

173. Nouvelles méthodes de dosage de certains cations métalliquespar **G. Schwarzenbach.**

(15 VI 46)

Ces méthodes¹⁾ sont fondées sur les propriétés de quelques acides amino-polycarboxyliques, spécialement de l'acide nitrilo-triacétique $N(CH_2COOH)_3$, de l'acide uramile-diacétique $C_4H_3O_3N_2-N(CH_2COOH)_2$ et de l'acide éthylènediamine-tétracétique $(HOOCCH_2)_2N-CH_2CH_2-N(CH_2COOH)_2$. Les anions de ces acides forment des complexes stables avec la plupart des cations métalliques, même avec les alcalino-terreux, le lithium et le sodium. Cette formation de complexes peut être utilisée pour le dosage volumétrique de ces métaux. Nous avons mis au point trois modes d'emploi. La fin du titrage des deux premières méthodes est marquée par un effet de p_H utilisant le virage d'un indicateur coloré. Pour la troisième méthode, on utilise un indicateur donnant un composé coloré avec le cation à doser. Les cations suivants: Li, Mg, Ca, Sr, Ba, Zn, Hg, Cd, Cu, Fe, Co, Ni, Mn et Ce peuvent être dosés à l'aide de ces méthodes. Certains complexes du Co(III) avec l'acide éthylènediamine-tétracétique forment des précipités insolubles avec l'ion potassium. Cette propriété peut être utilisée pour effectuer un dosage gravimétrique, volumétrique ou colorimétrique du potassium.

Zurich, Institut de Chimie de l'Université.

174. Rôle de l'acide désoxy-ribonucléique hautement polymérisé dans le déterminisme des caractères héréditaires des bactéries.**Signification pour la biochimie générale de l'hérédité**par **André Boivin et Roger Vendrely.**

(26 V 46)

Nous avons montré antérieurement²⁾ que les colibacilles peuvent exister sous de très nombreux types distincts: les types simultanément

¹⁾ Comparer *G. Schwarzenbach*, Schw. Ch. Z. **28**, 181, 377 (1945); *G. Schwarzenbach, E. Kampitsch et R. Steiner*, Helv. **28**, 828, 1133 (1945); **29**, 364 (1946); *G. Schwarzenbach, W. Biedermann et F. Bangerter*, Helv. **29**, 811 (1946).

²⁾ *Boivin, Corre et Lehault*, C. r. Soc. Biol. **136**, 98, 257 et 432 (1942); **137**, 42, 138, 410 et 714 (1943); *Bl. Acad. Méd.* **127**, 95, 125 et 162 (1943); *Rev. Immunol.* **7**, 97 (1942).

ment présents dans la flore fécale différent beaucoup de sujet à sujet et, chez un même sujet, d'une semaine à l'autre ou même d'un jour à l'autre; tout porte à croire qu'il existe des centaines, voire des milliers de types de colibacilles. Chacun d'eux est défini par le détail de ses propriétés biochimiques (comportement à l'égard des divers sucres, des divers polyalcools, des divers acides aminés, etc.) et surtout par la possession d'un polysaccharide spécifique particulier, caractérisé tout à la fois par son comportement sérologique (précipitation par l'anticorps correspondant) et par sa constitution chimique (nature et proportions des sucres, des acides uroniques, des hexosamines pouvant entrer dans sa composition). Dans l'ensemble de ces types, il semble possible de distinguer des groupes, dont chacun serait défini par la spécificité propre des protéines constituant les germes. Mais c'est là une question qui demeure encore à l'étude dans notre laboratoire et l'inventaire de ces groupes, comme aussi bien celui des types renfermés dans chaque groupe, reste à faire. Nous nous sommes préoccupés de rechercher les interactions possibles entre des colibacilles différents appelés à vivre côte-à-côte dans le même milieu nutritif et nous avons effectué, dans ce but, de multiples expériences depuis plusieurs années, expériences dont nous ne saurions rapporter ici le détail¹). Au cours de ces études, nous avons rencontré un phénomène de « mutation dirigée »: nous avons vu un colibacille imposer sa propre spécificité et certaines au moins de ses propriétés biochimiques à un autre colibacille, voisin du premier (même groupe), et vivant dans le même milieu que lui; nous avons pu préciser la nature désoxy-ribonucléique du principe inducteur en cause²).

