

## LIBÉRATION D'ACIDE NUCLÉIQUE PAR LES CELLULES BACTÉRIENNES SOUS L'ACTION DE LA CHALEUR

Professeur L. CALIFANO

Directeur de l'Institut de Microbiologie de l'Université de Naples

Le phénomène dont il est question dans le présent article a été récemment décrit par Califano<sup>a</sup> : il s'agit de la libération d'acide nucléique<sup>a</sup> par les cellules bactériennes sous l'action de la chaleur. Cette libération se produit à des températures diverses suivant les espèces bactériennes. Pour certains germes, comme le gonocoque et le pneumocoque, à 45°C déjà, il y a nettement séparation d'acide nucléique, qui passe en solution; la quantité augmente à mesure que la température s'élève. Pour d'autres espèces, au contraire, telles que *Staphylococcus aureus*, quelques indices de cette élimination apparaissent à des températures variant entre 50° et 60°C, mais c'est seulement entre 65° et 70°C que ce phénomène se manifeste pleinement, et la quantité d'acide nucléique éliminée est alors assez élevée. D'autre part, pour certaines espèces, le pneumocoque et le bacille de Friedlaender par exemple, la quantité d'acide nucléique qui se sépare va en augmentant avec la température jusqu'à ce que celle-ci atteigne 100°C. Pour d'autres espèces, au contraire — par exemple *Escherichia coli*, *Staph. aureus* (fig. 1 et 2)<sup>b</sup> ou *Bacillus subtilis* — il existe une température optimum en dehors de laquelle la quantité d'acide nucléique en solution est moindre. Ce fait est particulièrement évident dans le cas de *Staph. aureus*. Ce germe, ainsi que nous l'avons dit, n'élimine, à 50°C, que des traces d'acide nucléique; à 60°C, l'élimination est très légèrement supérieure; à 70°C, en revanche, elle atteint son maximum — phase quasi critique— et la quantité d'acide nucléique éliminée est alors considérable; au-dessus de 70°C, l'élimination diminue à mesure que la température s'élève.

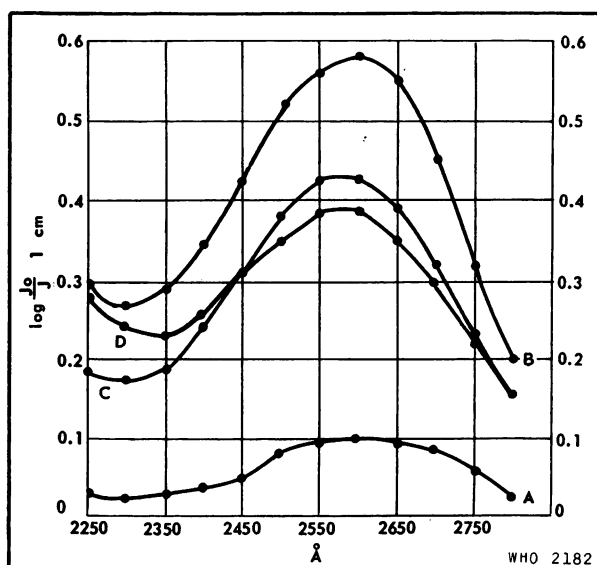
Cette constatation a permis de définir, dans le cas de certaines espèces bactériennes, une température optimum pour la séparation de l'acide nucléique des cellules; par cette expression « température optimum », on entend la température à laquelle la quantité d'acide nucléique éliminée atteint son maximum. La température optimum est de 60°C pour *E. coli* et de 70°C pour *Staph. aureus* et pour *B. subtilis*. Comme il a été dit plus

<sup>a</sup> Le terme « acide nucléique » est employé au cours de cet article dans son sens générique sans qu'il soit précisé de quelle forme il s'agit (mononucléotide ou polynucléotide).

<sup>b</sup> La quantité d'acide nucléique est déterminée par le coefficient d'absorption dans l'ultra-violet, du liquide de centrifugation de suspensions bactériennes.

haut, pour certaines espèces, le phénomène atteint son maximum à une certaine température (température optimum), mais débute à une température nettement plus basse : on peut donc distinguer un intervalle critique dont la limite inférieure est donnée par la température minimum à laquelle l'acide nucléique commence à s'éliminer et dont la limite supérieure est la température optimum. La température optimum semble être la température à partir de laquelle la coagulation des protéines cytoplasmiques entrave

**FIG. 1. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - I. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE E. COLI**



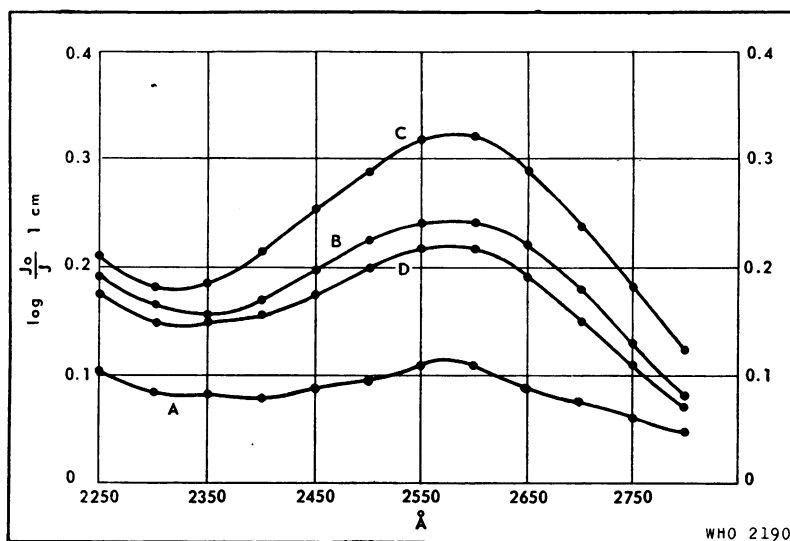
Température d'exposition :

