

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Avril 1953. — Tome 84.)

COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE

PAR

Mirko BELJANSKI



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

**COMPARAISON DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A DES ANTIBIOTIQUES
AVEC DES SOUCHES SENSIBLES DE MÊME ESPÈCE (1)**

par MIRKO BELJANSKI.

(Institut Pasteur. Service du professeur MACHEBOEUF.)

III. — Cas du sulfamide (1162 F).

Dans nos travaux antérieurs [1, 2] nous avons démontré des différences biochimiques très nettes entre des souches bactériennes sensibles et des souches de même espèce résistant à la streptomycine ou à la pénicilline. Nous nous sommes demandé si des différences semblables se manifestaient lorsque l'on étudiait une souche résistant au para-amino-phényl-sulfamide.

Une souche de *Staphylococcus aureus* (Oxford) résistant à 155 mg de chlorhydrate de para-amino-phényl-sulfamide (1162 F) pour 100 ml de milieu de culture a été obtenue par la technique indiquée dans le cas de la streptomycino-résistance en utilisant le bouillon nutritif glucosé comme milieu de culture, car le milieu peptoné n'est pas favorable [3, 4, 5].

La prolifération de la souche sensible est inhibée par 13 mg de sulfamide (1162 F) pour 100 ml du même milieu de culture.

**CROISSANCE D'UNE SOUCHE SENSIBLE
ET D'UNE SOUCHE RÉSISTANTE AU SULFAMIDE (1162 F).**

Nous avons comparé la prolifération des deux souches et les résultats sont exprimés par les courbes de la figure 1. Les courbes montrent que la phase de latence de la souche résistante est plus longue que celle de la souche sensible. La phase exponentielle de croissance ne diffère pas pour les deux souches et le rendement est le même. (Nous confirmons ici les résultats

(1) Un résumé de ce travail a été publié [7].

obtenus par Steers et Sevag [6].) Le retard dans la phase de latence d'une souche résistante que nous avons déjà observé [1, 2] se retrouve donc dans le cas d'une souche sulfamido-résistante.

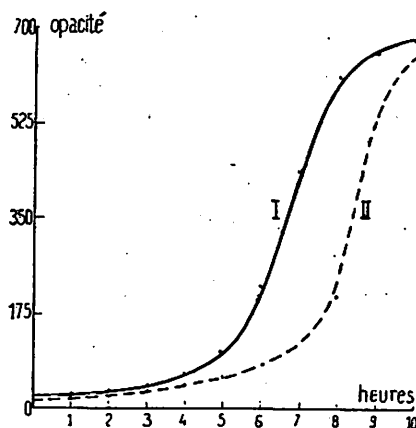


FIG. 1. — Courbe de croissance de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

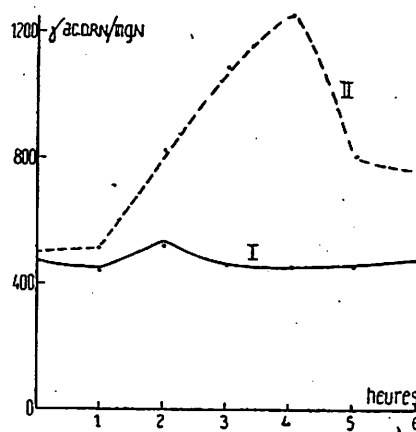


FIG. 2. — Teneur en acide désoxyribonucléique de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES
CHEZ *Staphylococcus aureus* SENSIBLE
ET RÉSISTANT AU SULFAMIDE (1162 F).

Comme dans le cas des antibiotiques étudiés [1] nous avons porté notre attention sur le métabolisme des acides nucléiques.

Le phénomène observé pour la streptomycine et la pénicilline en ce qui concerne l'accumulation de l'acide ribonucléique chez les souches résistantes ne se retrouve pas chez les bactéries sulfamido-résistantes. Au lieu d'accumuler des quantités importantes d'acide ribonucléique, la souche de *Staphylococcus aureus* sulfamido-résistante n'accumule pratiquement pas plus d'acide ribonucléique que la souche sensible, mais au contraire, elle accumule deux fois plus d'acide désoxyribonucléique (fig. 2).

Nos résultats sont exprimés en μg de l'acide désoxyribonucléique par rapport au milligramme d'azote total microbien. L'opposition est très marquée avec les faits observés pour les

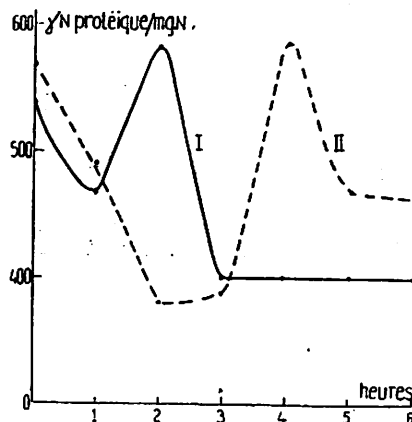


FIG. 3. — Teneur en azote protéique de *Staphylococcus aureus*.
I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

souches résistant à la pénicilline et à la streptomycine que nous avons étudiées. Ces faits nous paraissent dignes d'études détaillées que nous nous proposons d'entreprendre ultérieurement.