Depuis les travaux de *Griffith*, on connaît la possibilité, pour un pneumocoque, de subir une mutation dirigée et de changer de type. L'expérience peut se réaliser *in vivo* ou *in vitro*. Soient deux types de pneumocoques, que nous désignerons par *a* et par *b*, dont chacun peut exister sous la forme smooth (S_a et S_b) et sous la forme rough (R_a et R_b)³). Si l'on vient à inoculer à l'animal R_a vivant en même temps que S_b tué par la chaleur, ou si l'on vient à cultiver R_a vivant en contact avec S_b tué par la chaleur, il arrive qu'on puisse isoler de l'animal ou de la culture S_b vivant. Le même résultat peut encore être obtenu en cultivant R_a en présence d'un extrait de S_b ne contenant aucun cadavre ou débris bactériens. Une substance

1) *Boivin, Delaunay, Vendrely et Lehout*, C. r. **221**, 718 (1945).

2) *Boivin, Vendrely et Lehout*, C. r. **221**, 646 (1945); *Exper.* **1**, 334 (1945).

3) On sait que la variante smooth (ou lisse), qui est la forme normale de la bactérie, possède le polysaccharide caractéristique du type considéré, alors que la variante rough (ou rugueuse), qui est une forme dégradée, a perdu son polysaccharide. Le passage spontané de S à R se voit fréquemment, dans les vieilles cultures; au contraire, la réversion spontanée de R en S est chose tout à fait exceptionnelle; lorsqu'elle se produit, elle redonne le type originel.

chimique issue de S_b est donc en cause, pour déclencher la mutation dirigée. Au cours de travaux tout à fait remarquables, *Avery* et ses collaborateurs *McCarty* et *MacLeod* ont découvert récemment la nature de cette substance inductrice: il s'agit d'acide désoxy-ribonucléique dans un haut état de polymérisation¹).

Nos expériences ont porté sur deux types de colibacilles retirés des matières fécales de l'homme normal, que nous désignerons par C_1 et C_2 . C_1 renferme un polysaccharide donnant la réaction des acides uroniques (naphtorésorcine) tandis que C_2 contient un glucide sans acide uronique et de tout autre spécificité sérologique (pas de précipitation croisée entre les deux polysaccharides). Selon la règle valable pour les bactéries à «*Gram* négatif», les glucides spécifiques ne se rencontrent que dans les formes lisses, où ils existent en complexes glucido-lipido-polypeptidiques, d'où on peut aisément les libérer par chauffage en milieu faiblement acide (*Boivin* et *Mesrobianu*). Nous comptons revenir en détail, ultérieurement, sur la constitution des polysaccharides de C_1 et C_2 . Or si l'on cultive, pendant quelques jours, C_2 rough dans un filtrat de culture sur bouillon de C_1 smooth, on obtient côte-à-côte beaucoup de germes répondant à C_2 rough et quelques-uns répondant à C_1 smooth; on les sépare par l'artifice habituel de colonies isolées sur gélose; de même C_2 smooth, qui se transforme très aisément et de façon spontanée en C_2 rough, conduit, dans les mêmes conditions, à un mélange de C_2 smooth, C_2 rough et C_1 smooth; de même enfin, C_1 rough mène, quoique rarement, à C_1 smooth, ce qu'il ne fait pas spontanément. C_1 issu de C_2 présente les mêmes caractères antigéniques que C_1 naturel: même polysaccharide à acides uroniques, précipitant spécifiquement et à haute dilution par l'anticorps valable contre C_1 smooth naturel et ne précipitant pas avec l'anticorps correspondant à C_2 smooth.

Des résultats identiques peuvent être obtenus en substituant au filtrat de culture de C_1 smooth, du bouillon vierge auquel on ajoute un autolysat de C_1 smooth, stérilisé par filtration sur bougie.

