

CYCLE DU BACTÉRIOPHAGE CHEZ UNE BACTÉRIE LYSOGÈNE *

A. LWOFF

Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur, Paris.

Introduction

Les bactéries lysogènes sont des bactéries qui perpétuent héréditairement la propriété de produire des bactériophages. C'est en 1921 que Lisbonne et Carrère découvrent qu'une souche d'*Escherichia coli* produit un bactériophage qui lyse certaines souches de bacilles dysentériques appartenant au genre *Shigella*. Si les souches lysogènes n'avaient été, suivant la conception de d'Hérelle, qu'une population mixte, vaguement équilibrée, de bactéries peu sensibles et de bactériophages peu virulents, elles n'auraient pas présenté un grand intérêt. Mais Bordet ^{1, 2} montre en 1925 que, dans une souche lysogène, chacune des bactéries donne naissance à une colonie lysogène. Il en conclut que le bactériophage est « inscrit dans la trame héréditaire de la bactérie ». Et comme les bactéries lysogènes sont insensibles aux bactériophages qu'elles produisent, Bordet conclut également qu'elles « secrètent » des bactériophages sans en souffrir. On verra tout à l'heure ce qu'il faut penser de ce point de vue. Puis les travaux de Burnet & Lush ³ apportèrent à la connaissance des bactéries lysogènes des données d'une importance capitale; nous en résumons les principaux résultats :

1) On peut obtenir facilement des systèmes lysogènes en mélangeant des bactéries non lysogènes et des bactériophages convenablement choisis. Dans ces conditions, la grande majorité des bactéries infectées se lysent. Une faible proportion, disons de l'ordre de 10^{-7} , résiste, se multiplie, donnant naissance à des clones ^a qui se révéleront lysogènes.

2) Les bactériophages produits par ces souches lysogènes expérimentales sont identiques aux bactériophages originels. Les bactéries lysogènes perpétuent donc une particule spécifique.

3) La lyse expérimentale des bactéries lysogènes ne libère pas de bactériophages. Burnet & McKie ⁴ ont conclu de cette observation que le bactériophage se perpétue dans les bactéries lysogènes sous la forme d'une ébauche non infectieuse.

* Les travaux de l'auteur relatifs aux bactéries lysogènes ont été effectués grâce à une subvention du National Cancer Institute of the National Institutes of Health, US Public Health Service.

^a Un clone est l'ensemble des individus issus d'un individu unique par voie végétative ou asexuelle.

4) Dans une culture de bactéries lysogènes, seule une petite proportion des bactéries libèrent des bactériophages.

Les bactéries lysogènes, concluent les auteurs australiens, contiennent dans leur constitution héréditaire une unité capable de libérer des bactériophages. Cette unité est une ébauche. Pour qu'elle libère des bactériophages, une activation spontanée est nécessaire, qu'ils supposent devoir être analogue à celle qui intervient dans les réactions monomoléculaires ou les désintégrations radioactives.

C'est donc de 1929 que date la découverte fondamentale de la perpétuation d'un virus sous forme d'une ébauche non infectieuse et non virulente. Il s'écoulera plus de 20 ans avant que l'on ne redécouvre le stade non infectieux dans le cycle des bactériophages ordinaires et que l'on n'étende la notion de stade non infectieux aux virus de l'encéphalomyélite¹⁴ et de la grippe.^{8, 9}

Cependant, les recherches sur les bactéries lysogènes se multipliaient. On retiendra la découverte de la lysogénie chez *Bacillus megatherium* par den Dooren de Jong en 1931.^{6, 7} L'auteur hollandais montre que les spores du bacille donnent naissance à des clones lysogènes. Les recherches de Wollman & Wollman²⁵ effectuées au cours des années suivantes permettaient d'affirmer que la lyse lysozymique ne libère pas de bactériophages à partir de bactéries potentiellement lysogènes, confirmant ainsi la conclusion des auteurs australiens relative à l'existence d'un stade non infectieux du bactériophage.

Enfin, Northrop,²² en 1939, détermine l'augmentation du nombre des bactériophages et la production de gélatinase au cours de la croissance d'une culture de *B. megatherium* lysogène. Les courbes lui semblent parallèles, ce qui justifie à ses yeux la conclusion selon laquelle le bactériophage est un enzyme et que cet enzyme est « sécrété » durant la croissance bactérienne.

Limites de la statistique et du raisonnement

Admettons que dans une culture en voie de développement le rapport nombre de bactéries/nombre de bactériophages reste constant et que la valeur de ce rapport soit égale à l'unité. Ce résultat peut être, théoriquement, atteint de deux façons différentes : a) chacune des bactéries libère un bactériophage chaque fois qu'elle se divise ; b) dans l'intervalle de temps séparant deux divisions, un pourcentage donné de bactéries libérera de nombreux bactériophages, par exemple une bactérie sur 200 libérera 200 bactériophages. Dans ce cas, le taux de croissance théorique sera diminué de 0,5%, ce dont il est difficile de se rendre compte car l'on ne peut guère mesurer un taux de croissance avec une précision supérieure à 5%. L'étude d'une population bactérienne ne permet pas de choisir entre les hypothèses a) et b).

