réducteurs. Il faut rappeler encore que les suspensions pseudo-colloïdales qu'on obtient avec le cholestérol sont douées d'activité bathotone et il est en outre bien connu (KOPACZEWSKY, FROBISER, ARNAUDI, KOPACZEWSKY et ROSNOWSKY<sup>2</sup>, LASSEUR et collaborateurs<sup>3</sup>) que le développement des microbes est arrêté dans les liquides de culture dont la tension superficielle est tombée jusqu'à une limite qui varie d'espèce à espèce et qui se trouve être entre 30,6 et 50 dine/cm<sup>2</sup>.

C'est peut être à cette propriété physique qu'il faut attribuer, tout au moins en partie, la relative résistance du cholestérol à l'attaque microbienne, d'où résulte l'opinion, assez répandue, que cette substance est à peu près inattaquable par les microorganismes. De plus, certains auteurs admettent que le cholestérol peut exercer quelques fois une activité antibactérienne. RABB<sup>4</sup> admet en effet que le cholestérol, l'ergostérol et la vitamine D, ayant en commun le noyau phénanthrénique, ont aussi en commun une activité antibactérienne, capable d'arrêter *in vivo* la multiplication des mycobactéries et d'empêcher le développement du *Staphylococcus aureus*, lorsque ces substances sont introduites dans le milieu de culture.

E. W. SQUIRE et E. N. SQUIRE<sup>1</sup> reprenant et approfondissant la question, ont recherché l'effet de plusieurs stéroïdes (bicholestéryle, chlorure et bromure de cholestéryle, cholestéryle-p-toluène, 5-cholestène, 3,5-cholestadiène, cholestérol) sur *Streptococcus lactis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Alcaligenes faecalis*, *Aërobacter aërogenes*, *Escherichia coli*, *Eberthella typhosa*, *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella paradysenteriae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*. Les résultats de ces auteurs conduiraient à la conclusion que le bicholestéryle n'exerce aucune action sur le développement des bactéries étudiées. Par contre, le chlorure et le bromure de cholestéryle inhiberaient le développement de *Klebsiella pneumoniae* et de *Streptococcus lactis*; le cholestéryle-p-toluène sulphonate et le 5-cholestène de même inhiberaient le *Streptococcus lactis*, le 3,5-cholestadiène inhiberait *Escherichia coli* et enfin, le cholestérol inhiberait *Aërobacter aërogenes*, *Shigella paradysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, tout en stimulant au contraire de *Alcaligenes faecalis* et *Salmonella schottmuelleri*.

Le fait est que jusqu'à il y a dix ans nous n'avions au sujet de l'utilisation du cholestérol par les microbes que les observations de SOEHNGEN<sup>2</sup>, effectuées sur les bactéries qui agissent sur les paraffines. En employant des cultures par agrandissement au moyen de milieux de culture contenant des hydrates de carbone, SOEHNGEN a isolé en effet des mycobactéries capables de se développer dans des milieux dont l'unique source de carbone était le cholestérol.

L'activité enzymatique des microorganismes est toutefois tellement multiple et douée souvent d'une spécificité si étroitement délimitée, qu'il est logique de présumer qu'il existe dans la nature des microbes aptes à exercer sur toutes les substances végétales et animales une activité biochimique tout à fait particulière.

C'est sur la base de cette conception et en considérant le sol agraire comme étant en fait le siège des phénomènes enzymatiques les plus divers, capables de causer la dégradation de toutes les substances organiques, que le Hollandais TAK<sup>3</sup> et l'Anglais TURFITT<sup>4</sup>, indépendamment l'un de l'autre et en même temps,

<sup>1</sup> Institut de Microbiologie générale, agricole et technique de l'Université de Milan.

<sup>2</sup> C. ARNAUDI, W. KOPACZEWSKI et M. ROSNOWSKI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, N. 5 (1927).

<sup>3</sup> PH. LASSEUR, P. VENIER, A. DUPAIX et L. GEORGES, Arch. Mikrobiol. 3, 5 (1932).

<sup>4</sup> W. RABB, Science 103, 670 (1946).

<sup>1</sup> E. W. SQUIRE et E. N. SQUIRE, J. Bact. 55, 766 (1948).

<sup>2</sup> N. L. SOEHNGEN, Cbl. Bakt., II. Abt., 1913.

<sup>3</sup> J. D. TAK, Ant. Leeuwenhoek J. Mikrobiol. Serol. 8, 32 (1942).

<sup>4</sup> G. E. TURFITT, J. Bact. 47, 487 (1944).

ont affronté entre 1942 et 1943 le problème de la décomposition microbienne du cholestérol dans le sol agraire.

Les recherches sur la sensibilité des stéroïdes à l'action des microorganismes datent toutefois de 1939. D'importants résultats ont été acquis depuis en étudiant les actions exercées par les microbes sur des substances dérivées du cholestérol, mais dépourvues de la chaîne latérale.

#### Oxydation des stéroïdes à action hormonale

La propriété qu'ont les stéroïdes et surtout le déhydroandrostérone d'être oxydés par les microorganismes et transformés en androstènedione a été démontrée pour la première fois en 1939 par MAMOLI, KOCH et TESCHEN<sup>1</sup>. Cette action a été attribuée à un microorganisme très petit dénommé d'abord *Corynebacterium helvolum*, mais classifié par la suite comme *Corynebacterium mediolanum*. Par étapes, il a été possible de démontrer (ARNAUDI, 1943<sup>2</sup>) que la culture employée par les auteurs susdits au cours de leurs oxydations n'était pas une culture pure, mais un mélange de différents microbes. Quelques uns, présentant de l'affinité entre eux, pouvaient se rattacher à l'espèce *Flavobacterium dehydrogenans*; d'autres possédaient des propriétés physiologiques analogues (pouvoir hydrolytique très limité, activité oxydante remarquable), mais ne pouvaient faire partie du genre *Flavobacterium* et, surtout, ils n'agissaient pas sur les stéroïdes, d'autres encore étaient des bactéries de contamination, dépourvues d'activité oxydante.

