

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Octobre 1953. — Tome 85.)

ÉTUDE DES ACIDES NUCLÉIQUES
DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A LA STREPTOMYCINE
ET DE SOUCHES DE MÊMES ESPÈCES
MAIS SENSIBLES A L'ANTIBIOTIQUE

PAR

Mirko BELJANSKI



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

**ÉTUDE DES ACIDES NUCLÉIQUES
DE SOUCHES BACTÉRIENNES
RÉSISTANTES A LA STREPTOMYCINE
ET DE SOUCHES DE MÊMES ESPÈCES
MAIS SENSIBLES A L'ANTIBIOTIQUE**

par MIRKO BELJANSKI (*).

(*Institut Pasteur, Service du Professeur MACHEBOEUF.*)

En étudiant les acides nucléiques chez diverses espèces bactériennes sensibles et résistantes à la streptomycine [4, 2] nous avons constaté que les souches streptomycino-résistantes étaient, à certaines périodes de leur prolifération, beaucoup plus riches en acide ribonucléique que les souches sensibles de mêmes espèces.

Nous nous sommes demandé si cette accumulation excédentaire d'acide ribonucléique par les souches résistant à la streptomycine était indissolublement liée au phénomène de la résistance. Nous avons voulu savoir, d'autre part, si, dans le cas des souches bactériennes que nous étudions, ce n'est pas seulement une fraction ribonucléique, sans lien avec la synthèse protéique, qui se trouve augmentée chez les souches résistant à la streptomycine. Pour cela, nous avons étudié les acides nucléiques chez plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella enteritidis* résistantes et sensibles à la streptomycine.

MATÉRIEL UTILISÉ. — *Espèces bactériennes.* — Pour nos études nous avons utilisé des souches de *Staphylococcus aureus* (n°s 131 et 133) et deux mutants de *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) sensibles et résistants à la streptomycine. (Toutes les souches sensibles proviennent de la collection de l'Institut Pasteur.) Les souches streptomycino-résistantes ont été obtenues par des subcultures en présence de doses croissantes d'antibiotique. Les deux mutants résistant à la streptomycine furent isolés par J. Servant [3]. La résistance de ces souches était de l'ordre de 3 000 µg de streptomycine par millilitre d'eau peptonée. Celle

(*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1953.

des souches normales était de l'ordre de 3 μ g d'antibiotique par millilitre de même milieu de culture.

CONDITIONS DE NOS EXPÉRIENCES. — Pour la préparation de l'inoculum, nous avons utilisé de l'eau peptonée et glucosée (20 g de peptone bactériologique pepsique) [U.C.L.A.F.], 4 g de NaCl et 2 g de glucose pour 1 000 ml d'eau). L'inoculum était étalé sur du bouillon gélosé contenu dans des boîtes de Roux. Deux séries de boîtes de Roux furentensemencées par des inocula de même masse prélevés à la dix-huitième heure dans des cultures respectives. Le milieu de culture ne contenait pas de streptomycine, car les bactéries résistantes, avant d'être utilisées, ont subi deux passages dans un milieu de culture (eau peptonée) sans antibiotique. Toutes les heures nous avons opéré des prélèvements dans une boîte de chaque série. Les bactéries furent récoltées, centrifugées à 2 000 g, lavées à l'eau distillée et mises en suspension dans de l'eau distillée. Sur 0,5 ml de cette suspension nous avons dosé l'azote total. Le reste de la suspension fut utilisé pour l'extraction des acides nucléiques d'après la méthode de Schneider [4]. L'acide ribonucléique fut dosé selon Mejbaum [5] et l'acide désoxyribonucléique selon Dische [6] (1). L'azote protéique fut déterminé sur le résidu bactérien après les extractions par l'acide trichloracétique à froid et à chaud.

RÉSULTATS OBTENUS. — Nos résultats sont exprimés en milligrammes de ribose d'acide ribonucléique par rapport au milligramme d'azote total, au début de la phase exponentielle de prolifération (tableau I).