Si des *B. megatherium* lysogènes sont mis en contact avec les bactériophages qu'ils produisent, ces bactériophages sont adsorbés, et les bactéries continuent cependant à se développer. Les bactéries lysogènes sont manifestement résistantes aux bactériophages qu'elles libèrent. Dans les systèmes ordinaires, les mutants résistant à un bactériophage donné n'adsorbent pas ce bactériophage. On peut les qualifier de non réceptifs. La résistance d'une bactérie lysogène est, on le voit, toute différente puisqu'elle est pénétrée par le bactériophage; c'est une manière d'immunité. Il n'est donc pas surprenant que la conception de Bordet, en vertu de laquelle les bactéries lysogènes libèrent des bactériophages sans en souffrir, les « secrètent », ait été généralement acceptée.

Comment, en effet, concevoir a priori que l'un des stades seulement du cycle du bactériophage dans une bactérie lysogène présente un caractère pathogène ? Aucun raisonnement par analogie, aucune analyse mathématique du comportement d'une population, ne pouvait conduire à cette conclusion. Pour savoir ce qui se passe réellement, pour connaître la façon dont les bactéries lysogènes libèrent les bactériophages qu'elles produisent, il suffisait d'étudier un individu bactérien. Mais il fallait n'en étudier qu'un seul.

La lysogénie à l'échelon unitaire

Pour mettre en observation une bactérie unique, on a employé un appareil comprenant une boîte en matière plastique renfermant un rhéostat et un thermo-régulateur, et contenant en outre un microscope et deux micromanipulateurs.¹⁵ L'un, le micromanipulateur de Fonbrune, servira à prélever les bactéries, à les transférer de goutte en goutte et à prélever des échantillons de milieu. L'autre, le micromanipulateur de Zeiss-Peterfi, servira à maintenir et à déplacer une pipette Pasteur préalablement remplie de liquide. L'orifice de celle-ci pourra être amené au centre du champ du microscope, et il sera alors loisible d'injecter le contenu de la micropipette dans la pipette Pasteur. Celle-ci une fois chargée sera traitée comme une pipette ordinaire, c'est-à-dire que son contenu pourra être transféré sur un tube de gélose par exemple. Le milieu de culture utilisé pour les micromanipulations est déposé sur une lamelle, en gouttes de tailles diverses, les petites gouttes ayant un diamètre de 100 μ environ. Cette lamelle sera, suivant la technique classique, renversée sur une lame évidée, l'espace libre étant empli d'huile de paraffine qui empêche l'évaporation des guttules, permet la diffusion de l'oxygène et les mouvements de la micro-pipette.

Expérience 1

Un *B. megatherium* est prélevé dans une culture de bactéries lysogènes. Il est transféré successivement dans 5 grosses gouttes pour le débarrasser

des bactériophages libres qui pouvaient l'accompagner. Puis il est injecté dans une microgoutte de milieu nutritif. Après chacune des divisions, l'une des bactéries filles sera prélevée avec un peu de liquide. La bactérie prélevée sera transférée sur une boîte contenant de la gélose nutritive etensemencée préalablement avec une souche de *B. megatherium* sensible au bactériophage produit par la souche lysogène. Cette opération est répétée jusqu'à la 19^e division. A ce moment, les deux bactéries filles sont prélevées etensemencées avec tout le liquide de la microgoutte.

Chacune des 20 boîtes a montré une seule plage de lyse portant une colonie en son centre. Ainsi, chacune des bactéries a donné naissance à une colonie qui a produit des bactériophages, c'est-à-dire a fait souche d'un clone lysogène. S'il y avait eu libération de bactériophage dans la microgoutte au cours des 19 divisions, on aurait vu des plages de lyse sur la boîte. Il n'y en a eu aucune en dehors de la plage entourant la colonie lysogène. La lysogénie s'est donc maintenue au cours de 19 divisions en l'absence de tout bactériophage extrinsèque. Si la lysogénie était perpétuée grâce à des bactériophages extrinsèques, ceux-ci, dans notre expérience, devaient se trouver, à l'origine, à l'intérieur de la bactérie mise en œuvre. S'ils avaient été également répartis entre les bactéries filles au cours des 19 divisions, cela impliquerait que la bactérie originelle contenait plus de 2^{19} , soit plus de 524.288 bactériophages, ce qui est géométriquement impossible en raison des dimensions du bactériophage et de la bactérie. La lysogénie se perpétue donc par voie endomicrobienne, c'est-à-dire qu'elle est héréditaire.

Cette expérience montre aussi que des bactéries lysogènes peuvent se multiplier sans libérer de bactériophages. La libération de bactériophages, à l'inverse des synthèses d'enzymes constitutifs, n'accompagne donc pas obligatoirement la croissance et la division microbienne normales.

Expérience 2

Un filament de 4 bactéries est lavé et transféré en microgoutte, où il se multiplie. Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers etensemencés sur une souche de la bactérie sensible. Aucune des boîtes ne révéla la présence de bactériophage. Lorsque la microgoutte contient 64 bactéries, on y injecte du lysozyme. Les bactéries sont lysées. La totalité de la guttule est alors prélevée etensemencée sur la bactérie sensible. On ne voit aucune plage de lyse. *B. megatherium* lysogène ne renferme effectivement pas de particule infectieuse. Et cependant, dans toute population de bacilles suffisamment abondante, il y a toujours des bactériophages libres. Comment sont-ils libérés ?