MÉTABOLISME DES PROTÉINES, DES IONS ORTHOPHOSPHORIQUES
ET DES MONONUCLÉOTIDES PURIQUES CHEZ *Staphylococcus aureus*
SENSIBLE ET RÉSISTANT AU SULFAMIDE (1162 F).

Pour divers constituants de la cellule microbienne : protéines, ions orthophosphates acido-solubles, mononucléotides puriques, nous ne trouvons pas de différences quantitatives entre les deux souches, sensible et résistante (fig. 3, 4, 5).

Cependant, Steers et Sevag [6] ont observé que leur souche résistante aux sulfamides perdait partiellement ou complètement le pouvoir de synthétiser les acides aminés. Une souche résis-

tante de *Staphylococcus aureus* est incapable de synthétiser par exemple l'acide aspartique. Mais l'utilisation par la souche sulfamido-résistante des acides aminés préformés est relativement

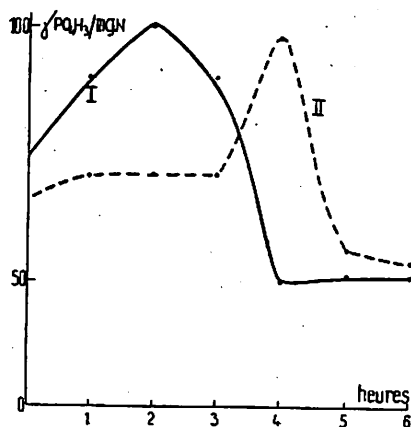


FIG. 4. — Ions orthophosphoriques de *Staphylococcus aureus*. I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

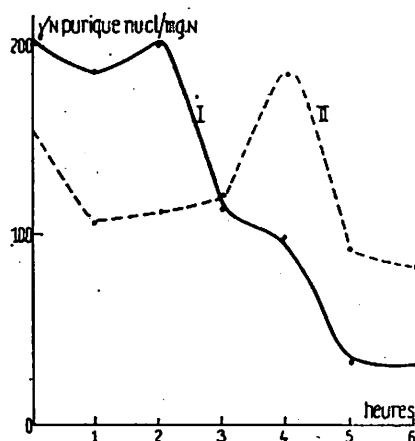


FIG. 5. — Teneur en azote purique nucléotidique de *Staphylococcus aureus*. I, Souche sulfamido-sensible; II, Souche sulfamido-résistante.

intense. C'est seulement la synthèse de certains acides aminés qui est modifiée.

Nous n'avons pas étudié la synthèse des acides aminés chez *Staphylococcus aureus* sulfamido-résistant, mais seulement la formation des protéines. Nos études montrent qu'il n'existe pas

de différence en ce qui concerne le taux des protéines entre les deux souches sensible et résistante au chlorhydrate de *p*-aminophényl-sulfamide.

Dans nos expériences, il est vrai, les bactéries avaient à leur disposition tous les amino-acides nécessaires ; elles n'avaient pas à dépendre de leur synthèse.

Nos résultats ne sont donc pas en désaccord avec ceux de Steers et Sevag.

CONCLUSION.

Une souche de *Staphylococcus aureus* résistant au para-aminophényl-sulfamide est comparée avec la souche sensible dont elle dérive. Si l'on cultive ces deux souches dans des conditions identiques, la souche résistante présente une phase de latence un peu plus longue et elle accumule deux fois plus d'acide désoxyribonucléique que la souche sensible. (Les souches streptomycino- et pénicillino-résistantes étudiées antérieurement n'accumulent pas d'acide désoxyribonucléique, mais de l'acide ribonucléique).

IV. — Cas de l'azoture de Na (N_3Na).

De nombreux travaux ont été faits pour expliquer le mécanisme d'action de l'azoture de sodium chez *Escherichia coli*. L'action de cette substance antibiotique sur le métabolisme d'un mutant d'*Escherichia coli* (mutant azido-résistant) a été étudiée par Grunberg-Manago [8]. Cette étude ne porte pas sur le métabolisme des acides nucléiques et des protéines, mais sur l'utilisation du glucose en aérobie et anaérobie en présence ou en absence d'azoture de sodium.

Notre attention s'est surtout portée sur le métabolisme des acides nucléiques de souches d'*Escherichia coli*, sensible et résistant à N_3Na .