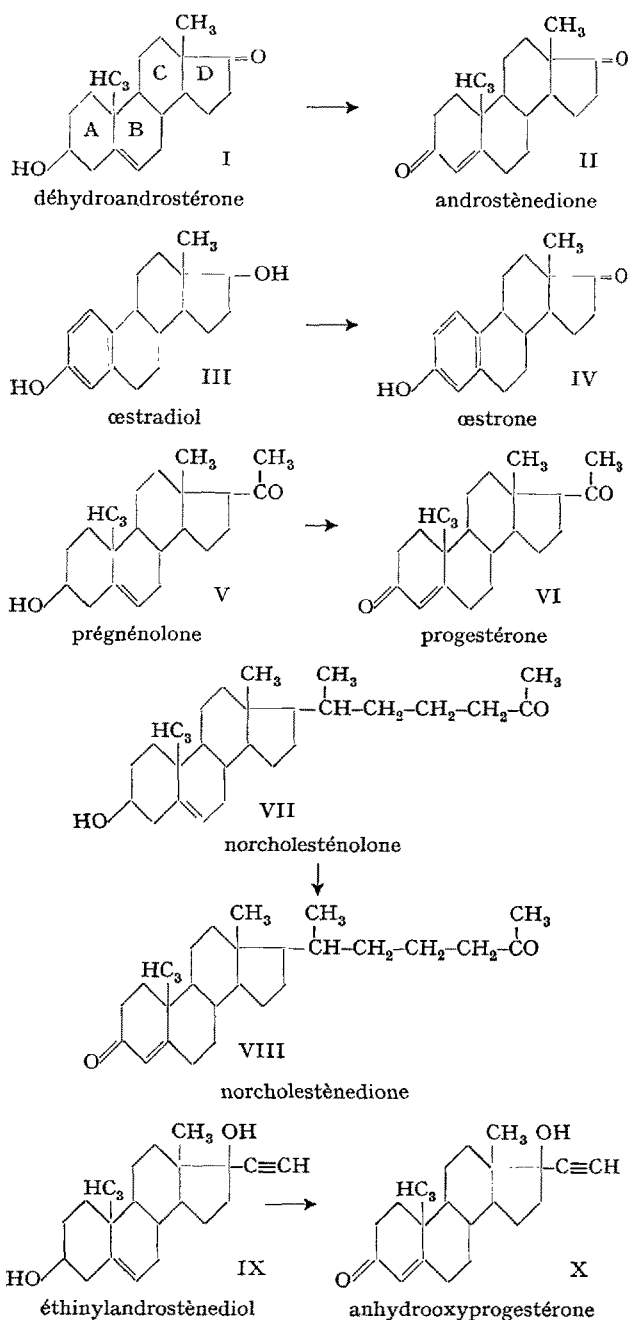
Au cours de la même année, ARNAUDI<sup>3</sup> isolait un microbe présentant en culture pure la même propriété oxydante; il le denomma d'abord *Micrococcus dehydrogenans* (1939), puis *Flavobacterium dehydrogenans*<sup>4</sup>. L'étude du pouvoir oxydant de ce microorganisme a été élargie et approfondie par A. ERCOLI<sup>5</sup>, qui a pu démontrer qu'il exerçait, comme on le verra plus loin, une activité oxydante notable sur plusieurs stéroïdes de la série des hormones sexuelles.

En 1941, ARNAUDI et ERCOLI<sup>6</sup> isolaient un autre microorganisme (déterminé par la suite comme *Bacterium steroidoclasium*), capable d'opérer une démolition profonde de la molécule des stéroïdes du groupe de l'androstène, c'est-à-dire le déhydroandrostérone et l'androstènedione, de sorte que dans les liquides de réaction, il ne restait plus aucune trace de produits à structure moléculaire polycyclique. Le même microorganisme est capable, au contraire, d'oxyder l'œstradiol en œstrone. Enfin, en 1944 MOLINA et ERCOLI<sup>7</sup> ont isolé deux autres flavobactéries: *Flavobacterium androsten-*

*dionicum* et *Flavobacterium carbolanicum*, qui exercent une activité de degré variable sur les stéroïdes employés dans ces essais.

#### Microorganismes oxydant les stéroïdes

1° *Flavobacterium dehydrogenans*. A. ERCOLI<sup>1</sup> a démontré que *Flavobacterium dehydrogenans* peut oxyder non seulement le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II), mais aussi l'œstradiol (III) en œstrone (IV); le prégnénolone (V) en progestérone (VI); le norcholesténolone (VII) en norcholestènedione (VIII); l'éthinylandrostènediol (IX) en anhydrooxyprogestérone (X) (prégnén-in-ol-one).



<sup>1</sup> L. MAMOLI, R. KOCH et H. TESCHEN, Naturwiss. 27, 319 (1939).

<sup>2</sup> C. ARNAUDI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese 21, 1 (1942).

<sup>3</sup> C. ARNAUDI, Boll. sez. ital. Soc. int. Microbiol. N. 10 a 12 (1939).

<sup>4</sup> C. ARNAUDI, Zbl. Bakt., II. Abt., 105, 352 (1942).

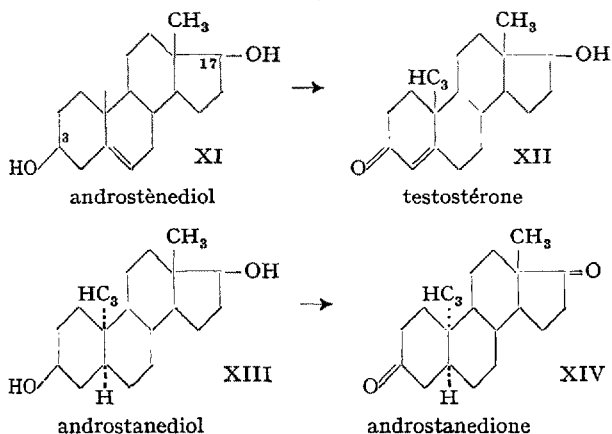
<sup>5</sup> A. ERCOLI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 270, 266 (1941).

<sup>6</sup> C. ARNAUDI et A. ERCOLI, Boll. Istit. Sierot. mil. 20, 137 (1941).

<sup>7</sup> L. MOLINA et A. ERCOLI, Boll. Istit. Sierot. mil. 23, 164 (1944).

<sup>1</sup> A. ERCOLI, Boll. sc. Facoltà Chim. ind. Bologna N. 10 (1940).

ERCOLI a mis encore en évidence une singulière propriété biochimique de *Flavobacterium dehydrogenans* au cours de l'oxydation de l'androstènediol (XI): un oxhydryle secondaire seulement, à savoir celui en position C<sub>3</sub>, est oxydé en groupe cétonique, tandis que celui en position 17 reste inaltéré; il s'en suit la formation de testostérone (XII). Si, par contre, l'on soumet à l'action du *Flavobacterium* le composé saturé correspondant: l'androstanediol (XIII), on obtiendra l'oxydation des deux oxhydryles en groupes cétoniques, avec formation d'androstanedione (XIV).



2° *Flavobacterium androstendionicum*. MOLINA et ERCOLI<sup>1</sup> ont démontré que *Flavobacterium androstendionicum* est capable d'oxyder le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II). Alors qu'il ne peut pas déshydrogéner de l'androstènediol (XI) en testostérone (XII) comme *Flavobacterium dehydrogenans*, il oxyde de l'androstanediol (XIII) en androstanedione (XIV). Ce microorganisme aurait donc un pouvoir oxydant moins spécifique mais plus prononcé de celui de *Flavobacterium dehydrogenans*.