Expérience 3

Un filament diplobacillaire est lavé et transféré dans une goutte de milieu neuf. Les bactéries se divisent. A la 65^e minute, il y a 8 bactéries;

on ne décèle aucun bactériophage. Entre la 85^e et la 89^e minute, on voit sous le microscope 4 bactéries disparaître successivement. La disparition est très rapide, l'observateur fixe une bactérie, et en moins d'une seconde celle-ci s'évanouit sans laisser de traces visibles. Cependant, dans la goutte où les 4 bactéries se sont lysées, il y avait 579 bactériophages. De nombreuses observations analogues ont été faites, la lyse bactérienne a souvent été observée. Trois minutes avant la lyse, il n'y avait pas de bactériophage libre. Les bactériophages sont libérés par la lyse bactérienne, et uniquement par la lyse, la lyse d'une bactérie libérant de 100 à 200 bactériophages.

Ainsi, dans une population de bactéries lysogènes, certaines bactéries se multiplient sans libérer de bactériophages : ce sont elles qui perpétuent la souche lysogène. D'autres bactéries se lysent en libérant des bactériophages : ce sont elles qui expriment le caractère lysogène. Il y a incompatibilité entre la perpétuation des bactéries lysogènes et la production de bactériophages. Les bactéries lysogènes perpétuent donc une particule spécifique non infectieuse et non pathogène, le probactériophage, qui, selon les apparences, se comporte comme une particule normale. Mais ce probactériophage représente un caractère léthal potentiel qui est tout entier dans son devenir hypothétique. C'est seulement si le probactériophage exprime ses potentialités en se développant en bactériophage que la bactérie sera tuée.

Les bactéries lysogènes peuvent, on l'a vu, adsorber les bactériophages qu'elles ont produit, apparemment sans en souffrir, à faible dose tout au moins. Le bactériophage n'est pas pathogène. La multiplication du probactériophage sous la forme de probactériophage est compatible avec la survie de la bactérie-hôte. Le probactériophage n'est pas pathogène. C'est le développement du probactériophage en bactériophage qui constitue le fait pathologique.

Facteurs extrinsèques et production de bactériophages

Dans une souche lysogène, certaines bactéries se multiplient donc normalement, sans produire ni libérer de bactériophages. D'autres produisent des bactériophages qu'elles libèrent par la lyse. Le problème de la nature des facteurs responsables de la production de bactériophages, c'est-à-dire de la transformation de probactériophages en bactériophages, s'est trouvé ainsi tout naturellement posé.

L'une des hypothèses concernant le déterminisme de la production des bactériophages était celle d'une mutation. Dans toute population de *B. megatherium* lysogène interviendrait une ou des mutations modifiant l'équilibre instable bactérie-probactériophage, mutation qui déclencherait la production de phages. Cependant, dans certaines des expériences en microgoutte qui ont été décrites précédemment, toutes les bactéries se multipliaient alors que dans d'autres, toutes, ou un pourcentage important,

se lysaient. Ce type d'observation avait imposé la ferme conviction que le déclenchement de la production des bactériophages était sous la dépendance de facteurs du milieu. Une longue série d'expériences de micro-manipulation n'apportèrent que des résultats négatifs. L'on résolut alors d'étudier la cinétique de la production des bactériophages dans des cultures en masse. Il se révéla immédiatement que celle-ci subissait des variations considérables au cours du développement d'une population.¹⁹

Une digression est ici nécessaire. Lorsque des germes microbiens se développent dans un milieu donné, le milieu se modifie continuellement. Des substances sont absorbées par les bactéries, d'autres sont excrétées, la tension d'oxygène, le potentiel d'oxydo-réduction subissent des variations importantes. Un milieu constant n'est réalisé que dans des dispositifs du type décrit par Monod²⁰ où, à volume constant, un apport constant de milieu neuf compense exactement la croissance bactérienne. Dans ces conditions, le rapport bactériophages/bactéries reste sensiblement constant et voisin de 1. Au contraire, dans les conditions ordinaires de culture, dans un tube ou dans une fiole conique, même aérée, ce rapport montre des variations considérables. Au début du développement, il varie entre 0,1 et 1. Mais, parfois, la densité optique des cultures subit une baisse de 30%, accompagnée d'une apparition de bactériophages : environ une centaine de bactériophages étant libérés par bactérie disparue. Le rapport phages/bactéries atteint alors 50 ou plus. La valeur de ce rapport variait donc dans les proportions de 1 à 500.

Notre conviction relative à l'intervention de facteurs externes dans le déterminisme de la production de bactériophages étant solidement ancrée, il s'agissait de définir les facteurs responsables du phénomène.

La baisse de la densité optique due à la lyse bactérienne n'avait été observée que dans des cultures ayant subi un développement assez important, atteignant $1,5$ à 2×10^8 bactéries par ml. Elle se produisait après une diminution du taux de croissance qui, dans les conditions de nos expériences, était due, directement ou indirectement, à un défaut d'oxygénation. Mais une diminution de la tension d'oxygène ne suffit pas à provoquer l'induction. L'addition de substances réductrices était sans effet. Et nous aboutissions, après de longs mois de travail, à la conclusion, assez décevante, que deux ou plusieurs facteurs devaient intervenir parmi lesquels le potentiel d'oxydo-réduction et des modifications du milieu provoquées par le développement même des bactéries.

Induction par agents physiques (radiations)

On décida alors de faire subir aux cultures une irradiation ultra-violette. Une culture de *B. megatherium* en milieu levuré fut divisée en 4 lots. L'un servit de témoin, les trois autres subirent des irradiations de temps variable. Puis la croissance des bactéries fut suivie à l'aide d'un électrophotomètre.