ESPÈCES BACTÉRIENNES	RIBOSE de l'acide nucléique en mg/mg d'N		EXCÉDENT par rapport à la souche sensible p. 100
	Souche sensible	Souche résistante	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n° 131) . . .	0,305	0,525	73
<i>Staphylococcus aureus</i> (n° 133) . . .	0,375	0,580	54
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant G) . .	0,270	0,400	47
<i>Salmonella enteritidis</i> (mutant P) . .	0,285	0,626	120

Le taux d'acide ribonucléique est en excédent de 47 à 120 p. 100

(1) Le dosage du P nucléique nous a donné des résultats qui concordent assez bien avec ceux obtenus par les dosages colorimétriques du ribose et du désoxyribose des acides nucléiques.

chez les souches streptomycino-résistantes par rapport aux souches sensibles. Ce taux peut varier suivant l'expérience. L'accumulation excédentaire d'acide ribonucléique par les souches résistantes peut persister pendant un temps plus ou moins long selon l'espèce bactérienne.

Des dosages effectués sur des bactéries prélevées à la dix-huitième et à la vingt-quatrième heure de prolifération montrent que les souches résistantes sont beaucoup plus riches en acide ribonucléique que les souches sensibles de mêmes espèces. Parmi les espèces étudiées c'est seulement chez *Salmonella enteritidis* que les souches résistant à la streptomycine sont également plus riches en acide désoxyribonucléique que les souches sensibles.

Signalons qu'il est indispensable de vérifier la résistance des souches utilisées avant et après chaque expérience, car la diminution de la résistance au-dessous d'une certaine valeur peut notablement influencer les résultats.

Toutes les souches streptomycino-résistantes que nous avons étudiées jusqu'à présent accumulaient beaucoup plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles. L'accumulation de cet acide ne semble pas dépendre de la vitesse de prolifération. La vitesse de prolifération ne semble pas non plus dépendre du taux d'acide ribonucléique. Les souches de *Staphylococcus aureus* 133 et de *Salmonella enteritidis* (mutant G) résistant à la streptomycine ont une vitesse de prolifération identique à celle des souches sensibles, mais elles accumulent plus d'acide ribonucléique que les souches sensibles. D'autre part, les souches de *Staphylococcus aureus* 131 et de *Salmonella enteritidis* (mutant P) streptomycino-résistantes prolifèrent beaucoup plus lentement que les souches sensibles. Pourtant elles sont plus riches en acide ribonucléique. Plusieurs auteurs [7, 8, 9] ont d'ailleurs isolé des souches résistant à la streptomycine ayant soit une vitesse de prolifération moindre, soit une vitesse supérieure à celle des souches sensibles. On est amené à penser que la vitesse de prolifération d'une souche streptomycino-résistante dépendrait de la prédominance de tel ou tel type de mutant se trouvant dans cette population. D'après nos résultats, il semble que la vitesse de prolifération d'une souche streptomycino-résistante ne serait pas proportionnelle au taux d'acide ribonucléique de cette souche.

Voici, à titre de comparaison, les vitesses de prolifération et les taux d'accumulation d'acide ribonucléique des souches de *Salmonella enteritidis* (fig. 1 et 3) et de *Staphylococcus aureus* 133 (fig. 2 et 4) sensibles et résistantes à la streptomycine.

Dans nos études sur les acides nucléiques des souches streptomycino-résistantes nous n'avons pas observé de parallélisme entre les teneurs en acide ribonucléique et l'accumulation de protéines. Les souches résistantes accumulent des quantités considérables

d'acide ribonucléique, tandis que leur teneur en protéines reste identique à celle des souches sensibles.

Jeener et Brachet [10] ont montré l'existence, chez les Levures, de deux fractions distinctes d'acide ribonucléique. L'une est « fixée » aux microgranules cellulaires et l'autre se trouve à l'état « libre ». Pour ces auteurs, ce serait seulement l'acide granulaire

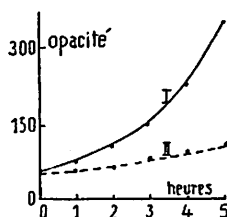


FIG. 1.