Cet autolysat se prépare comme suit. Cultiver les bactéries sur gélose pendant 18 à 20 heures à 37°, les recueillir, les laver au sérum physiologique par centrifugation, les mettre en suspension dans dix fois leurs poids de sérum physiologique, ajouter quelques gouttes de toluène, bien agiter, puis abandonner finalement pendant deux heures à la température ordinaire; cela fait, on centrifuge pour éliminer les cadavres bactériens. On obtient un liquide coloré en jaune par des corps flaviniques, qui se montre assez riche en matières protéidiques précipitables par l'acide trichloracétique. Le principe actif se retrouve dans la fraction nucléoprotéidique qu'on peut précipiter à p_H 3,5. Par une série de précipitations à ce p_H , suivies de redissolutions vers p_H 7,5—8, on parvient à se débarrasser à peu près complètement du complexe glucido-lipido-polypeptidique spécifique de C_1 que contenait en abondance l'autolysat brut (on suit la purification

¹) *Avery, MacLeod et McCarty, J. exp. Med.* **79**, 137 (1944); *McCarty, J. exp. Med.* **81**, 501 (1945); *J. gen. Physiol.* **29**, 123 (1946); *McCarty et Avery, J. exp. Med.* **83**, 89 et 97 (1946).

en recourant à des réactions de précipitation au moyen du sérum d'un lapin immunisé contre ce complexe antigénique de C_1). Le principe actif se retrouve dans l'acide nucléique brut qu'on peut isoler de ce nucléoprotéide par digestion pepsique prolongée pendant 3 à 4 heures à la température ordinaire et à p_H 2, suivie de précipitations fractionnées répétées par l'alcool acidulé (adjonction au liquide de digestion de 2 à 3 volumes d'alcool et acidulation nette par de l'acide chlorhydrique; opérer à froid en ne maintenant le contact que juste le temps nécessaire). Avant digestion, les préparations renferment 4 à 6 fois plus de matériel protéique que d'acide nucléique (dosage de l'azote total, du phosphore total et des bases puriques totales, celles-ci par la méthode au cuivre¹). Après digestion et précipitations fractionnées par l'alcool, on se trouve en présence d'acide nucléique impur, ou plus exactement d'un mélange d'acide ribonucléique et d'acide désoxy-ribonucléique impurs (on peut doser ces deux acides en recourant d'une part à l'évaluation des purines totales et d'autre part à la méthode de *Dische* à la diphénylamine²), qui permet de connaître l'acide à désoxy-ribose; quant à l'acide à ribose, on l'a par différence et on peut en contrôler l'ordre de grandeur par la méthode de *Bial-Mejbaum* à l'orcine³)).

Voici les résultats que nous ont fournis trois échantillons actifs, obtenus par trois techniques de précipitations fractionnées un peu différentes l'une de l'autre par les quantités d'alcool et les quantités d'acide mises en œuvre:

N° des préparations	Acide nucléique total dans 100 parties de matière	Rapport:
		$\frac{\text{acide désoxy-ribonucléique}}{\text{acide nucléique total}}$
N 6	58,7	0,69
N 8	76,1	0,22
N 11	59,0	0,37

Nous avons recherché ce que devient l'activité de nos préparations après action des deux polynucléotidases qu'on peut retirer du pancréas de bœuf, séparer et purifier selon *Fischer* et ses collaborateurs⁴). La ribo-polynucléotidase ($p_H = 6$, tampon d'acétates, en présence d'un peu d'ion magnésium) n'inactive pas en 6 heures à 37°, alors que la désoxyribo-polynucléotidase ($p_H = 7$, tampon de phosphates, en présence d'un peu d'ion magnésium) inactive complètement la préparation en moins d'une heure (en une heure, l'acide ribonucléique de levure est totalement dépolymérisé par la ribonucléase, rendu non précipitable par ClH). Il y a donc tout lieu de penser que le principe inducteur présent dans les extraits de C_1 est de l'acide désoxy-ribonucléique sous une forme hautement polymérisée. Ajoutons qu'on ne peut pas stériliser par filtration sur bougie la solution, nettement visqueuse, des nucléates obtenus à partir du colibacille, avant de les incorporer au bouillon pour pro-

¹) *Vendrey et Sarciron*, Bl. Soc. Chim. biol. **26**, 214 (1944).

²) *Dische*, Mikroch. **8**, 4 (1930).

³) *Mejbaum*, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

⁴) *Fischer, Böttger et Lehmann-Echternacht*, Z. physiol. Ch. **271**, 246 (1941).

voquer le phénomène de la mutation dirigée. Mais il suffit de précipiter la solution de ces nucléates par adjonction d'alcool, de laisser quelque temps en contact, de recueillir le précipité par centrifugation et de le redissoudre dans de l'eau stérilisée, pour se mettre à l'abri des germes étrangers.