Durant 50 minutes, les bactéries irradiées se comportèrent comme le témoin non irradié. Mais à la 70^e minute, les bactéries irradiées avaient disparu alors que le témoin ne s'était pas lysé. Les dosages montrèrent que chacune des bactéries lysées avait libéré une centaine de bactériophages.¹⁹

Cette expérience a été répétée plusieurs milliers de fois. Chaque fois, après l'irradiation, la culture continue à croître à vitesse réduite, la densité optique est multipliée par un facteur 2 à 4. La lyse commence vers la 45^e minute. Et la totalité des bactéries disparaît en une vingtaine de minutes, cependant que des bactériophages apparaissent dans le milieu.

Ajoutons que si l'on observe des bactéries irradiées placées en microgoutte, on les voit se cloisonner. Les articles des filaments ainsi produits se lysent à quelques minutes d'intervalle, chacun des articles libérant une centaine de bactériophages. C'est donc bien la totalité des bactéries qui produit des bactériophages et les libère par la lyse.

Nous étions ainsi en possession d'un moyen d'induire la production de bactériophages chez la totalité des bactéries d'une population lysogène, c'est-à-dire d'induire le développement du probactériophage en bactériophage. Restaient à étudier les conditions de l'efficacité du choc inducteur et le mécanisme de son action. Le rayonnement ultra-violet était produit par une lampe en quartz à basse pression et haute tension, 90% de l'énergie correspondant à la longueur d'onde 2.537 Å, maximum d'absorption des acides nucléiques. L'efficacité des diverses longueurs d'onde n'a pas été encore étudiée. Les rayons X exercent le même effet inducteur que les rayons UV.

On pourrait être tenté de supposer que les agents inducteurs agissent en provoquant la lyse des bactéries, qui libéreraient ainsi des bactériophages. Mais plusieurs arguments s'opposent à cette manière de voir : 1) la lyse par le lysozyme ne libère pas de bactériophages ; 2) *B. megatherium* est aérobie strict ; en anaérobiose, il se lyse rapidement sans libérer de bactériophages ; 3) les souches non lysogènes irradiées ne se lysent pas.

L'irradiation ultra-violette semblait bien agir en déclenchant le développement du probactériophage en bactériophage. La lyse bactérienne était la conséquence de ce développement.

Période latente. Dans un système ordinaire — bactériophage virulent + bactérie sensible — la période latente est la période comprise entre le moment où le bactériophage pénètre dans la bactérie et le moment où la bactérie se lyse en libérant des bactériophages. Cette période est essentiellement caractérisée par un arrêt de la croissance bactérienne corrélatif à un arrêt des synthèses bactériennes. La bactérie ne synthétise plus d'acide ribonucléique, ni d'acide désoxyribonucléique bactérien. Sa respiration reste constante. Elle est incapable de synthétiser des enzymes et, en particulier, de produire des enzymes dits « adaptatifs ». Mais après une période latente de quelques minutes, le système fabriquera de l'acide désoxyribo-

nucléique qui sera exclusivement de l'acide désoxyribonucléique du bactériophage.

Dans un système lysogène, la période latente est la période qui s'écoule entre le choc inducteur et la lyse. On a vu que la croissance microbienne continue, à vitesse réduite et constamment décroissante. La respiration augmente; de l'acide ribonucléique est synthétisé; l'adaptation enzymatique est possible. La teneur du système en acide désoxyribonucléique reste constante pendant la moitié environ de la période latente, puis augmente très rapidement jusqu'à la lyse.²⁴

Dans un système ordinaire, tout se passe comme si le bactériophage détournait à son profit la quasi-totalité du métabolisme bactérien. Dans un système lysogène activé, la compétition est manifestement moins sévère. C'est ce que l'on peut démontrer à l'aide de *Pseudomonas pyocyanea* lysogène.¹⁰ La quantité de glucose mise à la disposition d'une bactérie par unité de temps (régime) sera constante tout au long d'une expérience, mais variera d'une expérience à l'autre.

S'il y a un excès de glucose, la croissance bactérienne après induction se fera comme chez *B. megatherium*. Avec un régime très réduit, il n'y aura pas de croissance bactérienne : le glucose sera entièrement utilisé par le bactériophage. Pour qu'un *P. pyocyanea* se divise, il lui faut 2×10^{10} molécules de glucose. Pour qu'il produise 100 bactériophages, 4×10^9 lui sont nécessaires.¹⁰ Quel que soit le régime, le bactériophage s'empare d'une quantité fixe de glucose, le pourcentage du glucose utilisé par le phage par rapport au métabolisme bactérien total varie entre 20 et 100 suivant le régime. On voit, en tout cas, que le bactériophage d'un système lysogène est relativement moins vorace que le bactériophage d'un système ordinaire. Mais il y a entre les deux systèmes un point commun : après l'infection chez l'un, après l'induction chez l'autre, la synthèse de l'acide désoxyribonucléique est complètement arrêtée. Du fait de la persistance des autres synthèses chez les bactéries lysogènes, cet arrêt prend toute sa signification.²³ Le développement du probactériophage en bactériophage a comme premier effet l'arrêt de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique. Le mécanisme de ce phénomène nous échappe pour le moment complètement.