3° *Flavobacterium carbolanicum*. *Flavobacterium carbolanicum* est capable de déshydrogéner le déhydroandrostérone (I) en androstènedione (II). Il serait doué toutefois d'un pouvoir oxydant intermédiaire entre celui de *Flavobacterium dehydrogenans* et celui de *Flavobacterium androstendionicum*. En effet, si l'on fait agir ce microbe sur l'androstènediol (XI), on constate la formation d'un mélange de testostérone (XII) et d'androstènedione (II). On aurait donc d'abord l'oxydation du groupe alcoolique secondaire en C<sub>3</sub> et ensuite une oxydation partielle de l'oxhydryle en C<sub>17</sub>.

4° *Bacterium steroidiclasium*. Le *Bacterium steroidiclasium* expliquerait une activité bien plus énergique. Il attaque la molécule du déhydroandrostérone (I) et celle de l'androstènedione (II) en les désagréant profondément: le produit qu'on peut récupérer des liquides après une oxydation de 15 jours, est identique à la substance de départ; il représente de 10 à 50% de

cette dernière. Il est impossible d'isoler d'autres composés ayant encore la structure polycyclique primitive. Le *Bacterium steroidiclasium* agit, au contraire, sur l'œstradiol (III) en le transformant complètement en œstrone (IV) avec un rendement de 35% à peu près. Le reste de la substance demeure inaltéré, tout au moins en grande partie.

#### Caractéristiques du genre *Flavobacterium*

Les propriétés du genre *Flavobacterium* Bergey (que cet auteur comprend dans la famille des *Bacteriaceae* Cohn) sont limitées. Elles résident essentiellement dans son aptitude à former un pigment jaune orange, dans son inactivité presque totale vis-à-vis des hydrates de carbone et dans le fait qu'il ne produit pas de gaz. Nous donnerons ici les caractéristiques de *Flavobacterium dehydrogenans* sur lequel nous possédons un grand nombre de données expérimentales, mais nous ne négligerons pas d'ajouter des indications sur les autres espèces employées au cours des recherches sur les bio-oxydations. Il nous faut toutefois remarquer dès l'abord que parmi les espèces contrôlées par nous, beaucoup se sont montrées difficilement colorables avec les couleurs d'aniline courantes et ont présenté une variabilité morphologique accentuée, en relation avec le milieu de culture et l'âge.

*Flavobacterium dehydrogenans* peut avoir l'aspect d'un cocco-bactérium ( $\mu$  0,375–0,50  $\times$  0,50–0,65) tout particulièrement dans les milieux de culture solides; dans les milieux de culture liquides, il peut présenter une longueur de 1–2  $\mu$ . Strictement aérobic. Gram-positif. Optimum de température 30–32°C. Inerte vis-à-vis du lait et de la gélatine, il ne fermente aucun des hydrates de carbone les plus communs. Il oxyde par contre assez énergiquement la glucose et la glycérine; d'une façon moins prononcée la saccharose, la galactose, la fructose, la maltose et aussi, quoique plus faiblement, l'arabinose. Le  $p_H$  optimum de développement est entre 6,8–7,1.

La pigmentation présente un intérêt tout particulier, *Flavobacterium dehydrogenans*, ainsi que tous les micro-organismes appartenant au genre *Flavobacterium* soumis à l'étude (*Flavobacterium maris*, *Flavobacterium flavotennae*, souches AR 1 et AR 3) se comporte comme un parachromophore typique (suivant la classification de BEIJERINCK), puisqu'il garde dans ses enveloppes capsulaires le pigment jaune citron qu'il élabore. A l'encontre de ce qui se présente chez la presque totalité des bactéries pigmentées, la chromogénèse ne s'opère chez lui qu'à la lumière diffuse. Dans l'obscurité, la multiplication ne présente aucune anomalie morphologique, mais les cultures – soit en milieux liquides, soit en milieux gélosés – restent dépourvues de pigment.

La nature du milieu de culture a une influence nette sur la chromogénèse: celle-ci n'a pas lieu dans les milieux nutritifs minéraux et se manifeste par contre sans

<sup>1</sup> L. MOLINA et A. ERCOLI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, 23, 164 (1944).

anomalies dans les milieux de culture gélosés, soumis pour des temps variables (jusqu'à 60') aux irradiations d'une lampe à vapeurs de mercure, placée à 30 cm de distance. Dans les mêmes milieux de culture des autres microorganismes, tels que le *Staphylococcus aureus*, non seulement ne se pigmentent pas mais n'ont même pas la possibilité de se multiplier régulièrement, à cause de l' $H_2O_2$  formé à la suite du traitement d'irradiation (comme l'a démontré DIEUDONNÉ depuis longtemps).

La résistance à l' $H_2O_2$ , qui, du reste, peut être élaboré par le *Flavobacterium dehydrogenans* lui-même, est très accentuée: en effet, ce microorganisme se multiplie encore en présence de 0,25 pour 1000 de  $H_2O_2$ , tandis que des doses de 0,04 pour 100 sont suffisantes pour arrêter la multiplication du *Staphylococcus aureus*.

La fonction du pigment au cours des processus d'oxydation déterminés par les flavobactéries est pour le moment tout à fait hypothétique. Tandis que la vitesse de multiplication ne paraît pas être influencée par le manque de lumière et par conséquent de pigment, les processus métaboliques en sont sûrement modifiés puisque l'abaissement du potentiel redox est plus intense dans l'obscurité (de  $rH_2$  25,70 à 22,60 à  $p_H = 6,9$ ) qu'à la lumière diffuse (de  $rH_2$  25,70 à 24,56 à  $p_H = 6,9$ ). Le pouvoir oxydant est lié lui aussi à la présence du pigment. Les cultures pigmentées manifestent un pouvoir respiratoire nettement supérieur à celui des cultures non pigmentées. La détermination manométrique suivant la méthode de Warburg démontre que les bactéries pigmentées métabolisent la glucose en alcool éthylique avec une intensité de 40 à 56 pour 100 plus élevée que celle observée pour d'autres bactéries différant des précédentes exclusivement par le manque de pigment. La respiration basale étudiée sur des suspensions en solution physiologique, se produit elle aussi avec réduction d'environ 50% chez les bactéries non pigmentées. Il faut ajouter que l'oxydation typique de *Flavobacterium dehydrogenans*, c'est-à-dire la transformation de la déhydroandrostérone en androstènedione, est de beaucoup diminuée dans le cas de cultures dépourvues de pigment.