A 50°C    B 60°C    C 70°C    D 80°C

l'élimination de l'acide nucléique. Tant que cette coagulation ne se produit pas, l'acide nucléique continue à se séparer des cellules et à passer en solution. Au contraire, lorsque commence la dénaturation protéinique, cette séparation n'est plus possible, soit que, dans le cas de l'acide nucléique des nucléoprotéines, l'action de la chaleur s'oppose à la rupture des liaisons chimiques qui unissent cet acide à la protéine, soit que, s'il s'agit de nucléotides libres, le coagulum protéinique les retienne et empêche la libération de l'acide nucléique. Des recherches récentes, effectuées au moyen de précipitants des protéines, donnent également à penser que la dénaturation protéinique s'oppose à la libération de l'acide nucléique des cellules bactériennes; s'il en est ainsi, la quantité d'acide nucléique, bien que minime, qui apparaît dans les suspensions de cellules exposées à des températures

supérieures à la température de coagulation des protéines, est libérée avant que cette température soit atteinte, c'est-à-dire dans l'intervalle critique par lequel les cellules passent nécessairement. Cette interprétation est confirmée par le fait déjà cité qu'au delà de la température optimum, la quantité d'acide nucléique éliminé diminue en proportion inverse de la température, parce que la durée de l'intervalle critique est évidemment d'autant plus brève que la température à atteindre est plus élevée.

**FIG. 2. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - II. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE STAPH. AUREUS**



Température d'exposition :

A 50°C    B 60°C    C 70°C    D 80°C

Quand on discute de l'action antagoniste de la coagulation protéinique sur la libération d'acide nucléique par la chaleur, il faut prendre en considération le phénomène de « flash sterilization » décrit par Dubos.<sup>16</sup> Cet auteur a observé que des pneumocoques portés à 75°C cessaient d'être Gram-positifs et, de ce fait, ne convenaient plus aux recherches avec les enzymes qui ont pour effet de rendre les cellules Gram-négatives; ce phénomène a été également relevé par Dubos & MacLeod,<sup>17</sup> lors de recherches sur l'activité d'un enzyme leucocytaire et tissulaire qui agit sur les pneumocoques. Pour pallier cet inconvénient, Dubos propose la méthode de « flash sterilization », qui consiste à immerger une petite quantité de cellules vivantes dans de l'eau distillée, préalablement portée à 75°C. De cette façon, la plus grande partie des cellules restent Gram-positives. Il est évident

que l'immersion des cellules dans une eau portée à 75°C provoque la coagulation instantanée des protéines cytoplasmiques, ce qui a pour effet d'empêcher l'élimination d'acide nucléique par la chaleur et, par conséquent, l'élimination de cette fraction d'acide nucléique dont dépend la propriété de prendre le Gram, qui, d'après les recherches de Henry & Stacey,<sup>20</sup> serait du ribonucléate de magnésium.

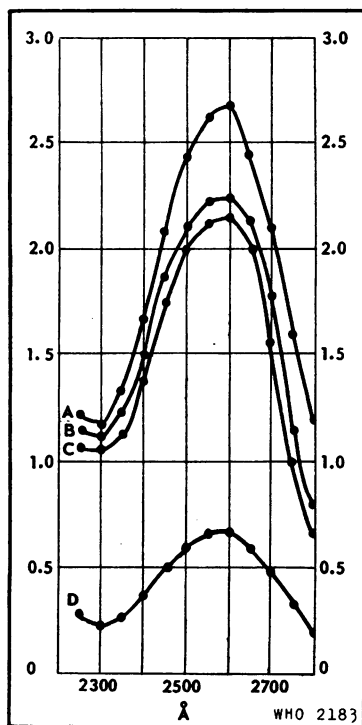
Des recherches récentes de Cavallo<sup>12</sup> ont aussi montré que l'on obtient une élimination d'acide nucléique plus forte par un chauffage progressif que par la méthode de « flash sterilization », et que, par conséquent, le nombre de cellules devenues Gram-négatives est beaucoup plus élevé avec la première méthode.

Il a été dit précédemment que certaines bactéries ont un comportement différent de celui qui vient d'être décrit : en effet, il n'existe pas, pour elles, de température optimum ; à mesure que la température augmente, la quantité d'acide nucléique qui passe en solution s'élève également, ne serait-ce que faiblement. Tel est le cas du gonocoque et du pneumocoque. Le précipité protéinique qui se forme lorsque ces germes sont exposés à des températures élevées est probablement peu compact et plutôt fragmentaire : en d'autres termes les corps bactériens se désagrègent plutôt qu'ils ne se coagulent, et l'acide nucléique passe en solution par un phénomène d'extraction qui est vraisemblablement différent du phénomène d'élimination observé sous l'effet de la chaleur. Cette explication est rendue plausible par le fait que même les germes pour lesquels il existe une température optimum (staphylocoque par exemple) éliminent, à 100°C, une plus grande quantité d'acide nucléique qu'à 90°C. En effet, à cette dernière température, les cellules sont encore intactes quoiqu'elles contiennent du cytoplasme coagulé qui retient l'acide nucléique, tandis qu'à 100°C, par suite de la désagrégation des cellules, il y a extraction d'acide nucléique préalablement retenu dans le coagulum cytoplasmique.