Conditions de l'efficacité. Un rayonnement UV de 125 ergs par mm^2 suffit pour induire la production de bactériophages chez la totalité d'une population de *B. megatherium* en voie de croissance exponentielle en milieu à base d'extrait de levure. Pour induire des bactéries se développant en milieu synthétique renfermant du glucose comme seule substance organique, il faut une irradiation de 3.000 ergs par mm^2 . L'addition de divers acides aminés au milieu synthétique augmente la sensibilité à l'ultra-violet. Si les bactéries ont été soumises à un jeûne carboné, elles ne sont plus inductibles. Les bactéries peuvent donc se présenter sous deux états, « aptitude » et « inaptitude », reliés par une série d'états de transition. Suivant les condi-

tions physiologiques, elles réagiront ou non à l'irradiation par la production de bactériophages.¹⁶

Il ne suffit d'ailleurs pas que des bactéries aptes aient été irradiées pour qu'elles produisent des bactériophages. Des bactéries aptes et induites produisent des bactériophages et se lyseront dans un milieu à base d'extrait de levure. Elles se développeront normalement si elles sont transférées dans du bouillon peptoné. Si des bactéries aptes irradiées, c'est-à-dire induites, sont soumises à un jeûne carboné de 3 heures, elles se développeront normalement après addition de substances nutritives comme si elles n'avaient pas été irradiées. Un changement de milieu, le jeûne, peuvent donc dans certaines conditions supprimer l'effet inducteur d'une irradiation. Il en est de même des radiations visibles qui suppriment l'action inductrice des rayons UV et des rayons X.

Tout un ensemble de conditions sont donc nécessaires pour que les bactéries réagissent à l'irradiation UV par la production de bactériophages. La réalisation de ces conditions dépend manifestement du métabolisme de la bactérie avant et après l'irradiation.

Induction par agents chimiques

Par quel mécanisme l'irradiation déclenche-t-elle la production de bactériophages ? L'hypothèse la plus séduisante était que le choc inducteur agit en modifiant le métabolisme bactérien. L'effet inducteur des rayons X ou UV sur *B. megatherium* est-il lié à des oxydations ? Les réducteurs supprimeront-ils cet effet ? Avant de faire l'expérience, il fallait examiner l'effet des réducteurs à diverses concentrations sur des bactéries non irradiées. Des bactéries furent doncensemencées dans un extrait de levure additionné de thiomalate de sodium à diverses concentrations. Dans certains des tubes, la croissance continuait à taux réduit pendant 45 minutes; 20 minutes après, les bactéries avaient disparu. Les dosages montrèrent la présence de 200 bactériophages environ par bactérie disparue. L'acide thiomalique, en l'absence de toute irradiation, induit donc la production de bactériophages.¹⁸

Cette action inductrice de l'acide thiomalique n'est pas spécifique : l'acide thioglycollique, le glutathion réduit, l'acide L-ascorbique exercent le même effet. L'acide malique, le glutathion oxydé sont dépourvus d'activité. L'activité inductrice n'est manifestement pas liée à la présence de groupements -SH, mais plutôt aux propriétés réductrices des substances.

Ce serait cependant une grave erreur que d'attribuer aux réducteurs un pouvoir absolu d'induction. L'activité inductrice de l'acide thiomalique ne s'exerce que dans certains types de milieu. Pas d'activité inductrice en milieu synthétique, pas d'activité inductrice en bouillon et dans nombre de milieux peptonés. De plus, tous les extraits de levure de boulangerie ne sont pas toujours « activés » par l'acide thiomalique. Cette constatation

expliquait les résultats négatifs des premiers essais d'induction par des réducteurs. Mais tous les extraits de levure deviennent susceptibles d'« activation » par vieillissement. On se trouve ici en présence d'une situation manifestement fort complexe. L'identification de facteurs chimiques de l'induction vient de commencer et l'étude du mécanisme de leur action est à peine ébauchée.^b

L'équilibre et l'induction. L'équilibre d'un système lysogène est instable. Mais la stabilité varie d'une espèce lysogène à l'autre et dans une même espèce, d'une souche à l'autre. La physiologie comparée des systèmes lysogènes, à peine ébauchée, a fourni déjà des résultats importants qu'il serait trop long de discuter ici. Disons simplement que les systèmes lysogènes sont fort nombreux, qu'ils représentent probablement la forme primaire de perpétuation des bactériophages. Ajoutons enfin que les facteurs qui régissent l'équilibre de diverses espèces ou souches lysogènes apparaissent d'ores et déjà variables. Quoi qu'il en soit, le schéma fourni par l'étude de *B. megatherium* (fig. 1) représente un modèle d'un système lysogène.