Les caractères de *Flavobacterium androstendionicum*, *Flavobacterium carbolanicum*, *Flavobacterium maris*, *Flavobacterium flavotennae* et des souches AR 1, AR3 étudiés dans mon Institut varient très peu en ce qui concerne les dimensions, la couleur du pigment (qui est toujours entre le jaune citron et l'orange) et surtout les aptitudes hydrolytiques. Ces dernières, très limitées en tout cas, peuvent être observées quelques fois (*Flavobacterium carbolanicum*) sous forme de fluidification très lente de la gélatine, coagulation flasque du lait, production de  $H_2S$ , etc. Les aptitudes oxydantes des flavobactéries ne restent toutefois pas limitées aux stéroïdes seulement; elles s'exercent aussi, comme nous l'avons vu, sur quelques hydrates de carbone et en plus sur l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phénique, la phloroglucine, la pyrocatechine, la ré-

sorcine, le toluène, le xylol, la paraffine; elles montrent une sorte de spécificité d'action qui, une fois approfondie, pourrait servir de caractéristique physiologique de certaines espèces et qui permettrait une définition bien plus commode que celle qui se base sur le comportement vis-à-vis des stéroïdes (ARNAUDI<sup>1</sup>, ARNAUDI et COLLA<sup>2</sup>, TRECCANI-BENETTI et SCHIESSER<sup>3</sup>).

### *Bacterium steroidiclasium*

Pour compléter la revue des bactéries provoquant l'oxydation des stéroïdes de la série des hormones sexuelles, il faut rappeler encore le *Bacterium steroidiclasium*. Il s'agit d'une bactérie très petite, sans spores, immobile, mal colorable, ayant des dimensions moyennes de  $\mu$  0,8–1,2  $\times$  0,3–0,4 et un comportement incertain au Gram. Sur les milieux gélosés communs, on obtient toujours un développement modéré. Sur gélose à l'infusé de levure on peut obtenir seulement un enduit blanchâtre, sous forme de pellicule mince. Il donne lieu à une lente coagulation du lait, qui pour finir se montre digéré et alcalinisé. Le  $p_H$  optimum est entre 6,5 et 7,1 et l'optimum de température entre 30 et 32°C. Il ne fermente pas les hydrates de carbone communs et n'élabore ni indol, ni  $H_2S$ . De même que quelques flavobactéries, il est capable d'utiliser l'acide benzoïque, l'acide salicylique, le toluène, le xylol et la paraffine.

### *Oxydation du cholestérol*

Après les recherches indirectes et occasionnelles de SOEHNGEN<sup>4</sup>, datant de 1913, sur l'utilisation du cholestérol par les mycobactéries, les premières études systématiques que nous ayons à ce sujet sont celles de TAK<sup>5</sup> et de TURFITT<sup>6</sup>. Elles ont été faites entre 1942 et 1943. Mentionnons ensuite, par ordre chronologique, la série des recherches de TURFITT<sup>7</sup> (1944, 1947, 1948), les études de HORVATH et KRÁMLI<sup>8</sup> (1947, 1948, 1949), celles de ARNAUDI et COLLA<sup>9</sup> (1949), de SOBEL et PLAUT<sup>10</sup> (1949), de SCHATZ, SAVARD et PINTER<sup>11</sup> (1949) et de ARNAUDI<sup>12</sup> (1950).

### *Microorganismes à activité oxydante*

A ce groupe de bactéries possédant l'aptitude de dégrader le cholestérol, il faut ajouter encore les

<sup>1</sup> C. ARNAUDI, Boll. Istituto Sieroterapico milanese, 23 (1944).

<sup>2</sup> C. ARNAUDI et C. COLLA, Soc. ital. Sc. biol. Milano (1944).

<sup>3</sup> R. TRECCANI-BENETTI et A. SCHIESSER, Ann. Microbiol. 4, 69 (1949).

<sup>4</sup> N. L. SOEHNGEN, Cbl. Bakt., II. Abt., 1913.

<sup>5</sup> J. D. TAK, Ant. Leeuwenhoek J. Mikrobiol. Serol. 8, 32 (1942).

<sup>6</sup> G. E. TURFITT, J. Bact. 47, 487 (1944).

<sup>7</sup> G. E. TURFITT, Biochem. J. 38, 492 (1944); 40, 79 (1946); J. Bact. 54, 557 (1947); Biochem. J. 42, 376 (1948).

<sup>8</sup> J. HORVÁTH et A. KRÁMLI, Nature 160, 639 (1947)]. – A. KRÁMLI et J. HORVÁTH, Nature 162, 619 (1948)]; Nature 163, 219 (1949)].

<sup>9</sup> C. ARNAUDI et C. COLLA, Exper. 2, 120 (1949).

<sup>10</sup> H. SOBEL et A. PLAUT, J. Bact. 57, 377 (1949).

<sup>11</sup> A. SCHATZ, K. SAVARD et I. PINTER, J. Bact. 57, N. 2 (1949).

<sup>12</sup> C. ARNAUDI, Rend. Ist. lomb. Sc. e Lett. 1950.

schizomycètes qui ont été expérimentés par TURFITT dans un milieu de culture à base de sels minéraux et de cholestérol, dans le but d'en définir l'aptitude à métaboliser le cholestérol. Ce sont :

*Chromobacterium violaceum* Schroeter; *Alcaligenes faecalis* Castellani et Chalmers; *Vibrio cyclosiles* Gray et Thornton; *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter; *Pseudomonas fluorescens* Migula; *Phytomonas malvacarum* Erw. Smith; *Protaminobacter alboflavum* den Dooren de Jong; *Mycoplana bullata* Gray et Thornton; *Micrococcus piltonensis* Gray et Thornton; *Staphylococcus aureus* Rosenbach; *Sarcina lutea* Schroeter; *Streptococcus pyogenes* Rosenbach; *Escherichia coli* Migula; *Aërobacter aërogenes* Beijerinck; *Serratia marcescens* Bizio; *Proteus vulgaris* Hauser; *Bacterium mycoides* Migula; *Bacillus megatherium* De Bary; *Pseudomonas pictorum* Gray et Thornton; *Bacillus subtilis* Cohn; *Bacillus tumescens* Zopf; *Bacillus closteroides* Gray et Thornton; *Corynebacterium xerose* Neisser et Kuschbert; *Corynebacterium pseudodiphthericum* Lehmann et Neumann; *Mycobacterium lacticola* Lehmann et Neumann; *Mycobacterium phlei* Lehmann et Neumann; *Proactinomyces agrestis* Gray et Thornton; *Proactinomyces minimus* Jensen; *Proactinomyces polychromogenes* Valée; *Proactinomyces crystallophagus* Gray et Thornton; *Proactinomyces rubropertinctus* Heffernan; *Proactinomyces coeliacus* Gray et Thornton; *Proactinomyces actinomorphus* Gray et Thornton; *Proactinomyces erythropolis* Gray et Thornton; *Proactinomyces globulus* Gray; *Proactinomyces parafinae* Jensen.