La souche résistante que nous avons utilisée (2) se développe bien en présence d'azoture de sodium $\frac{M}{100}$. La souche sensible dont provient la souche résistante ne prolifère pas avec une concentration de $\frac{M}{700}$ en azoture de sodium.

ETUDE DE LA CROISSANCE D'*Escherichia coli* SENSIBLE ET RÉSISTANT A L' N_3Na .

Pour étudier la courbe de croissance de ces souches nous avons utilisé le milieu gélosé dans des boîtes de Roux. Deux séries de

(2) La souche d'*Escherichia coli* (Monod) résistant à l' N_3Na a été mise à notre disposition par M^{me} Grunberg-Manago, que nous remercions très vivement.

boîtes furent ensemencées avec des inocula égaux (10 ml de la culture respective prélevée à la dix-huitième heure de la croissance). Les boîtes sont portées à 37°.

A chaque heure on récolte les bactéries d'une boîte avec le maximum de précautions en lavant bien la surface du milieu gélosé avec de l'eau distillée en utilisant les billes de verre. Les bactéries sont lavées et mises en suspension dans 4,5 ml d'eau distillée. Pour la mesure de l'opacité on prélève 0,5 ml de la suspension bactérienne, on y ajoute 4,5 ml d'eau distillée et deux gouttes de formol. Les lectures sont faites à l'électrophotomètre de Meunier (écran orange).

Nos résultats sont exprimés par les courbes de la figure 6.

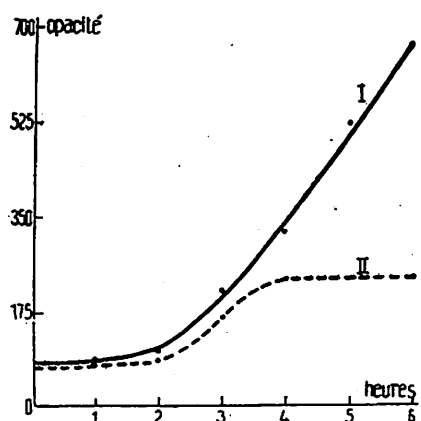


FIG. 6. — Croissance d'*Escherichia coli*.
I, Souche azido-sensible; II, Souche azido-résistante.

Nos courbes de croissance sur milieu solide confirment celles obtenues par Grunberg-Manago. On voit nettement, d'une part, qu'il y a un retard de la croissance pour la souche résistante à l'azoture de sodium et, d'autre part, que la croissance de cette souche atteint un rendement beaucoup moins élevé (dans les premières heures de la croissance) que pour la souche sensible.

ETUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES,
DE LEURS DÉRIVÉS ET DES PROTÉINES CHEZ *Escherichia coli*
SENSIBLE ET RÉSISTANT A L' N_3Na .

La souche résistante fut cultivée sur milieu liquide ou solide en absence d'azoture de sodium. Elle garda sa résistance après de nombreux passages [8].

En ce qui concerne le métabolisme des acides nucléiques et

de leurs dérivés, nous retrouvons un phénomène analogue à celui observé dans le cas de la streptomycino-résistance et de la pénicillino-résistance [1, 2] : la souche azido-résistante accumule de l'acide ribonucléique en plus grande quantité que la souche sensible, mais cette accumulation est moins importante que dans le cas des souches, pénicillino-résistante ou streptomycino-résistante, que nous avons étudiées.

Nos résultats sont exprimés en μg de ribose de l'acide ribonucléique par rapport au milligramme d'azote total microbien (fig. 7).

Pour les autres constituants des bactéries : acide désoxyribo-

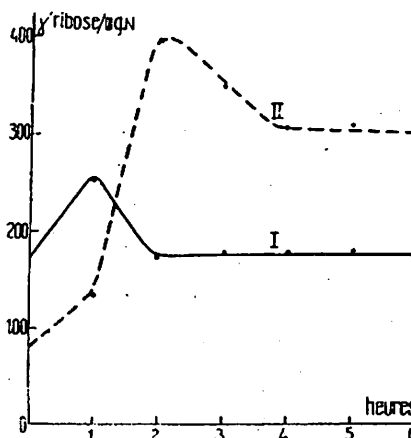


FIG. 7. — Teneur en ribose de l'acide ribonucléique d'*Escherichia coli*.
I; Souche azido-sensible; II, Souche azido-résistante.

nucléique, mononucléotides puriques, ions orthophosphoriques et les protéines, nous ne constatons pratiquement pas de différence entre la souche sensible et la souche résistante.

DISCUSSION.