Discussion

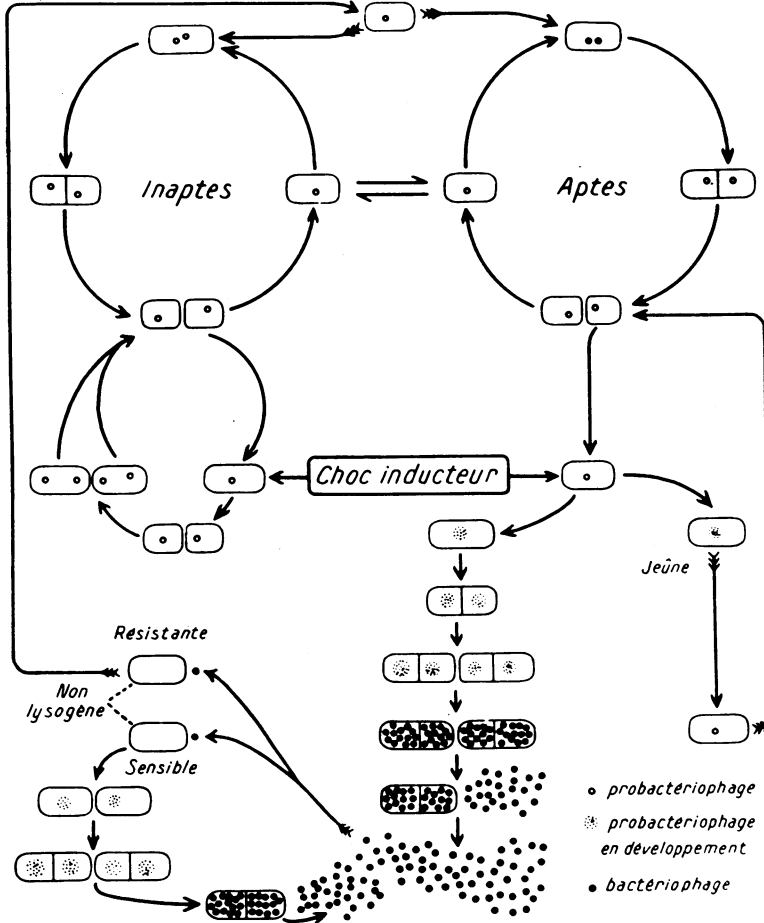
Le fait qu'une perturbation du métabolisme puisse induire le développement d'une particule non pathogène en virus, le fait surtout que ce développement soit léthal, oblige à considérer sous un angle nouveau le problème du mode d'action des substances nocives pour les bactéries.

La mise en évidence de l'action antagoniste du sulfanilamide et de l'acide *p*-aminobenzoïque est l'une des précieuses acquisitions de la biochimie. Mais cette découverte, comme toutes les grandes découvertes, est dangereuse parce qu'elle porte en elle le germe d'une religion. Le dogme de la compétition des substances bactériostatiques ou bactéricides avec un métabolite essentiel semble universellement admis, et sans doute est-ce bien là le mode d'action de quelques-unes d'entre elles. Mais s'agit-il bien d'un mécanisme universel ?

Une digression est ici nécessaire. Chez *Escherichia coli*, la β -galactosidase est un enzyme dont la biosynthèse se produit uniquement en présence d'un inducteur qui doit posséder la structure galactosidique. Or, d'après les recherches récentes de Monod, Cohen-Bazire & Cohn,²¹ il existe des mutants d'*E. coli* incapables d'utiliser le galactose comme aliment carboné et énergétique et chez lesquels ce glucide induit cependant la formation d'une protéine voisine de l'enzyme et qui ne sert à rien. Or, dans une société

^b Il vient d'être montré que les réducteurs n'exercent une action inductrice qu'en présence d'ion Cu^{++} . Or, l'oxydation de substances réductrices par le cuivre produit de l'eau oxygénée qui est effectivement inductrice.¹⁷ Divers peroxydes organiques, une éthylénimine¹⁸ et la bis (β -chloroéthyl) méthylamine²¹ sont également inducteurs. (Note de l'auteur communiquée le 11 juin 1952.)

FIG. 1. SCHÉMA D'UN SYSTÈME LYSOGÈNE



(Lwoff, Siminovitch, Kjelgaard 19)

de molécules et de particules, hautement organisée comme l'est un micro-organisme, tout ce qui n'est pas utile est nécessairement nuisible dans les conditions où s'exerce la concurrence vitale et la sélection naturelle. La biosynthèse d'une protéine « gratuite » doit détourner une partie de l'énergie et des métabolites de la bactérie-hôte. Elle représente une réaction ou une série de réactions qui, sans être pathogènes au sens étroit du terme, peuvent cependant être considérées comme « parasites » en ce sens qu'elles exercent une action spoliatrice.

De toute façon, à côté des protéines inutiles non létales et non infectieuses, du principe transformant du pneumocoque non létalement et infectieux et des bactériophages létaux et infectieux, il y a une place théorique pour des particules dont la biosynthèse serait létale et qui ne seraient pas infectieuses.^c C'est ici le lieu de se demander ce que peuvent bien représenter des antibiotiques comme la pénicilline ou la streptomycine pour l'organisme qui les produit. Jouent-ils simplement le rôle d'armes défensives ou offensives ? N'ont-ils pas en plus de leur activité nocive pour les organismes étrangers une fonction propre pour les organismes qui les synthétisent ? Ne pourraient-ils représenter par exemple des inducteurs de la biosynthèse de quelque enzyme ? Les arguments suivants peuvent être versés au débat :

1) Certains mutants bactériens résistant à la streptomycine sont « exigeants ». L'antibiotique est devenu pour eux un facteur de croissance, un métabolite indispensable pour la synthèse d'un des constituants du système catalytique respiratoire.²³

2) L'action nocive de la pénicilline ne s'exerce que pour autant que les bactéries exposées à son action se développent. En d'autres termes, pour que le déséquilibre létal provoqué par l'antibiotique se manifeste, il faut que les bactéries puissent effectuer des synthèses. On sait que chez certaines souches au moins la pénicilline peut induire la synthèse d'un enzyme, la pénicillinase. Il est permis de supposer que l'activité de la pénicilline n'est pas toujours limitée à l'induction de cette protéine inoffensive.