Le passage de C_2 à C_1 nécessite évidemment un certain remaniement de l'équipement enzymatique du colibacille, puisque C_1 élabore un polysaccharide autre que celui de C_2 . Mais il semble bien que des modifications plus étendues d'équipement enzymatique aient lieu: C_1 originel, C_1 issu de C_2 et C_2 font fermenter le glucose et le lactose, avec production d'acides; C_1 originel et C_1 issu de C_2 ne font pas fermenter le saccharose, même après des passages répétés sur des milieux contenant ce disaccharide (pas d'enzymes, même « adaptatifs » pour l'attaque du saccharose), alors que C_2 le fait fermenter immédiatement (intervention d'enzymes « constitutifs » au sens de *Karström*). La mutation de C_2 en C_1 s'accompagne d'une perte de l'enzyme nécessaire pour l'attaque initiale du saccharose, de la saccharase, ainsi que nous avons pu le vérifier directement, en recourant à des bactéries tuées par le toluène.

Comme on le pense, nous avons cherché à reproduire le même phénomène de mutation dirigée en sens inverse, c'est-à-dire à passer de C_1 rough à C_2 smooth, grâce à un extrait de C_2 (nucléoprotéide ou acide nucléique). Nous avons, jusqu'à présent, toujours échoué dans nos tentatives répétées. Comment s'expliquer la chose? Il semble bien qu'il faille qu'un germe soit dans un état de particulière instabilité pour qu'une mutation dirigée puisse se produire, *du moins avec quelque fréquence*. Tel paraît être le cas de C_2 rough qui donne lieu à tout un « spectre » de variantes quant à l'aspect de ses colonies; encore n'est-ce que l'une d'entre elles (variante à petites colonies) qui se montre capable de se transformer en C_1 . On a rencontré des faits absolument comparables en ce qui concerne les pneumocoques. Mais il convient de noter que l'échec d'une tentative de mutation dirigée peut vraisemblablement tenir à d'autres causes qu'à un manque d'instabilité du germe sur lequel on opère. Pour isoler l'acide nucléique des colibacilles, on ne peut malheureusement pas mettre en œuvre une dissolution des germes par le désoxy-cholate de sodium, comme on le fait dans le cas des pneumocoques d'*Avery*; il faut recourir à l'autolyse ménagée. Or, beaucoup de colibacilles s'autolysent mal ou encore ne conduisent qu'à de l'acide nucléique dégradé par les propres enzymes des bactéries. Dans les cas les plus favorables (C_1 par exemple), les pertes en acide nucléique hautement polymérisé sont certainement énormes et sans doute faut-il attribuer à ce fait l'activité relativement basse de nos préparations du principe inducteur nucléique de C_1 : activité limitée à des dilutions de quelques

centaines de *milliers* de fois, alors que les préparations homologues d'*Avery* se montrent agissantes jusqu'à des dilutions atteignant plusieurs centaines de *millions* de fois¹).

Enfin, nous avons vérifié que la substitution à l'acide nucléique de C₁ d'acides retirés de trois autres colibacilles, du staphylocoque et de la rate de cheval ne donne aucun résultat. Ce n'est donc pas un acide thymonucléique quelconque, mais bien l'acide particulier contenu dans C₁ qui provoque le saut de C₂ à C₁.

Il était intéressant de connaître la richesse de C₁ smooth en acide thymonucléique. Pour le savoir, nous avons appliqué à ce germe, avec quelques modifications, la technique donnée récemment par *Schneider*²) pour les tissus animaux.

Notre mode opératoire a été le suivant, dans ses grandes lignes: enlèvement de l'«acido-soluble» des germes (purines et pyrimidines libres, nucléosides, nucléotides) par l'acide trichloracétique froid, puis solubilisation — au prix d'une hydrolyse partielle qui ne gêne pas les dosages — des deux acides nucléiques par l'acide trichloracétique chaud. Dans le second extrait trichloracétique, on dose les purines totales (bloc de deux acides nucléiques) et les deux acides séparément, selon *Dische* et selon *Bial-Mejbaum*. En outre, on peut calculer la teneur *approximative* des germes en protéines, en admettant que tout l'azote non nucléique des bactéries est protéique. Voici nos résultats:

N total	= 14,4	pour 100 parties de matières bactériennes séchées
Protéines totales	= 76,8	id.
Acide nucléique total	= 13,1	id.
Acide désoxy-ribonucléique	= 4,4	id.
Acide ribonucléique	= 8,7	id.
Rapport:		
	<u>acide désoxy-ribonucléique</u>	= 0,34
	acide nucléique total	

Une souche différente de colibacille (K₂) et plusieurs autres espèces bactériennes (bacille typhique, staphylocoque, etc.), étudiées de même, nous ont donné des résultats fort analogues³). Le colibacille C₁ n'a donc rien de particulier quant à sa teneur en produits nucléiques.