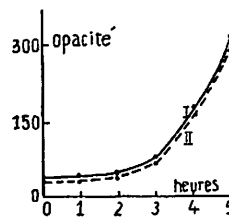


FIG. 2.

FIG. 1. — Courbes de prolifération de *Salmonella enteritidis*.
I. Souche sensible. II. Souche résistante (mutant P).

FIG. 2. — Courbes de prolifération de *Staphylococcus aureus* 133.
I. Souche sensible. II. Souche résistante.

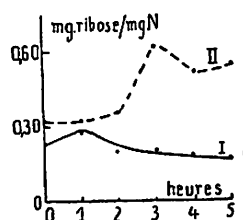


FIG. 3.

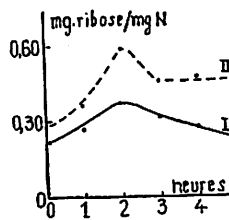


FIG. 4.

FIG. 3. — Ribose d'ac. nucléique de *Salmonella enteritidis*.
I. Souche sensible. II. Souche résistante (mutant P).

FIG. 4. — Ribose d'ac. nucléique de *Staphylococcus aureus* 133.
I. Souche sensible. II. Souche résistante.

qui interviendrait dans la synthèse protéique. Nous nous sommes demandé si l'acide ribonucléique accumulé en excédent par les souches streptomycino-résistantes se trouvait dans les bactéries à l'état non « lié » aux granules, ou bien « lié » à ceux-ci.

Pour cette étude nous avons appliqué le procédé que Jeener et Brachet [10] ont utilisé dans le cas des Levures.

Deux souches de *Salmonella enteritidis*, une sensible et une résistante (mutant P) à la streptomycine, ont été prélevées sur milieu gélosé dans des boîtes de Roux, à la dix-huitième heure

de leur prolifération. Après lavage par du tampon phosphate M/200 pH 7,2 les bactéries furent mises en suspension (tampon phosphate) et broyées dans un mortier en présence de sable de Fontainebleau pendant quinze minutes à 0°. Le broyat fut centrifugé à 2 000 g pendant quinze minutes pour éliminer les bactéries non broyées et les débris bactériens visibles. La solution opalescente fut soumise à l'ultracentrifugation (60 000 g pendant une heure) pour séparer les granules ultramicroscopiques des protéines qui restent dans le liquide surnageant (2). Les granules ultracentrifugés ont été lavés (tampon phosphate M/200), puis mis en suspension homogène dans le même tampon. D'autre part, les liquides de lavage ont été réunis au liquide surnageant initial.

Sur la suspension des granules nucléoprotéiniques et sur le liquide surnageant nous avons dosé l'azote total, l'acide ribonucléique et l'acide désoxyribonucléique. Pour doser les acides nucléiques nous avons utilisé les méthodes colorimétriques. Ces résultats furent contrôlés soit par le dosage du P nucléique, soit par l'absorption des U. V. par les bases puriques et pyrimidiques.

Nous pouvons admettre que les granules nucléoprotéiniques ne contiennent pratiquement pas d'acide ribonucléique ni d'acide désoxyribonucléique à l'état « libre ». Par contre, le liquide surnageant contient en assez grande abondance des acides nucléiques (ribo- et désoxyribonucléiques) à l'état « libre », mais leur dosage est rendu incertain par la présence éventuelle dans ce liquide de divers produits de dégradation de ces acides (nucléotides, nucléosides, oses, bases puriques et pyrimidiques, esters phosphoriques, ions phosphoriques).

RÉSULTATS OBTENUS DANS LE CAS DE « SALMONELLA ENTERITIDIS » (var. Danysz). — Nos résultats sont exprimés en milligrammes d'acide nucléique par rapport à l'azote total de l'échantillon étudié.