3) Chacun sait que les antibiotiques inhibent *in vivo* nombre de réactions. Mais le fait qu'une réaction soit bloquée est, en lui-même, dépourvu de signification quant au mécanisme même de l'inhibition. Celle-ci peut être due à l'inhibition fonctionnelle d'un enzyme. Mais elle pourrait être imputable aussi à l'inhibition de la biosynthèse d'un système enzymatique causée par l'activation d'un système compétiteur. Il ne s'agit pas là d'une hypothèse entièrement gratuite. L'étude de la synthèse des enzymes adaptatifs et du développement des bactériophages a en effet révélé l'existence de compétitions entre les éléments constitutifs ou normaux d'une part et les précurseurs des enzymes adaptatifs et des bactériophages d'autre part.

Bien entendu, la conception selon laquelle l'activité létale de certains antibiotiques serait due aux conséquences du développement anormal ou du foisonnement exagéré d'une molécule ou d'une particule reste une conception purement théorique.

Il est donc aujourd'hui possible, par l'action d'agents inducteurs physiques ou chimiques, de contraindre une bactérie à transformer une particule inoffensive en virus. Le problème de la nature des facteurs qui

^c Ce type de particules a été effectivement découvert depuis le symposium de Rome : la bactérie colicinogène *E. coli* ML perpétue héréditairement le pouvoir de synthétiser une colicine. La synthèse de cette substance qui peut être induite par divers agents physiques ou chimiques est létale (Jacob, Siminovitch & Wollman ^{12, 13}). (Note de l'auteur communiquée le 11 juin 1952.)

interviennent dans la différenciation d'une particule, ou si l'on préfère, dans le développement d'un virus, est désormais accessible à l'expérimentation.

SUMMARY

Lysogenic bacteria are bacteria which perpetuate hereditarily the property of forming bacteriophages.

On the whole, data concerning the biology of lysogenic bacteria, particularly the transmission of lysogenesis by the spores, led to the conclusion that lysogenesis is transmitted intrabacterially. Research carried out with a single *Bacillus megatherium* in microdrops has supplied a firm basis for this theory, and has confirmed that lysogenesis is maintained in the absence of extrinsic bacteriophages.

The specific particle endowed with genetic continuity which perpetuates lysogenesis is not infectious and, so far as we know, behaves like a normal particle. Microdrop experiments show that lysogenic bacteria can multiply without liberating bacteriophages: the liberation of bacteriophages consequently need not necessarily accompany growth and division. These observations have also shown that the bacteriophages are liberated by lysis, and by lysis only.

A study of the kinetics of the appearance of the phage during the development of the cultures leads to the conclusion that the production of the bacteriophages depends on external factors. Under certain conditions, irradiation with ultraviolet or x-rays induces the production of bacteriophages by every organism in a bacterial population. Trophic factors govern this ability to react to the ultraviolet inductive stimulus by the production of bacteriophages. Culture in a synthetic medium considerably impairs this ability, which is suppressed by starvation and enhanced when the organism is grown in the presence of mixtures of amino-acids.

RÉSUMÉ

Les bactéries lysogènes sont des bactéries qui perpétuent héréditairement la propriété de former des bactériophages.

L'ensemble des données relatives à la biologie des bactéries lysogènes, en particulier la transmission de la lysogénie par les spores, avait conduit à la conclusion que la lysogénie se perpétue par voie intrabactérienne. Les recherches effectuées sur des *Bacillus megatherium* isolés en microgouttes ont solidement assis cette notion et montré que la lysogénie se maintient effectivement en l'absence de bactériophage extrinsèque.

Le corpuscule spécifique doué de continuité génétique qui assure la fonction lysogène n'est pas infectieux et se comporte selon toute apparence comme un corpuscule normal. Les expériences en microgouttes montrent que les bactéries lysogènes peuvent se multiplier sans libérer de bactériophages: la libération de bactériophages n'accompagne donc pas obligatoirement la croissance et la division. Ces observations ont montré aussi que les bactériophages étaient libérés par la lyse et uniquement par la lyse.

L'étude de la cinétique de l'apparition du phage au cours du développement des cultures conduit à la conclusion que la production des bactériophages est sous la dépendance de facteurs externes. Une irradiation aux rayons ultra-violet ou aux rayons X induit, dans certaines conditions, la production de bactériophages chez la totalité des germes d'une population bactérienne. Des facteurs trophiques conditionnent l'« aptitude », c'est-à-dire la possibilité de réagir au choc inducteur ultraviolet par production de bactériophages. L'aptitude est considérablement diminuée par la culture en milieu synthétique, supprimée par le jeûne carboné, augmentée par des mélanges d'acides aminés.

In the case of *B. megatherium*, bacteriophage-production by "apt" bacteria after induction depends upon various factors. It may be suppressed by exposure to visible light, by carbon-starvation, or by a mere change of environment. Under certain conditions, thiomalic acid, thioglycollic acid, or reduced glutathione and L-ascorbic acid induce the production of bacteriophages. Extracts of certain yeasts have the same effect. After the inductive stimulus the optical density of the bacterial cultures is increased two to four times. This increase is accompanied by the synthesis of respiratory enzymes, adaptive enzymes, and ribonucleic acid.

After the inductive stimulus, the deoxy-ribonucleic-acid content of the bacteria first remains constant and then rapidly increases.