Aucune de ces souches, à l'exception des espèces de *Proactinomyces* et de *Mycobacterium lacticola*, n'a présenté la faculté d'utiliser le cholestérol comme source d'énergie, bien que l'on ait pu observer au cours de nombreuses subcultures la multiplication de plusieurs microorganismes (et tout particulièrement de *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *A. aërogenes*, *Alc. faecalis*).

Les espèces sûrement actives sur le cholestérol seraient donc seulement les celles qui appartiennent au genre *Mycobacterium*: *Mycobacterium lacticola*, *Mycobacterium berolinense* et une souche particulièrement active de *Mycobacterium cholesterolicum*, isolée par TAK par des cultures d'agrandissement avec cholestérol comme source unique de carbone. *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium salmonicolor*, souches de collection de l'Institut de Microbiologie de Delft, étudiées elles aussi par TAK, en employant un milieu de culture ayant le cholestérol comme source unique de carbone. *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium tuberculosis*, contrôlés par SOBEL et PLAUT, le premier au cours de recherches sur le chimisme de la dégradation du cholestérol et le second en déterminant le pouvoir d'utilisation du cholestérol. Un *Azotobacter* d'espèce non déterminée, employé par HORVATH et KRÄMLI. *Flavobacterium maris* Harrison, employé par ARNAUDI et COLLA pour l'oxydation du cholestérol. Cette espèce

a été choisie dans un groupe de flavobactéries se multipliant dans les milieux de culture ayant le cholestérol comme source unique de carbone.

### *Proactinomyces*

Le genre *Proactinomyces* comprend des formes microbiennes filamenteuses, pourvues de traces de ramification. Elles peuvent être considérées comme des formes intermédiaires entre les mycobactéries non ramifiées et les actinomycètes abondamment ramifiés. Après avoir exécuté de nombreuses séries de cultures par agrandissement en présence de cholestérol, TURFITT a pu isoler du sol 144 souches de *Proactinomyces erythropolis*, 21 souches de *Proactinomyces aquosus* n. sp., 14 souches de *Proactinomyces globulus*, 8 souches de *Proactinomyces coeliacus*, 1 souche de *Proactinomyces restrictus* n. sp. Il a été aussi possible à cet auteur d'établir que des souches de collection de *Proactinomyces agrestis*, *Proactinomyces crystallophagus*, *Proactinomyces convolutus*, *Proactinomyces actinomorphus*, *Proactinomyces minimus*, *Proactinomyces rubropertinctus*, *Proactinomyces polychromogenes* peuvent métaboliser le cholestérol et que *Proactinomyces erythropolis* déploie une activité oxydante sur le cholesténone, sur l'œstradiol et sur l'acide cholique.

SCHATZ, SAVARD et PINTER sont d'opinion que d'autres schizomycètes, appartenant à différents genres, peuvent être capables de métaboliser le cholestérol. Il est en effet possible que d'autres schizomycètes puissent intervenir dans ce processus. Les résultats de nos dernières recherches, encore en cours d'élaboration, exécutées au moyen de cultures par agrandissement ensemencées avec de la substance fécale, nous portent à admettre qu'en effet d'autres espèces de schizomycètes sont douées de pouvoir oxydant sur les stéroïdes.

Il nous paraît toutefois un peu simpliste de déduire cette activité biochimique simplement des variations du  $p_H$  observées dans des cultures obtenues avec des milieux nutritifs de composition très complexe (comme cela semble avoir été le cas dans les expériences faites par les auteurs que nous venons de citer).

### *Dégradation du cholestérol et produits de l'oxydation*

Le critérium permettant de suivre le processus de dégradation du cholestérol dans sa forme la plus simple nous est fourni par le développement des microbes observés dans des milieux de culture ayant le cholestérol comme source unique de carbone. Cette méthode a été adoptée à titre d'essai par tous les chercheurs et elle est considérée par SOEHNGEN comme le seul test de l'activité des mycobactéries. Ce critérium est toutefois très aléatoire puisque même des traces d'impuretés dans le cholestérol ou bien dans les autres substances contenues dans le milieu de culture peuvent aisément permettre un développement microbien parfois même très abondant, tout particulièrement lorsqu'il s'agit

de mycobactéries saprophytes ayant, comme on sait, des exigences nutritives très limitées.

TAK a suivi ce critérium, en le complétant toutefois par la détermination de la quantité de cholestérol disparue. Dans des cultures par agrandissement, maintenues en agitation pendant 28 jours à 30°C., la quantité résiduelle de cholestérol était entre 3 et 9% de la quantité mise en œuvre, à une concentration de 3 pour 1000 dans le milieu employé.

Tous les autres chercheurs ont essayé d'isoler les produits de l'oxydation pour établir un bilan de la dégradation du cholestérol opérée par les microorganismes. Dans ce but ils se sont inspirés, bien entendu, des résultats qu'on obtient au cours de l'oxydation chimique, pendant laquelle la molécule du cholestérol donne lieu à la formation de plusieurs substances, dont la constitution démontre une corrélation étroite entre les stéroïdes, les hormones sexuelles et les acides biliaires.

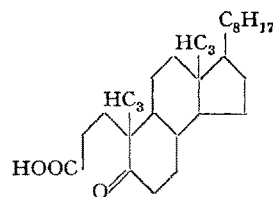
Il semble que ces dégradations, impliquant la rupture de la chaîne latérale et des transformations dans le noyau polycyclique, sont accompagnées assez fréquemment de changements au C<sub>7</sub>. Cela a été démontré par BERGSTROEM et WINTERSTEINER<sup>1</sup> qui, après une aération prolongée de solutions colloïdales de cholestérol stabilisé avec du stéarate de sodium au 3 pour 1000, tenues à 85°C., ont obtenu la formation du 7-hydroxy- et du 7-céto-dérivé.

TURFITT, HORVATH et KRÄMLI, ARNAUDI et COLLA, SOBEL et PLAUT ont essayé la séparation des produits de l'oxydation du cholestérol (et aussi de ses dérivés) et leur identification. En ce qui concerne les méthodes d'isolement et d'identification de ces composés, nous renvoyons le lecteur aux mémoires originaux. Il faut rappeler aussi que dans notre revue nous n'envisageons que les substances identifiées avec certitude.