ACIDES NUCLÉIQUES	ACIDE ribonucléique		ACIDE désoxyribonucléique	
	Souche sensible	Souche résistante (P)	Souche sensible	Souche résistante (P)
Dans les granules	1,0	1,9	1,0	1,50
Dans la solution surnageante.	1,0	1,45	0,95	0,95

(2) L'ultracentrifugation a été effectuée par M. Slizewitz, que nous remercions très vivement.

Les granules provenant d'une souche streptomycino-résistante (mutant P) sont beaucoup plus riches en acide ribonucléique et en acide désoxyribonucléique que les granules provenant de la souche sensible. Par contre, dans le liquide séparé des granules, c'est seulement pour l'acide ribonucléique que nous observons une différence significative entre la souche résistante et la souche sensible.

D'après Jeener et Brachet, les cellules des levures contiendraient toujours la même quantité d'acide ribonucléique lié aux granules, tandis que la fraction non granulaire peut subir des variations importantes. Pour ces auteurs, la vitesse de prolifération des Levures serait proportionnelle à la teneur de la cellule en acide ribonucléique granulaire. Elle est indépendante de la teneur en acide ribonucléique non granulaire. Ces conclusions obtenues pour les levures ne semblent pas valables pour les bactéries streptomycino-résistantes. En effet, dans le cas des bactéries résistantes les granules nucléo-protéiniques sont plus riches en acide ribonucléique que les granules des bactéries sensibles, et pourtant la souche résistante a une vitesse de prolifération inférieure à celle de la souche sensible. D'autre part, Jeener et Brachet pensent que l'acide ribonucléique granulaire agit en tant qu'élément d'un organite sur la synthèse des protéines. Les bactéries streptomycino-résistantes sont beaucoup plus riches en acide ribonucléique granulaire que les bactéries sensibles, et pourtant le taux de protéines est identique à celui des bactéries sensibles. Il semble donc que les théories de Brachet et de Caspersson ne soient pas directement applicables aux souches streptomycino-résistantes. D'autres hypothèses doivent être envisagées. On peut, par exemple, penser que l'acide ribonucléique excédentaire dans les granules nucléo-protéiniques des souches résistantes a une structure particulière et n'intervient pas directement dans la synthèse protéique.

CONCLUSION. — 1° Les souches streptomycino-résistantes de diverses espèces bactériennes sont, à certaines périodes de leur prolifération, beaucoup plus riches en acide ribonucléique que les souches sensibles de mêmes espèces. Les souches de *Salmonella enteritidis* résistant à la streptomycine sont, en outre, plus riches en acide désoxyribonucléique que les souches sensibles.

2° La vitesse de prolifération des souches streptomycino-résistantes ne semble pas dépendre du taux d'acide ribonucléique.

3° Les microgranules provenant d'une souche de *Salmonella enteritidis* streptomycino-résistante (mutant P) sont beaucoup plus riches en acide ribonucléique et en acide désoxyribonucléique que les granules provenant de la souche sensible. La souche résistante est plus riche en fraction « libre » d'acide ribonucléique que la souche sensible.

4° Les souches résistantes accumulent des quantités considérables d'acide ribonucléique, tandis que leur teneur en protéines reste identique à celle des souches sensibles à la streptomycine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. BELJANSKI. *Ces Annales*, 1952, 83, 80.
- [2] M. BELJANSKI. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, 236, 1102.
- [3] J. SERVANT. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 894.
- [4] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1939, 258, 117.
- [5] W. MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, 258, 117.
- [6] Z. DISCHE. *Microchemie*, 1930, 8, 4.
- [7] A. R. ENGLISH et E. Mc Coy. *J. Bact.*, 1951, 62, 19.
- [8] J. SERVANT. *Thèse Doctorat ès Sciences*, 1953, Paris.
- [9] D. A. MITCHISON. *J. gen. Microbiol.*, 1953, 8, 168.
- [10] R. JEENER et J. BRACHET. *Enzymologia*, 1943-1945, 11, 222.