In the case of *Pseudomonas pyocyanea*, bacterial growth after stimulation or infection may be suppressed by a deficient diet. Everything seems to indicate that the developing bacteriophage makes use of a fixed amount of energizing, ternary nutrient. Since the bacterium uses only the surplus, bacterial growth can take place only when the amount of nutrient supplied exceeds the requirements of the bacteriophage itself. For division, one *P. pyocyanea* requires 2×10^{10} molecules of glucose. To produce 100 bacteriophages it requires 4×10^9 molecules of glucose.

Lysogenic bacteria live in equilibrium with a specific particle endowed with genetic continuity: the probacteriophage. Under the influence of an inductive stimulus (ultra-violet or x-rays) or a change in metabolism caused by reducing substances or other substances of an unknown nature, the equilibrium is destroyed. The probacteriophages then develop into bacteriophages which are liberated by lysis of the bacterium. The probacteriophage is not pathogenic; it is the development from probacteriophage into bacteriophage which constitutes the pathological feature.

L'expression de la lysogénie chez *B. megatherium*, c'est-à-dire la production de bactériophages après induction de bactéries aptes, dépend de facteurs divers. Elle peut être supprimée par la lumière visible, par le jeûne carboné, ou par un simple changement de milieu. Dans certaines conditions les acides thiomalique et thioglycollique, le glutathion réduit et l'acide L-ascorbique induisent la production de bactériophages. Les extraits de certaines levures exercent le même effet. Après le choc inducteur la densité optique des cultures bactériennes est multipliée par un facteur 2 à 4. Cette croissance est accompagnée d'une synthèse des systèmes respiratoires, d'enzymes adaptatifs et d'acide ribonucléique.

Après le choc inducteur la teneur des bactéries en acide déoxyribonucléique reste constante tout d'abord, puis augmente rapidement.

La croissance bactérienne après induction ou infection peut être, chez *P. pyocyanea*, supprimée par un régime carboné déficient. Tout se passe comme si le bactériophage en voie de développement utilisait à son profit une quantité fixe d'aliment carboné énergétique. La bactérie n'utilisant que le surplus, la croissance bactérienne ne peut donc se faire que lorsque la quantité d'aliment fournie dépasse les besoins propres du bactériophage. Un *P. pyocyanea* a besoin pour doubler de 2×10^{10} molécules de glucose. Il a besoin pour former 100 bactériophages de 4×10^9 molécules de glucose.

Les bactéries lysogènes vivent en équilibre avec une particule spécifique douée de continuité génétique: le probactériophage. Sous l'influence d'un choc inducteur (rayons X ou UV) ou d'une modification du métabolisme apportée par des substances réductrices ou d'autres substances de nature inconnue, l'équilibre est rompu. Les probactériophages se développent alors en bactériophages qui seront libérés par la lyse de la bactérie. Le probactériophage n'est pas pathogène; c'est le développement du probactériophage en bactériophage qui constitue le fait pathologique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bordet, J. (1925) *Ann. Inst. Pasteur*, **39**, 717
2. Bordet, J. (1925) *C.R. Soc. Biol., Paris*, **93**, 1054
3. Burnet, F. M. & Lush, D. (1936) *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **14**, 27
4. Burnet, F. M. & McKie, M. (1929) *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **6**, 21, 277
5. Cohn, M. & Torriani, A. M. (1951) *C.R. Acad. Sci., Paris*, **232**, 115
6. Den Dooren de Jong, L. E. (1931) *Zbl. Bakt.* **120**, 1
7. Den Dooren de Jong, L. E. (1931) *Zbl. Bakt.* **122**, 277
8. Henle, W. & Henle, G. (1949) *J. exp. Med.* **90**, 23
9. Hoyle, L. (1948) *Brit. J. exp. Path.* **29**, 390
10. Jacob, F. (1951) *C.R. Acad. Sci., Paris*, **232**, 1605
11. Jacob, F. (1952) *C.R. Acad. Sci., Paris*, **234**, 2238
12. Jacob F., Siminovitch, L. & Wollman, E. *Ann. Inst. Pasteur* (A paraître)
13. Jacob, F., Siminovitch, L. & Wollman, E. *C.R. Acad. Sci., Paris* (A paraître)
14. Koprowsky, H. & Hennette, E. H. (1944) *J. Bact.* **48**, 463
15. Lwoff, A. & Gutman, A. (1950) *Ann. Inst. Pasteur*, **78**, 711 *
16. Lwoff, A. (1951) *Ann. Inst. Pasteur*, **81**, 370
17. Lwoff, A. & Jacob, F. *C.R. Acad. Sci., Paris* (A paraître)
18. Lwoff, A. & Siminovitch, L. (1951) *C.R. Acad. Sci., Paris*, **232**, 1146
19. Lwoff, A., Siminovitch, L. & Kjelgaard, N. (1950) *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 815
20. Monod, J. (1950) *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 390
21. Monod, J., Cohen-Bazire, G. & Cohn, M. (1951) *Biochim. biophys. Acta, Amst.* **7**, 585
22. Northop, J. H. (1939) *J. gen. Physiol.* **23**, 59
23. Schaeffer, P. (1950) *Ann. Inst. Pasteur*, **78**, 624
24. Siminovitch, L. & Rapkine, S. (1951) *C.R. Acad. Sci., Paris*, **232**, 1603
25. Wollman, E. & Wollman, E. (1937) *C.R. Soc. Biol., Paris*, **124**, 931

* On trouvera dans ce mémoire les références aux travaux publiés dès 1925.