Il en résulte que le cholestérol peut être sûrement oxydé en  $\Delta^4$  cholesténone par plusieurs *Proactinomyces* et tout particulièrement par *Proactinomyces erythropolis* (TURFITT) et par *Flavobacterium maris* (ARNAUDI et COLLA). Des traces de  $\Delta^4$ -cholesténone ont été identifiées aussi par SOBEL et PLAUT, qui ont employé le *Mycobacterium smegmatis*. La même substance ainsi que du 7-oxycholestérol ont été obtenus par KRÄMLI et HORVATH avec *Proactinomyces roseus*; avec *Azotobacter* sp. Ces auteurs auraient obtenu du 7-oxycholestérol en même temps que des traces de méthylheptanone. Ce dernier résultat nous laisse toutefois un peu perplexe, puisque la présence de cette substance signifierait la scission de la chaîne latérale et il est improbable que ce fait se soit produit sans qu'une partie au moins du noyau polycyclique ait pu être retrouvée.

TURFITT a soumis à l'oxydation par *Proactinomyces erythropolis* aussi le cholesténone et a pu retrouver et

identifier des traces d'un acide cétonique précédemment décrit par WINDAUS<sup>1</sup>, qui a la formule suivante:



Le même auteur a essayé aussi d'obtenir l'oxydation de l'œstradiol avec *Proactinomyces*, toutefois l'œstrone s'est formé en quantité très limitée et seulement en présence de grandes quantités de germes.

Quelques dérivés du cholestérol ont été soumis à la même étude.

TURFITT (1948) a essayé l'oxydation de l'acétate de cholestérol avec *Proactinomyces erythropolis*, mais après trois mois d'incubation il a récupéré 18,9 g sur les 20 mis en réaction et 10 mg d'acide isocaproïque. Ce fait pourrait indiquer qu'une oxydation de la chaîne latérale a eu lieu. SOBEL et PLAUT ont observé que *Mycobacterium smegmatis* utilise le succinate de cholestérol, mais en ce qui concerne les produits de l'oxydation, les résultats obtenus par ces auteurs ont été très incertains. Ils ont borné leurs essais à la division de la substance soluble dans l'éther dans les fractions suivantes: alcoolique cétonique; alcoolique non cétonique; non alcoolique non cétonique; non alcoolique cétonique et soluble dans les alcali (voir formule page 87).

#### Modalités des oxydations

TAK a adopté la méthode des cultures par agrandissement dans des liquides minéraux de culture, auxquels il a ajouté du cholestérol. Les ballons en incubation ont été soumis à une agitation continue. Les subcultures successives ont subi le même traitement. Le cholestérol était introduit de la manière suivante: 1,25 g de cholestérol étaient dissous dans 60 cm<sup>3</sup> d'acétone et le tout égoutté lentement dans 250 cm<sup>3</sup> d'une solution chaude de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> toutes deux à 1 pour 1000. On maintenait le liquide à température d'ébullition jusqu'à complète disparition de l'acétone.

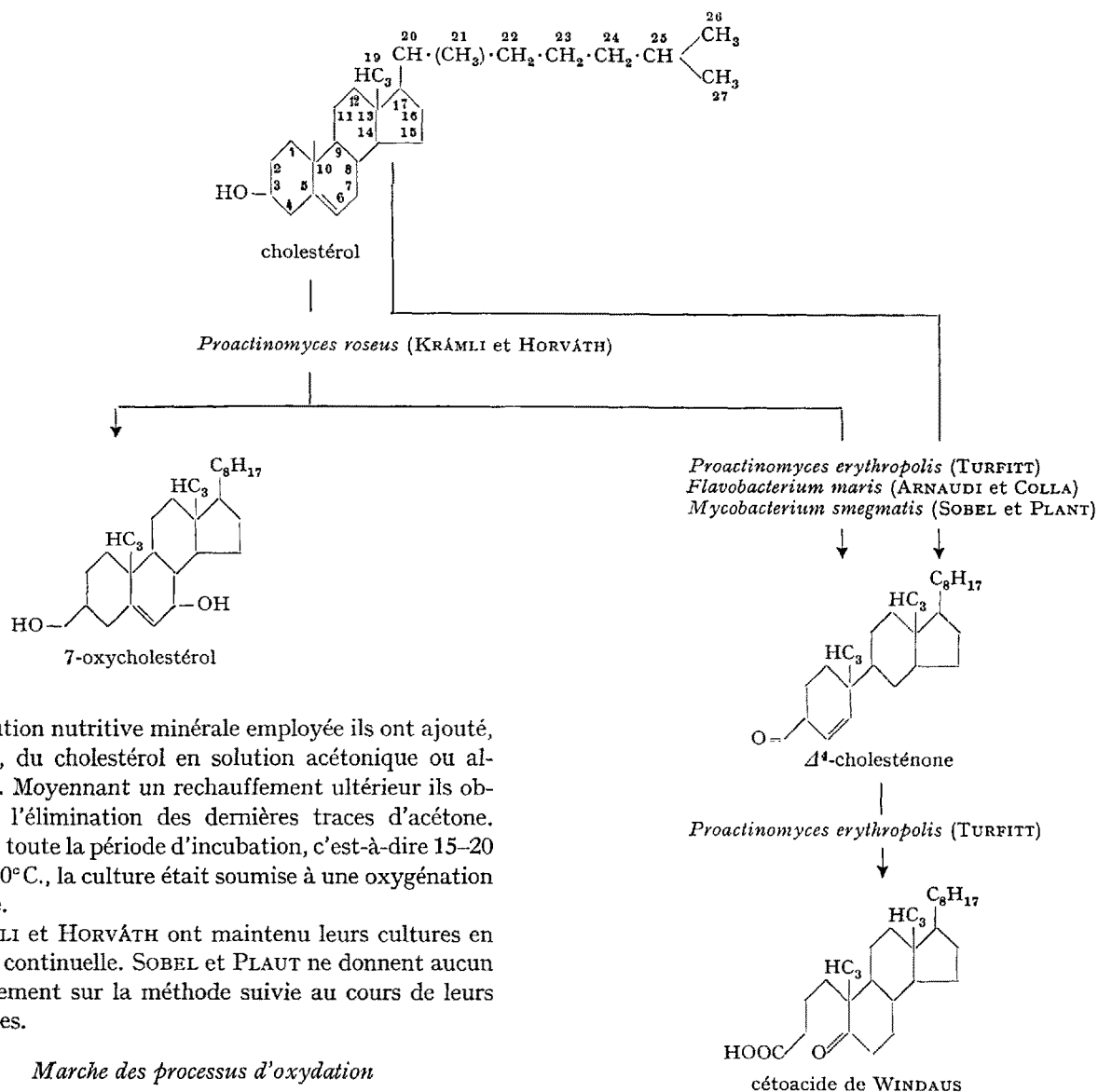
Au cours d'autres essais, on a ajouté au liquide de culture MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> et Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. Même simplement pulvérisé dans un mortier, le cholestérol ajouté à la solution nutritive minérale était métabolisé aisément par les mycobactéries étudiées par TAK.