L'âge des cellules joue un rôle important dans l'élimination de l'acide nucléique sous l'effet de la chaleur. Des recherches déjà anciennes entreprises par Henrici<sup>19</sup> avaient montré que le volume des cellules jeunes est supérieur au volume des cellules adultes au repos ; il est généralement admis aujourd'hui en cytologie bactérienne que les cellules sont plus grosses pendant la phase de latence que pendant les phases suivantes. Les recherches bien connues de Malmgren & Hedén,<sup>21</sup> entreprises au moyen de l'appareil de Caspersson, ont montré que l'absorption à 2.575 Å est beaucoup plus intense dans les cellules sur le point de se multiplier que dans les cellules au repos, ce qui prouve l'existence d'une plus grande quantité d'acide nucléique dans les premières. Au fur et à mesure que les cellules s'éloignent de la période de mitose, l'absorption diminue progressivement jusqu'à rejoindre la valeur minimum correspondant aux cellules au repos. Ce fait confirme pour les bactéries la théorie de Caspersson,<sup>11</sup> à savoir que la synthèse de l'acide nucléique précède celle des protéines cytoplasmiques.

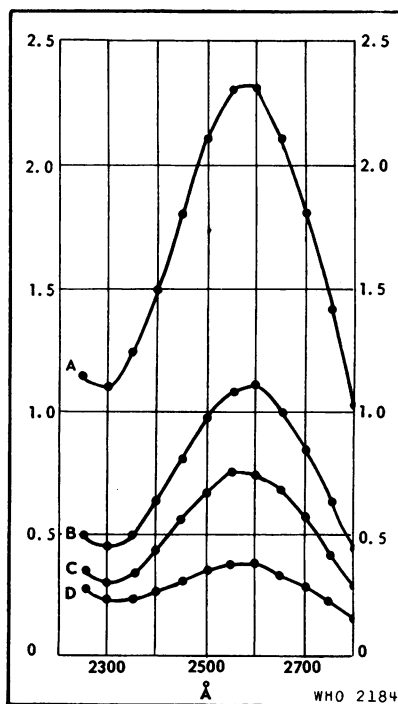
En ce qui concerne l'effet de la chaleur sur l'élimination de l'acide nucléique, Cantelmo<sup>9</sup> a trouvé que la quantité d'acide nucléique éliminé est sensiblement plus élevée dans les cellules au cours de la phase de latence ou des périodes immédiatement postérieures (jusqu'à 12 heures) que dans les cellules âgées de 24 heures (fig. 3 et 4). Il existe un certain rapport entre l'âge des cellules et l'élimination de l'acide nucléique, même dans les douze premières heures. En effet, ce sont les cellules de 4 heures qui produisent la plus grande quantité d'acide nucléique, tandis que les cellules plus âgées produisent des quantités progressivement inférieures. Toutefois, il ne s'agit que de différences minimales. En revanche, la diversité est manifeste chez les cellules âgées de 24 heures. Il est intéressant de noter que chez les cellules jeunes, la température optimum est la même que chez les cellules adultes (par exemple, 60°C pour *E. coli* et 70°C pour le *Staph. aureus*). On remarque,

**FIG. 3. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - III. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE *E. COLI***



Exposition : 10 minutes à 60°C  
 A Cellules âgées de 4 heures  
 B Cellules âgées de 8 heures  
 C Cellules âgées de 12 heures  
 D Cellules âgées de 24 heures  
 (D'après Cantelmo<sup>9</sup>)

**FIG. 4. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - IV. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE *STAPH. AUREUS***



Exposition : 10 minutes à 70°C  
 A Cellules âgées de 4 heures  
 B Cellules âgées de 8 heures  
 C Cellules âgées de 12 heures  
 D Cellules âgées de 24 heures  
 (D'après Cantelmo<sup>9</sup>)

au contraire, une légère différence aux températures inférieures : c'est ainsi que pour *E. coli* et pour le staphylocoque, il se produit à 50°C, avec des cellules jeunes, une élimination faible mais évidente d'acide nucléique, alors que ce phénomène n'apparaît pas avec les germes de 24 heures.

Les recherches effectuées jusqu'ici ne permettent pas de déterminer si les cellules jeunes éliminent une plus grande quantité d'acide nucléique que les cellules adultes, simplement parce qu'elles contiendraient une plus grande quantité d'acide nucléique ou parce que leur teneur en nucléotides libres serait plus forte.

L'exposition de spores de *B. subtilis* et de *B. anthracis* à des températures allant jusqu'à 120°C ne provoque pas la libération d'acide nucléique, contrairement à ce qui se produit avec les formes végétatives des deux bacilles, dont le comportement est tout à fait analogue à celui de bactéries non sporogènes.

Nous ne pouvons guère donner de détails sur le mécanisme qui régit la séparation de l'acide nucléique des cellules bactériennes, car les recherches n'en sont qu'à leur stade initial. On peut affirmer que l'acide nucléique libéré est du type ribonucléique, comme le démontre la réaction de Bial, nettement positive. Il n'est pas encore possible de préciser la formule de cet acide ni de dire s'il s'agit de mononucléotides à l'état libre dans la cellule bactérienne ou de mononucléotides séparés d'une molécule plus complexe de polynucléotides sous l'effet de la chaleur. Ce n'est qu'à des températures élevées, par exemple à 100°C, que se produit l'extraction d'acide désoxyribonucléique ou de nucléotides qui réagissent positivement à la *p*-diphénylamine (réaction de Dische); mais dans ce dernier cas, ainsi qu'on l'a déjà dit, la structure cellulaire s'altère profondément sous l'action de la chaleur et cette désorganisation est sans rapport avec l'élimination d'acide nucléique à des températures inférieures à celle où se produit la coagulation des protéines.

Il est possible que la chaleur provoque la rupture de la liaison acide nucléique-protéine, ainsi que le suggèrent les recherches de Cohen & Stanley.<sup>13</sup> Ces deux savants ont obtenu la séparation par la chaleur de l'acide nucléique de la nucléoprotéine dans une préparation cristallisée du virus de la mosaïque du tabac; cette méthode a d'ailleurs été, par la suite, employée par d'autres auteurs.