Chaque fois que nous avons comparé pendant leur prolifération, une souche résistante à une souche normale de même espèce, nous avons constaté que la souche résistante accumule, au début de sa croissance active (début de la phase exponentielle de croissance), une proportion beaucoup plus grande d'un certain type d'acide nucléique. D'autre part, nous avons constaté que les souches résistantes que nous avons étudiées présentent une période de latence notablement plus longue que celle des souches sensibles [1, 2].

On peut se demander si le retard dans la synthèse de l'acide

ribonucléique a comme conséquence un retard dans le démarrage de la division cellulaire, ou bien si, au contraire, c'est le retard de démarrage de la division qui est la cause première.

Il est encore difficile de donner une explication satisfaisante à ces faits expérimentaux.

D'après les travaux de Brachet [9] et de Caspersson [10], ceux de Malmgren et Heden [11], le taux de la division cellulaire et de la synthèse protéique serait directement proportionnel à la quantité d'acides nucléiques. Ce rapport n'est pas respecté dans les souches résistantes que nous avons étudiées jusqu'à présent. Elles accumulent notablement plus d'acide ribonucléique et pourtant le taux de la division cellulaire est inférieur à celui des souches sensibles. Ceci nous conduit à penser que le catabolisme des acides nucléiques est ralenti dans les souches résistantes. Si, pour la souche streptomycino-résistante de *Staphylococcus aureus* (Oxford), on ajoute dans le milieu de culture de la cocarboxylase (antagoniste de la streptomycine [12]), le catabolisme des acides nucléiques est notablement activé et le taux de la division cellulaire augmente sans qu'il en soit de même pour les protéines [13].

D'après nos résultats, il semble que chez une souche résistant à un antibiotique la vitesse de la division cellulaire ne dépende pas uniquement de la quantité d'acide ribonucléique. D'autres facteurs y seraient nécessaires pour augmenter la vitesse de la division cellulaire.

Des résultats inédits (3), obtenus pour une souche de *Staphylococcus aureus* n° 133 streptomycino-résistante et pour une souche de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) streptomycino-résistante, nous conduisent à penser que l'anabolisme de l'acide ribonucléique chez ces deux souches résistantes est plus actif que celui des souches sensibles. Cette explication trouve appui dans le fait que les souches n° 133 et *Salmonella enteritidis* streptomycino-résistantes possèdent pratiquement le même taux de croissance que les souches sensibles, et pourtant elles accumulent notablement plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles.

La corrélation qui existe, d'après Brachet et Caspersson, entre la quantité d'acide ribonucléique et la synthèse protéique ne s'observe donc pas quand on compare des souches résistant aux antibiotiques à des souches sensibles de mêmes espèces. C'est seulement dans le cas de la souche pénicillino-résistante que nous avons étudiée, que nous constatons des variations de même sens pour l'accumulation des protéines et l'accumulation des acides nucléiques. Et même, dans ce cas, il n'y a qu'un parallélisme très grossier.

(3) Résultats inédits de M. Beljanski.

Pour chacun des antibiotiques nous avons comparé une population résistante à la population originelle sensible de même espèce. Il serait très intéressant de comparer plusieurs mutants distincts résistants avec plusieurs mutants sensibles afin de pouvoir affirmer que les différences que nous notons entre populations résistantes et populations sensibles sont réellement liées indissolublement à la résistance.

CONCLUSIONS.

I. La phase de latence de la souche azido-résistante est plus longue que celle de la souche sensible. Le rendement de la souche résistante est inférieur à celui de la souche sensible pendant les premières heures de la croissance, mais s'élève finalement à une même valeur.

II. La souche azido-résistante accumule davantage d'acide ribonucléique que la souche sensible. Pour les autres constituants des bactéries nous n'avons pas trouvé de différence quantitative.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1952, 83, 80.
- [2] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1953, 84, 402.
- [3] A. LWOFF, F. NITTI et M^{me} J. TRÉFOUËL. *Ces Annales*, 1941, 67, 173.
- [4] F. NITTI et J. TABONE. *Ces Annales*, 1942, 68, 360.
- [5] J. TABONE, F. NITTI et H. MOUSSET. *Ces Annales*, 1944, 70, 366.
- [6] E. STEERS et G. SEVAG. *Arch. Bioch.*, 1949, 24, 129 et 144.
- [7] M. BELJANSKI. *Ann. Biol.*, 1951, 27, 775.
- [8] M. GRUNBERG-MANAGO. *Ces Annales*, 1950, 79, 77.
- [9] J. BRACHET. *Actualités biochimiques*, 1951, p. 1.
- [10] T. CASPERSSON. *Symposium Soc. exp. Biol. Nucleic Acids*, 1947.
- [11] H. MALMGREN et HEDEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1947, 24, 417 et 448.
- [12] M. FAGUET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, 233, 532.
- [13] M. BELJANSKI. II^e Congrès Int. de Biochimie, Paris, 1952.