Une technique analogue est celle choisie par TURFITT pour une grande partie de ses expériences. Au cours d'autres essais cet auteur a adopté au contraire un système de ballons reliés entre eux à fin de permettre une oxygénation continue et l'éloignement des produits de dégradation.

ARNAUDI et COLLA ont employé des ballons de KLUYVER de forme conique, pourvus d'une cloison poreuse.

<sup>1</sup> S. BERGSTROEM et O. WINTERSTEINER, J. biol. Chem. 141, 597 (1941).

<sup>1</sup> A. WINDAUS, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 2008 (1906).



A la solution nutritive minérale employée ils ont ajouté, à chaud, du cholestérol en solution acétonique ou alcoolique. Moyennant un rechauffement ultérieur ils obtenaient l'élimination des dernières traces d'acétone. Pendant toute la période d'incubation, c'est-à-dire 15-20 jours à 30°C., la culture était soumise à une oxygénation continue.

KRÁMLI et HORVÁTH ont maintenu leurs cultures en aération continue. SOBEL et PLAUT ne donnent aucun renseignement sur la méthode suivie au cours de leurs recherches.

#### Marche des processus d'oxydation

L'influence exercée par de nombreux facteurs extérieurs se montre évidente dans les recherches des auteurs que nous venons de citer. On entrevoit en même temps la possibilité que d'autres facteurs puissent intervenir. Le facteur temps est d'une importance prédominante, soit dans la multiplication des microbes; celle-ci est, comme on sait, assez lente chez les mycobactéries et *Proactinomyces*. Il en est de même de la transformation enzymatique, laquelle est assez lente et n'a lieu qu'en présence d'une flore microbienne abondante. En général les oxydations déterminées par les mycobactéries durent 30 jours (TAK) ou même 3-4 mois (SOBEL et PLAUT); celles dues à *Proactinomyces* (TURFITT) s'effectuent en 3-5 mois. L'oxydation provoquée par *Flavobacterium maris* (ARNAUDI et COLLA) est beaucoup moins lente, ayant lieu en 15-20 jours; encore plus rapide est celle d'*Azotobacter* (HORVATH et KRÁMLI), qui est terminée au 14<sup>e</sup> jour.

C'est tout particulièrement chez les *Proactinomyces* qu'une importance notable doit être à l'influence de la

concentration des ions hydrogènes. Celle-ci ne doit pas être trop éloignée du point neutre, sinon le développement des microorganismes serait compromis. Si l'on utilise l'ion  $\text{NH}_4^+$  sous forme de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans les milieux de culture minéraux, on observe la libération d'ions acides, l'acidification progressive du milieu, et l'arrêt rapide de la multiplication et de l'activité des microorganismes. Il est par conséquent indispensable de tamponner le milieu avec du  $\text{CaCO}_3$ . Il n'a pas été démontré toutefois que le  $p_{\text{H}}$  puisse influencer aussi le processus purement enzymatique de l'oxydation.

L'un des aspects les plus intéressants de l'influence exercée par les facteurs externes sur l'oxydation est fourni par la composition chimique du milieu de culture.

Les oxydations ont été obtenues en général avec des liquides de culture purement minéraux; parfois, on a tout de même employé du bouillon de levure ou une solution minérale enrichie en certaines substances organiques complexes. La marche des processus s'en



trouve alors modifiée, très probablement à cause des variations que le patrimoine enzymatique des micro-organismes peut subir.

L'influence que le milieu de culture exerce sur l'oxydation a été mise en évidence par TURFITT (1944), qui a constaté que la quantité de cholestérol utilisée par *Proactinomyces erythropolis* dans un milieu de culture contenant de l'azote sous forme de  $\text{KNO}_3$  est double de celle qui est métabolisée en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et à peu près triple, lorsqu'on y ajoute en outre du  $\text{CaCO}_3$  dans la proportion de 0,5%.

SOBEL et PLAUT d'autre part, ont observé l'influence directe exercée par les substances pouvant alimenter le *Mycobacterium smegmatis* et aussi par les facteurs de croissance. Cette bactérie possède une capacité très limitée de dégradation et d'utilisation du cholestérol, en l'absence d'autres substances organiques, tandis qu'en présence de bouillon de cœur, la dégradation est plus active. Une influence semblable, bien que moins nette, est exercée par la cystine et la glycine. En effet: en présence d'une infusion de cœur (0,3 pour 1000 dans le liquide de culture minéral) la diminution du cholestérol observée au bout de trois mois est à peu près de 30 à 70%, tandis qu'en présence de cystine et de glycine, on obtient la disparition, pendant la même période de temps, du 20-30% du cholestérol. Pour les expériences témoins, avec cholestérol et sans adjonction d'autres substances organiques, la dégradation observée se borne au 5-10%.

Dans notre Institut, nous avons étudié l'influence que le milieu de culture exerce sur la marche de la transformation du cholestérol en cholesténone, déterminée par *Flavobacterium maris*.

Mes collaboratrices, Mme TRECCANI-BENETTI et Mlle SCHIESSER, avaient observé auparavant que *Flavobacterium maris* donne lieu, en solution purement saline, à la disparition du 33% de l'acide salicylique, tandis qu'en présence de petites quantités d'autres sources de carbone (acétate, succinate, lactate de sodium), il métabolise tout l'acide salicylique présent, en le transformant en une substance qui possède des caractères de solubilité rappelant ceux de la substance humique du sol. Au cours d'une étude sur le comportement vis-à-vis du cholestérol du même *Flavobacterium maris* et, en mettant cette substance dans des liquides de culture minéraux, avec ou sans adjonction du 3 pour 1000 d'asparagine, on a observé qu'en présence de cet acide le cholestérol se transforme en cholesténone au bout de 18 jours (avec aération), dans la proportion d'à peu près 14%, avec un résidu de cholestérol inaltéré d'environ 80%.

Au contraire, en solution nutritive minérale pure sans adjonction d'autres sources de carbone, seulement 1,3% est transformé en une substance constituée en majeure partie par du cholesténone; tout le reste est transformé de manière à ne plus présenter les caractéristiques de la structure stéroïde. L'activité bio-

chimique des microorganismes essayés semble donc être influencée très nettement par la composition du milieu nutritif. On observe enfin qu'en milieu pauvre où la source unique de carbone est représentée par le cholestérol, celui-ci est profondément dégradé même dans sa structure stéroïde, aux fins des nécessités nutritives du microorganisme. En présence de sources de carbone d'utilisation plus facile, l'activité des bactéries oxydant les stéroïdes se manifeste au contraire par des actions enzymatiques secondaires, qui s'exercent sur le cholestérol sans en altérer la structure polycyclique. L'activité des bactéries dans les solutions nutritives pauvres semble être certainement très intéressante, puisqu'il s'agit là du problème du mode d'attaque de la molécule complexe des stéroïdes et, avant tout, du détachement de la chaîne latérale. Il resterait maintenant à considérer le facteur oxygénation, qui a sans doute de l'importance pour ce qui concerne la multiplication des bactéries et la réaction enzymatique sur le cholestérol. Les données dont nous disposons sont toutefois limitées à des observations empiriques: on a simplement constaté que la dégradation est accélérée par l'agitation, l'aération et, enfin, par l'oxygénation forcée. Jusqu'à présent, il nous manque des données sur l'oxydation dans des tambours sous pression d'oxygène.