On peut, en tout cas, exclure l'hypothèse de phénomènes d'autolyse activés par la température, car le temps d'exposition qui suffit à provoquer l'élimination d'acide nucléique est trop bref pour permettre une réaction enzymatique de type autolytique. En effet, cinq minutes suffisent pour obtenir l'élimination de la quasi-totalité de l'acide susceptible d'être libéré à la température considérée, et dix minutes plus tard, le phénomène est terminé, c'est-à-dire que, même si l'on prolonge le temps pendant lequel les bactéries sont maintenues à cette température, la quantité d'acide nucléique libéré n'augmentera pas. Par contre, si l'on élève à nouveau la

température, il se produira une nouvelle élimination d'acide nucléique. Ce comportement ne correspond nullement à la cinétique des réactions enzymatiques. On pourrait certes penser qu'à 60°C une réaction est encore possible grâce à un ferment du type ribonucléase qui interviendrait comme catalyseur, mais il serait difficile de croire à une réaction enzymatique dont la température optimum serait 70°C, comme dans le cas du staphylocoque.

Le phénomène de la séparation de l'acide nucléique des cellules bactériennes sous l'effet de la chaleur a également été utilisé pour étudier le mode d'action du lysozyme. On sait que des germes tels que *Micrococcus lysodeikticus* et certaines sarcines sont fortement sensibles à cet enzyme, si bien qu'ils se trouvent lysés après quelques minutes et que le liquide de suspension devient très visqueux en raison de la libération, sous l'action de l'enzyme, du mucopolysaccharide substratum du lysozyme contenu dans les cellules. La viscosité du liquide diminue ensuite du fait de la dépolymérisation du mucopolysaccharide provoquée par ce même enzyme. Ce phénomène, mis en évidence par Caselli,<sup>10</sup> a été ultérieurement utilisé par Meyer & Hahnel<sup>22</sup> pour déterminer l'activité du lysozyme. D'autres germes, tels que *B. subtilis* ou un bacille thermophile, *B. stearothermophilus* (Militzer et collaborateurs<sup>23, 24, 25</sup>), sont moins sensibles que les précédents, mais la lyse est néanmoins très prononcée et la viscosité du liquide de la suspension augmente également.

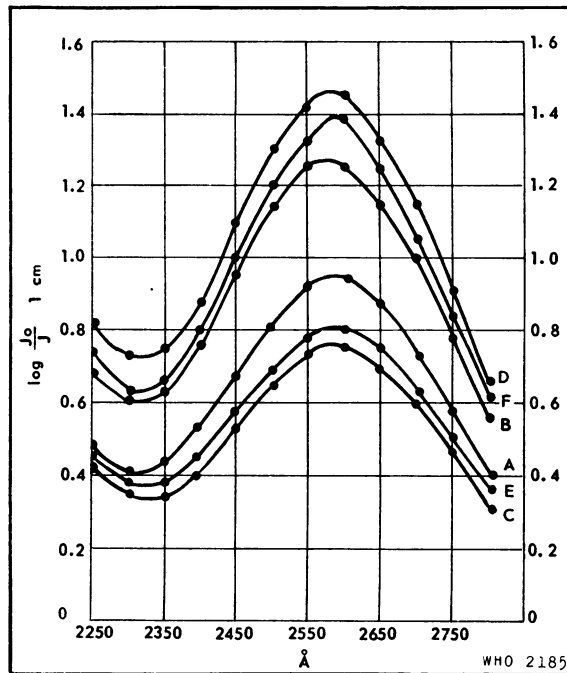
D'autres bactéries, comme le pneumocoque, sont médiocrement sensibles, c'est-à-dire que leur sensibilité ne provoque pas une augmentation de la viscosité de la suspension, quoique les cellules subissent des modifications morphologiques aisément décelables au microscope (Cutinelli<sup>15</sup>). Il existe enfin des bactéries — *Escherichia coli*, *Proteus* X 19, ou *Klebsiella pneumoniae*, par exemple — qui ne sont pas du tout sensibles au lysozyme : en effet, il n'y a ni lyse des cellules, ni modifications de leur structure et encore moins augmentation de la viscosité du liquide de la suspension et, d'autre part, l'acide nucléique ne passe pas dans la suspension, contrairement à ce qui se produit avec les germes sensibles, quel que soit leur degré de sensibilité. On peut donc dire que la mise en évidence d'acide nucléique dans une suspension de cellules soumises à l'action du lysozyme est un indice très sûr de la sensibilité bactérienne à cet enzyme (Califano<sup>5</sup>).

Webb<sup>27</sup> avait déjà observé que certaines bactéries — *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus jaecalis* et *Clostridium welchii* par exemple — ne sont pas sensibles au lysozyme tant qu'elles sont vivantes, mais le deviennent lorsqu'elles ont été exposées à une température de 80°C. On vient de découvrir (Califano<sup>8</sup>) que ce phénomène se produit aussi bien avec les germes sensibles au lysozyme tels que *B. subtilis* qu'avec les germes peu sensibles tels que *Proteus* X 19 ou *E. coli*. L'exposition des cellules bactériennes à la chaleur augmente la sensibilité à l'enzyme et même la fait apparaître dans les germes qui n'étaient pas sensibles auparavant. Ce phénomène se traduit également, pour certaines espèces, par le fait que

les suspensions microbiennes deviennent moins troubles; dans tous les cas, il se manifeste par la quantité d'acide nucléique qui passe en solution et que l'on peut apprécier au spectrophotomètre.

La figure 5 montre les courbes d'absorption dans l'ultra-violet de suspensions de cellules d'*E. coli* réparties à des températures variables, puis mises en contact avec le lysozyme.