Il semble bien établi, maintenant, que la cellule bactérienne possède un noyau (voir spécialement les recherches récentes de *Robinow*⁴)) et par analogie avec les cellules des êtres supérieurs, il y a tout lieu de penser que ce noyau renferme l'acide désoxy-ribonucléique révélé par l'analyse, tandis que l'acide ribonucléique se localise dans le cytoplasme. Le principe désoxy-ribonucléique issu de C₁ et qui se montre capable d'imposer à C₂ une constitution moléculaire nouvelle pour son polysaccharide et un équipement enzymatique

¹) *Boivin, Delaunay, Vendrely et Lehoult*, Exper. **2**, 139 (1946).

²) *Schneider*, J. Biol. Chem. **161**, 293 (1945).

³) *Vendrely et Lehoult*, C. r. **222**, 1357 (1946).

⁴) *Robinow*, Proc. Roy. Soc. London (B) **130**, 299 (1942); J. Hyg. **43**, 413 (1944); Addendum au livre de *Dubos*, The Bacterial Cell (1 vol. 1945, Harvard Univ. Press).

nouveau, ne résulte-t-il pas d'une simple solubilisation de l'appareil chromosomique de C_1 ? L'hypothèse est fort vraisemblable. Si elle répond à la réalité, elle ouvre des horizons tout à fait nouveaux et combien prometteurs en ce qui concerne la biochimie de l'hérédité. En particulier, c'est du côté de l'acide nucléique et non plus de la protéine de la macromolécule nucléoprotéidique constituant un gène qu'il faudrait chercher la raison des propriétés spéciales à ce gène. Cela amènerait à envisager la possibilité d'une structure — structure « primaire » ou plus vraisemblablement structure « secondaire » — susceptible de différencier entre eux les divers acides nucléiques à désoxy-ribose, sous leur état naturel de polymérisation.

Il semble ainsi qu'on puisse attendre beaucoup de l'étude du déterminisme chimique des caractères héréditaires chez les micro-organismes, pour la compréhension des processus les plus généraux et les plus fondamentaux de l'hérédité.

Service des Recherches Immunologiques
de l'Institut Pasteur, Garches-Paris.

175. Le sort des acides aminés lors de leur absorption

par F. Leuthardt et B. Glasson.

(15 VI 46)

Les acides aminés, comme les sucres, sont absorbés par la veine porte. Par conséquent, ils traversent le foie avant d'être distribués dans les différents tissus. D'autre part, le foie est également le siège de l'uréogénèse. Les acides aminés constituent la source principale d'azote pour la formation de l'urée. Selon l'opinion courante, ils sont désaminés dans les cellules hépatiques elles-mêmes, l'ammoniaque libérée fournissant l'urée par le cycle de l'ornithine. Quel est, dans ces conditions, le sort des acides aminés qui sont absorbés au niveau de l'intestin et qui entrent dans le foie par la veine porte ?

Si les groupes α -aminés constituent le point de départ de l'uréogénèse hépatique, il faut s'attendre à ce que la production maximale d'urée coïncide avec l'afflux maximal des amino-acides dans le foie et qu'une partie plus ou moins considérable de l'azote absorbé soit transformé en urée au moment où il traverse le foie. Plusieurs auteurs¹⁾

¹⁾ Folin, O., et Denis, W., J. Biol. Chem. **11**, 77, 161 (1912); **12**, 141 (1912); van Slyke, D. D., et Meyer, G. M., J. Biol. Chem. **16**, 197 (1913); Folin, O. et Berglund, H., J. Biol. Chem. **51**, 395 (1922); Seth, T. N. et Luck, J. M., Biochem. J. **19**, 366 (1925); Kiech, C., et Luck, J. M., J. Biol. Chem. **94**, 433 (1931); Terroine, E. F., et Firdmann, J., Bl. Soc. Chim. biol. **19**, 259 (1937).