Il est clair que dans le problème de l'oxygénation deux facteurs sont à considérer. L'un d'eux se rapporte à l'accélération d'une réaction qui se produit aussi, bien qu'avec plus de lenteur, tout simplement en secouant les cultures ou en les étendant sur une grande surface. L'autre se rapporte au degré d'oxydation plus ou moins profond d'une substance qu'un microorganisme peut accomplir en dépendance d'un degré variable du potentiel redox.

Nous sommes entrés dans ces considérations<sup>1</sup> en parlant de la validité des espèces *Flavobacterium androstendionicum* et *Flavobacterium carbolanicum* de MOLINA et ERCOLI. Bien qu'une fonction différente des espèces particulières ne soit pas à écarter, il nous semble en effet que la variabilité du pouvoir oxydatif de ces bactéries et de *Flavobacterium dehydrogenans* peut être attribuée éventuellement aux conditions du potentiel redox des systèmes constitués par les liquides de réaction.

La marche de l'oxydation du cholestérol est liée évidemment aussi aux conditions physiologiques des bactéries. Nous en avons déjà parlé au sujet des flavobactéries.

Il nous reste encore à rappeler l'observation de TURFITT sur l'impossibilité d'exalter l'activité oxydative des *Proactinomyces* au moyen de cultures par aggrandissement ainsi que la diminution du pouvoir oxydant sous l'influence du milieu de culture employé dans les collections. Six espèces de *Proactinomyces* ont montré, après une longue période de culture en milieu nutritif

<sup>1</sup> C. ARNAUDI et C. COLLA, Soc. ital. Sc. bio. Milano (1944).



contenant de l'œstradiol come source unique de carbone, una diminution de leur capacité d'oxyder le cholestérol en cholesténone, diminution de 30% par rapport aux témoins.

L'intérêt des réactions d'oxydation susdites est évident et non seulement pour le microbiologiste: nos connaissances sur le «cycle des stéroïdes» et des substances naturelles analogues en sont enrichies. D'autre part ces mêmes réactions pourraient intervenir aussi au cours de la formation dans le sol de substances de type hormonal pouvant stimuler en quelque façon la vie végétale. Il faut ajouter que les mêmes réactions présentent un intérêt certain en ce qui concerne plusieurs domaines de la biochimie et de la physiologie animale. Le fait de pouvoir utiliser le délicat réactif qu'est le microorganisme, au lieu de l'énergie brute des réactifs chimiques, donne au biochimiste la possibilité d'examiner à fond les processus de transformation des substances organiques. Il dispose par là d'un moyen profondément sélectif. La possibilité d'étendre l'usage de ce réactif biologique aux stéroïdes mêmes, constitue sans doute un avantage appréciable.

Pour le physiologiste, l'intérêt de ces recherches est considérable puisqu'elles permettront peut être de vérifier l'action directe que l'on prête depuis longtemps aux microbes sur l'évolution des stéroïdes dans l'appareil digestif des animaux. Comme le métabolisme des

levures a constitué le modèle du métabolisme intermédiaire des hydrates de carbone dans les animaux, il se pourrait que le chimisme de la transformation bactérienne des stéroïdes puisse nous renseigner à l'avenir sur le métabolisme de ces substances dans l'organisme animal.

#### Summary

The author discusses the opinions set forth by several authors upon the behaviour of bacteria towards steroids. He examines particularly their behaviour in respect to the resistance of cholesterol against attack by microbes and the antibacteric action of many substances having the phenanthrene nucleus in common.

The author describes his experiences in regard to the oxidation of steroids explaining hormonal activity; he reports the most important characteristics of the various bacteria and also the conditions at which oxidation takes place.

Furthermore he describes the most recent knowledges about the oxidative transformation of cholesterol.

Afterwards he examines the functions of many active organisms (*Flavobacterium*, *Proactinomyces*, *Mycobacterium*), the modalities of oxidation, the evolution of the process, and the products resulting from oxidation.

At last the author recalls the decisive influence exercised by the chemical composition of the substrate in which cholesterol is suspended upon the process, which can evolve into a complete demolition of the molecule or to a selective oxidation with production of substances that still retain the fundamental structure of steroids.

## Le risposte a reclutamento in rapporto alla fisiologia dei nuclei talamici a proiezione diffusa

Di G. MORUZZI<sup>1</sup>, Pisa

Per molto tempo gli studiosi della fisiologia del talamo hanno preso in considerazione i soli sistemi a proiezione specifica ed in particolar modo i nuclei talamici che ricevono impulsi dalle grandi vie sensitive e sensoriali e li trasmettono a loro volta ad aree specifiche e ben delimitate della corteccia cerebrale. Accanto a questi sistemi ve ne sono però altri che si proiettano diffusamente a vaste aree della corteccia cerebrale, esercitando su di esse azioni a tipo generalizzato. Solo negli ultimi anni, dopo la scoperta da parte di MORISON e DEMPSEY<sup>2</sup> dei potenziali a reclutamento, la fisiologia ha affrontato lo studio di queste parti del talamo, la cui funzione era del tutto ignota.

Nel 1942 MORISON e DEMPSEY osservarono che la stimolazione dei nuclei intralaminari del talamo dava origine a risposte bioelettriche corticali che si distinguevano nettamente da quelle ottenute colla stimolazione dei nuclei a proiezione specifica per i seguenti caratteri:

1° Le risposte specifiche si osservano solo nelle corrispondenti aree corticali di proiezione sensitiva o sensoriale (corteccia sensitiva-motrice per le masse talamiche laterali, corteccia acustica o visiva per stimolazione dei corrispondenti corpi genicolati). Le risposte diffuse si osservano invece su gran parte della corteccia cerebrale, pur con la netta prevalenza delle aree rostrali del pallium.

2° Le risposte specifiche si osservano anche per un singolo stimolo elettrico; occorre invece una stimola-

<sup>1</sup> Istituto di Fisiologia dell'Università di Pisa, Pisa (Italia).

<sup>2</sup> R.S. MORISON e E.W. DEMPSEY, Amer. J. Physiol. 135, 281 (1942).