**FIG. 5. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - V. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE *E. COLI***



Exposition à températures variables, puis à 37°C pendant 2 heures

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| A 80°C sans lysozyme | D 90°C avec lysozyme  |
| B 80°C avec lysozyme | E 100°C sans lysozyme |
| C 90°C sans lysozyme | F 100°C avec lysozyme |

L'interprétation que l'on peut donner de ce phénomène résulte des constatations qui précèdent : la chaleur provoque la séparation de l'acide nucléique des cellules bactériennes, qui sont alors exposées à l'action de la molécule de polysaccharide de l'enzyme, tandis qu'auparavant la couche d'acide nucléique qu'il faut supposer externe les protégeait du contact de l'enzyme. Il s'ensuit qu'il existe dans toutes les espèces bactériennes examinées jusqu'ici une couche de mucopolysaccharide située dans la profondeur de la cellule ou, du moins, sous-jacente à l'acide nucléique cytoplas-



mique, et qui devient superficielle après élimination de l'acide nucléique par la chaleur.

Dans les germes très sensibles tels que *Micrococcus lysodeikticus*, le mucopolysaccharide est disposé en couches successives allant de la périphérie vers l'intérieur et constituant, en quelque sorte, la trame du cytoplasme : la dépolymérisation provoquée par l'enzyme dans les couches les plus superficielles cause donc une désagrégation de la structure périphérique de la cellule, puis les couches successives entrent en contact avec l'enzyme et en subissent l'action, finalement la cellule bactérienne se désagrège jusqu'à la lyse complète. Dans les bactéries non sensibles ou peu sensibles, la couche mucoïde superficielle est nettement plus faible, voire inexistante; l'action du lysozyme est nulle ou à peine perceptible, c'est-à-dire qu'elle se limite à la couche externe sans provoquer de désagrégation de la structure. Lorsque les nucléotides superficiels de la cellule sont séparés sous l'effet de la chaleur, l'action du lysozyme sur la couche mucoïde interne devient possible, et il se produit une lyse plus ou moins prononcée de la cellule.

Webb<sup>27</sup> avait déjà pensé qu'il pouvait exister deux couches mucoïdes dans *Micrococcus lysodeikticus*. Il avait admis l'existence d'une couche externe parce qu'en soumettant le staphylocoque à l'action du lysozyme, il avait obtenu des quantités faibles mais réelles de sucres réducteurs sans que le germe devienne Gram négatif. Le lysozyme avait donc agi sur un constituant situé extérieurement à la substance Gram positive. Webb avait, d'autre part, admis l'existence d'une couche plus profonde du polysaccharide en se fondant sur les recherches d'Epstein & Chain<sup>18</sup> qui ne réussirent à extraire le polysaccharide ni par l'eau ou le formamide à froid, ni par le glycol éthylénique, alors que le produit isolé est soluble dans ces corps.

En conclusion, s'il est vrai que la sensibilité d'une bactérie au lysozyme dépend de l'existence dans les cellules du substratum de l'enzyme, c'est-à-dire du mucopolysaccharide, on peut admettre que la sensibilité des cellules vivantes correspond à la quantité de cette substance que l'on trouve à leur périphérie. En revanche, la sensibilité dont font preuve les cellules bactériennes tuées par la chaleur est fonction de la quantité de mucopolysaccharide situé plus à l'intérieur des cellules, ce constituant n'entrant en contact avec l'enzyme qu'au moment où l'acide nucléique périphérique des cellules même est éliminé sous l'effet de la chaleur.

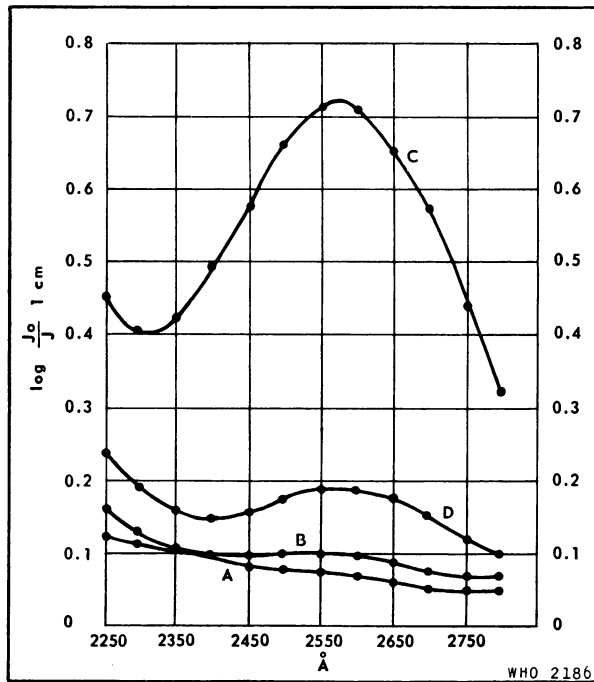
Le phénomène de la libération de l'acide nucléique par la chaleur a été également appliqué à l'étude de l'action des rayons ultra-violets sur les bactéries.

Des suspensions de *E. coli* ou de *Staph. aureus* exposées pendant une heure à l'irradiation d'une lampe germicide n'éliminent qu'une quantité infime ou négligeable de nucléotides.

En revanche, si l'on irradie par les ultra-violets des suspensions de ces mêmes bactéries et si on les expose à la chaleur pendant 10 minutes (60°C pour *E. coli* et 70°C pour *Staph. aureus*), la quantité de nucléo-

tides passant en solution est nettement inférieure à celle que libèrent des cellules non irradiées. Les figures 6 et 7 reproduisent respectivement les courbes d'absorption dans l'ultra-violet de liquides de centrifugation obtenus à partir de suspensions de *E. coli* et de *Staph. aureus* exposées à la chaleur après avoir été ou non préalablement irradiées.

**FIG. 6. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - VI. LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS DE *E. COLI***

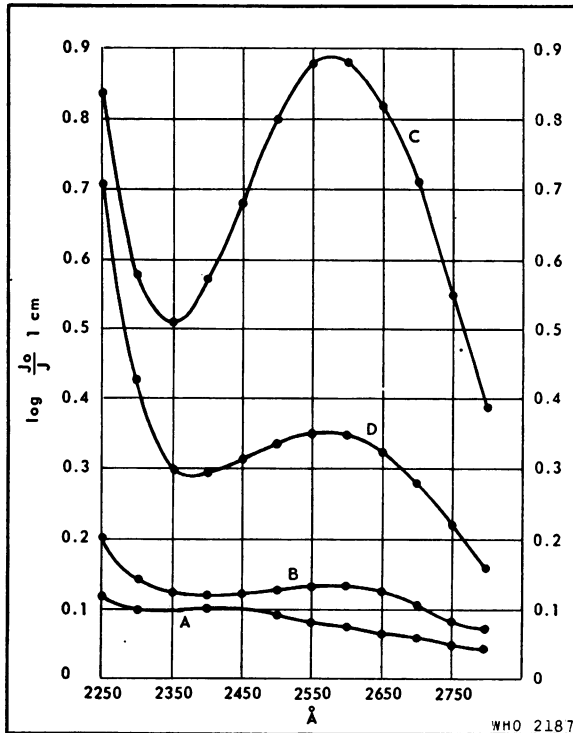


- A Cellules non irradiées  
 B Cellules irradiées par UV durant 1 heure  
 C Cellules non irradiées exposées pendant 10 minutes à 60°C  
 D Cellules irradiées par UV durant 1 heure, puis exposées pendant 10 minutes à 60°C

On a recherché si l'action des rayons ultra-violet s'exerce sur le cytoplasme ou directement sur l'acide nucléique déjà éliminé par les cellules sous l'action de la chaleur. A cet effet, on a exposé des cellules bactériennes à la température optimum pour provoquer la séparation de l'acide nucléique ; les liquides obtenus au moyen de la centrifugation à 16.000 tours ont été irradiés pendant une heure au moyen de la lampe germicide. On a constaté que cette irradiation provoque une diminution évidente du pouvoir d'absorption à 2.575 Å, ce qui signifie

qu'il s'est produit une destruction des groupes chromophores de l'acide nucléique. Ce type de photolyse a été mis en évidence de façons diverses au cours de ces dernières années, mais aucune recherche importante n'a été effectuée sur le mécanisme physico-chimique qui le régit et l'on ne connaît pas sa signification biologique.

**FIG. 7. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - VII.  
LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS  
DE STAPH. AUREUS**



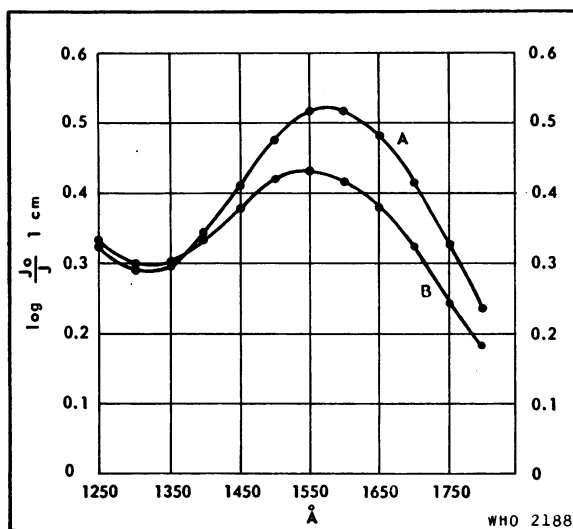
- A Cellules non irradiées  
 B Cellules irradiées par UV durant 1 heure  
 C Cellules non irradiées exposées pendant 10 minutes à 70°C  
 D Cellules irradiées par UV durant 1 heure, puis exposées pendant 10 minutes à 70°C

La figure 8 indique l'acide nucléique éliminé sous l'effet de la chaleur par *E. coli* et la figure 9, l'acide nucléique éliminé par *Staph. aureus*. Si l'on compare respectivement ces deux figures aux figures 6 et 7, on s'aperçoit que la photolyse des bases azotées des acides nucléiques n'est qu'en partie responsable de la diminution d'absorption dans l'ultra-violet des liquides de suspension de bactéries irradiées et exposées à la chaleur.

La diminution de l'absorption est due en grande partie à la quantité plus faible de nucléotides que libèrent, sous l'action de la chaleur, les cellules irradiées. La diminution correspondante des pentoses prouvée par la réaction de Bial en apporte également la confirmation.

On en déduit donc que l'irradiation des cellules bactériennes par les rayons ultra-violet a pour effet de réduire le passage de l'acide nucléique du protoplasme dans la suspension. On observe également dans celle-ci un certain degré de photolyse des bases azotées de l'acide nucléique. La

**FIG. 8. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - VIII.  
LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS  
DE E. COLI**



Exposition : 10 minutes à 60°C

A Liquide non irradié B Liquide irradié par UV durant 1 heure

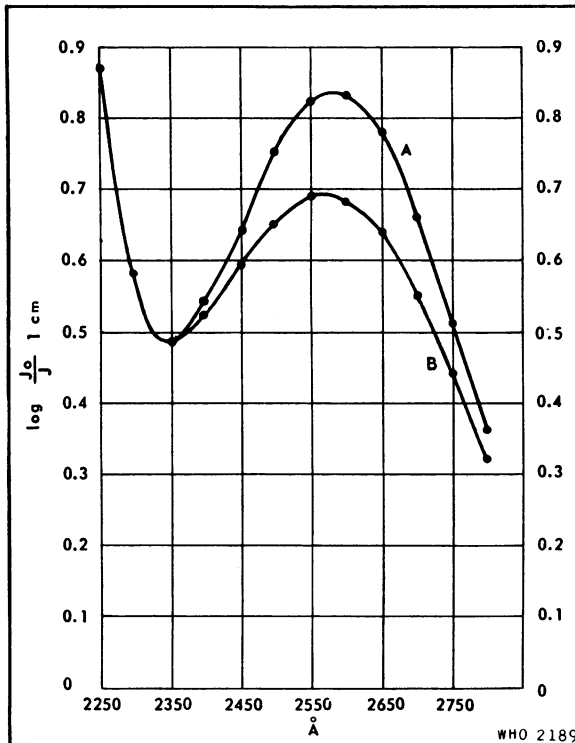
suspension de cellules irradiées a un pouvoir d'absorption moins grand que celle de cellules non irradiées, par suite d'une diminution de l'acide nucléique et de la photolyse qui se produit.

L'action inhibitrice exercée par l'irradiation sur les cellules est vraisemblablement due à une coagulation des protéines, qui semble empêcher la séparation des nucléotides. Cette coagulation peut être causée soit par l'action directe des rayons ultra-violets, soit par le phénomène de la « sensibilisation à la chaleur ».

Certaines observations ont révélé que les rayons ultra-violet déterminent la coagulation de constituants protoplasmiques. Anderson & Duggar<sup>1</sup> notamment ont constaté sur fond noir l'apparition de granules réfringents dans les œufs irradiés ; ce fait est imputable à la formation de précipités protéiniques dans le cytoplasme.

Le phénomène de la sensibilisation à la chaleur — qui correspond à un abaissement du seuil de sensibilité à la chaleur (coagulation protéinique, mort des cellules, etc.) sous l'effet de rayons ultra-violets — s'applique également aux protéines en solution et aux cellules, ainsi que l'ont découvert Bovie et al.<sup>3</sup> au cours de leurs études sur les paramécies. Il s'applique

**FIG. 9. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET - IX.  
LIQUIDE DE CENTRIFUGATION DE SUSPENSIONS  
DE STAPH. AUREUS**



Exposition : 1 heure à 70°C

A Liquide non irradié B Liquide irradié par UV durant 1 heure

de même aux levures (Anderson & Duggar<sup>2</sup>) et aux spores bactériennes (Curran & Evans<sup>14</sup>). Tout récemment encore, Oster & McLaren<sup>26</sup> ont trouvé qu'il se produisait également avec le virus de la mosaïque du tabac.

Ce phénomène peut intervenir dans la libération de l'acide nucléique sous l'effet de la chaleur en abaissant la température optimum. Nous savons que cette température est de 60°C pour *E. coli*, dans le cas de cellules non irradiées ; elle peut être plus basse pour les cellules irradiées, et la température de 60°C, agissant alors comme dénaturant, limite la libération des nucléotides cytoplasmiques.

## SUMMARY

The exposure of bacterial cells to heat causes the separation of ribonucleic acid which passes into solution; this can be demonstrated by determining the ultra-violet absorption of the liquid (maximum at 2,570 Å) or by the Bial test.

The temperature at which this process is initiated depends on the species of bacteria and bears a certain relationship to the temperature of inactivation by heating in the presence of moisture, in the sense that, for bacteria which are inactivated at a higher temperature as, for example, the staphylococci, it begins at 60°C and reaches its maximum value at 70°C, while for more sensitive bacteria, such as the pneumococci, the process begins at 45°C. The liberation of nucleic acid does not depend on the heat denaturation of proteins because it begins at a lower temperature. On the contrary, in some cases, the onset of protein coagulation diminishes the amount of nucleic acid which passes into solution; for example, with the staphylococcus the amount which separates at 68°-70°C is much greater than that which separates at a high temperature. This is probably due to the fact that protein coagulation includes in the precipitate nucleic acid which therefore does not pass into solution. From young cells (lag phase and phase of logarithmic growth) the action of heat liberates much more nucleic acid than from quiescent cells. From spores (*Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*) not even at 120°C is nucleic acid liberated. The heat separation of nucleic acid is observed from both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

If bacterial cells such as *Escherichia coli* are irradiated with ultra-violet light and then subjected to heat, the quantity of nucleic acid which is liberated is significantly smaller than that from non-irradiated cells. This is due in part to the coagulating action of ultra-violet light on proteins, and in part to the reduced absorption power of irradiated nucleic

## RÉSUMÉ

L'exposition de cellules bactériennes à la chaleur provoque la séparation d'acide ribonucléique qui passe en solution. Ce phénomène peut être démontré par la détermination de l'absorption dans l'ultra-violet (au maximum à 2.570 Å) et par le test de Bial.

La température à laquelle le processus s'amorce dépend de l'espèce bactérienne et présente un certain rapport avec la température d'inactivation par la chaleur humide: c'est ainsi que chez les bactéries pour lesquelles la température d'inactivation est élevée, les staphylocoques par exemple, le phénomène s'observe dès 60°C et atteint son maximum à 70°C, tandis que chez les bactéries plus sensibles, tels que les pneumocoques, le processus débute à 45°C. La libération de l'acide nucléique ne dépend pas de la dénaturation des protéines par la chaleur, car il commence à une température inférieure. Au contraire, dans certains cas, la coagulation des protéines qui survient provoque une diminution de la quantité d'acide nucléique qui passe en solution; c'est ainsi que, pour le staphylocoque, la quantité éliminée est plus considérable à 68-70°C qu'à une température plus élevée. Il est probable que le coagulum formé par les protéines englobe l'acide nucléique, qui, par conséquent, ne peut passer en solution. La chaleur libère plus d'acide nucléique des cellules jeunes — en phase de latence ou de croissance logarithmique — que des cellules au repos. Les spores, celles de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus anthracis*, ne libèrent pas d'acide nucléique, même à 120°C. La libération d'acide nucléique par la chaleur s'observe aussi bien chez les bactéries Gram-positives que Gram-négatives.

Les cellules bactériennes, telles que celles d'*Escherichia coli* soumises aux rayons ultra-violet puis à la chaleur libèrent des quantités d'acide nucléique moindres que les cellules non irradiées. Ce fait est dû, d'une part, à la coagulation des protéines sous l'action de ce rayonnement et, d'autre part, au pouvoir d'absorption restreint de l'acide nucléique irradié.

acid. In fact, by liberating nucleic acid from bacterial cells by means of heat and irradiating the liquid by ultra-violet light, it is shown that the absorption power at 2,600 Å is lowered.

Some bacteria, as for example *Escherichia coli*, which have little or no sensitivity to the action of lysozyme, become sensitive when heat-treated. This fact may be explained by assuming that the nucleic acid occupies a surface position in these cells and the lysozyme substrate lies beneath it. The removal of the nucleic acid layer by heating exposes this substrate and allows it to be acted upon by the enzyme. This explanation is made more probable by the fact that, with fairly sensitive bacteria, the action of heat increases their sensitivity to lysozyme. From this it can be maintained that, in sensitive bacteria, the polysaccharide depolymerized by lysozyme is disposed in two layers—a surface layer and a deep layer—the sensitivity observed corresponding to the action of the lysozyme on the superficial layer. When heating is applied, both the layers are depolymerized. In bacteria with little or no sensitivity, the surface layer does not exist and only after the nucleic acid has been removed by heating does depolymerization of the internal layer become possible, since contact between the enzyme and its substrate is then possible.

C'est ainsi que l'on a montré que le coefficient d'absorption à 2.600 Å d'un liquide contenant de l'acide nucléique extrait des bactéries par la chaleur et irradié était abaissé.

Certaines bactéries, telles que *E. coli*, qui ne sont que peu ou pas sensibles à l'action du lysozyme, y deviennent sensibles lorsqu'elles ont été traitées par la chaleur. Ce fait peut s'expliquer si l'on admet que l'acide nucléique est disposé à la surface des cellules et que le substrat du lysozyme lui est sous-jacent. L'élimination sous l'effet de la chaleur de la couche d'acide nucléique met à découvert le substrat du lysozyme qui est alors soumis à l'action de l'enzyme. Cette explication paraît d'autant plus plausible que l'action de la chaleur augmente la sensibilité au lysozyme des bactéries déjà relativement sensibles. Ce fait semble indiquer que le polysaccharide dépolymérisé par le lysozyme est disposé en deux couches chez les bactéries sensibles : l'une superficielle, l'autre profonde. La sensibilité observée correspondrait à l'action du lysozyme sur la couche superficielle ; lorsque l'on fait intervenir la chaleur, les deux couches sont dépolymérisées. Chez les bactéries dont la sensibilité est nulle ou faible, la couche superficielle n'existe pas, et la dépolymérisation de la couche interne ne peut s'effectuer que lorsque l'acide nucléique a été éliminé par la chaleur, le contact entre l'enzyme et le substrat étant alors établi.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Anderson, T. F. & Duggar, B. M. (1939) *Science*, **40**, 358
2. Anderson, T. F. & Duggar, B. M. (1941) *Proc. Amer. phil. Soc.* **84**, 661
3. Bovie, W. T. & Daland, G. A. (1923) *Amer. J. Physiol.* **66**, 55
4. Bovie, W. T. & Klein, A. (1918) *J. gen. Physiol.* **1**, 331
5. Califano, L. (1949) *Boll. Ist. sieroter. Milano*, **28**, 366
6. Califano, L. (1950) *Boll. Ist. sieroter. Milano*, **29**, 364
7. Califano, L. (1950) *R.C. Accad. Lincei, Ser. 8*, **8**, 94
8. Califano, L. (1950) *R.C. Accad. Lincei, Ser. 8*, **9**, 142
9. Cantelmo, P. (1950) *R.C. Accad. Lincei, Ser. 8*, **9**, 104
10. Caselli, P. (1943) *Boll. Ist. sieroter. Milano*, **22**, 336
11. Caspersson, T. (1947) *Symp. Soc. exp. Biol. N.Y.* **1**, 127
12. Cavallo, G. (1950) *Nuovi Ann. Igiene Microbiol.* **1**, 414

13. Cohen, S. S. & Stanley, W. M. (1942) *J. biol. Chem.* **144**, 589
  14. Curran, H. R. & Evans, F. R. (1938) *J. Bact.* **36**, 455
  15. Cutinelli, C. (1949) *Riv. Ist. sieroter. ital.* **24**, 157
  16. Dubos, R. J. (1937) *J. exp. Med.* **65**, 873
  17. Dubos, R. J. & MacLeod, C. M. (1938) *J. exp. Med.* **67**, 791
  18. Epstein, L. A. & Chain, E. (1940) *Brit. J. exp. Path.* **21**, 339
  19. Henrici, A. T. (1928) *Morphologic variation and the rate of growth of bacteria*, Springfield, Ill. (Microbiology Monographs : General, Agricultural, Industrial, Vol. 1)
  20. Henry, H. & Stacey, M. (1946) *Proc. roy. Soc. B.* **133**, 391
  21. Malmgren, B. & Hedén, C. G. (1947) *Acta path. microbiol. scand.* **24**, 417
  22. Meyer, K. & Hahnel, E. (1948) *J. biol. Chem.* **163**, 723
  23. Militzer, W., Sonderegger, T. B., Tuttle, L. C. & Georgi, C. E. (1949) *Arch. Biochem.* **24**, 75
  24. Militzer, W., Sonderegger, T. B., Tuttle, L. C. & Georgi, C. E. (1950) *Arch. Biochem.* **26**, 299
  25. Militzer, W., Tuttle, L. C. & Georgi, C. E. (1951) *Arch. Biochem.* **31**, 416
  26. Oster, G. & McLaren, A. D. (1950) *J. gen. Physiol.* **33**, 215
  27. Webb, M. (1948) *J. gen. Microbiol.* **2**, 260
-