

DISSOCIATION MICROBIENNE DES BACILLES FLUORESCENTS ET PRODUCTION EXPÉRI- MENTALE DE CES VARIATIONS.

PAR E. LAGRANGE, M.D., D.T.M.

Bactériologiste, Conseil Sanitaire Maritime et Quarantenaire, Alexandrie.

DANS trois courtes notes, j'ai décrit précédemment des variations très particulières que présentent certaines souches de bacilles fluorescents, et j'ai montré comment on peut arriver à les reproduire *in vitro* dans des conditions déterminées. Je compte reprendre ici cet exposé des faits et des considérations théoriques qui en découlent.

Voici une observation type.

Un bacille fluorescent possède les caractères habituels de son espèce, mais sur gélose saccharosée, il présente après quelques jours un enduit gommeux épais, sur lequel apparaissent en relief quelques gros points vitreux et translucides.

Croyant à une contamination, je répète les isolements par colonies isolées et constate que d'une façon continue mais sur gélose *saccharosée* seulement, quelques colonies isolées produisent des papilles. En faisant les prélèvements minimes et en diluant en bouillon, on arrive, après quelques passages, à isoler trois types de colonies :

- (1°) des colonies non gommeuses ;
- (2°) des colonies gommeuses grises ;
- (3°) des colonies gommeuses vitreuses et transparentes.

Au bout d'un petit nombre de passages, la première catégorie disparaît ; les deuxième et troisième catégories qui se reproduisaient greffées sur une autre colonie et non isolées arrivent à pousser isolées.

A ce moment, la souche présente des colonies donnant toutes de la gomme sur gélose saccharosée, les colonies vitreuses apparaissant tantôt isolées, tantôt greffées sur les colonies grises comme une papille.

Cette différenciation demande chaque fois au moins 48 heures pour les colonies isolées, mais les papilles apparaissent jusqu'à huit jours après.

Si on repique l'un ou l'autre type de ces colonies en bouillon, on obtient régulièrement sur gélose saccharosée, un mélange de colonies grises et vitreuses, qui, repiquées isolément en bouillon, entretiennent indéfiniment le mélange des deux types.

Au contraire, si on poursuit en milieu solide les repiquages par colonies isolées, les colonies vitreuses arrivent progressivement à donner une descendance homogène de colonies vitreuses sans colonies grises. Ces deux colonies diffèrent, non seulement par leurs caractères optiques, mais aussi par des

caractères biochimiques. Le repiquage sur gélatine saccharosée montre que les colonies vitreuses obtenues à partir d'un bacille fluorescent liquéfiant ne liquéfient plus ce milieu, alors que les colonies grises le liquéfient.

Les premières ne digèrent pas le lait (ceci dans le cas d'une dissociation stable), donnent une réaction acide au milieu saccharosé et produisent peu ou pas de pigment.

Tantôt d'une façon transitoire, tantôt d'une façon définitive, il est arrivé que la propriété de produire de la gomme sur saccharose disparut brusquement.

Ces faits peuvent se caractériser en résumer comme suit :

(1°) A chaque génération (si on peut appeler ainsi chaque repiquage par colonies isolées) la colonie-mère donne à partir d'un certain stade deux types de colonies-filles dont les descendants sont à leur tour de deux types différents.

(2°) Si cet équilibre instable—qui rappelle les variations mendéliennes avec quelques réserves—se perpétue indéfiniment en passant par milieu liquide, il subit, en milieu solide, une évolution progressive qui aboutit à une souche homogène, parfaitement stable au point de vue de la fixité de ses caractères et différant de son point de départ à la fois au point de vue protéolytique, saccharolytique et chromogène, c'est-à-dire ayant un métabolisme totalement différent.

Un heureux hasard m'a fait trouver dans la bière indigène d'Égypte (la bouza) dont une étude bactériologique sera publiée sous peu, un grand nombre de souches de bacilles fluorescents, dont la plupart présentent les variations précédentes. Mais tandis que les deux souches rencontrées ailleurs ont présenté l'évolution précédemment décrite à peu près entièrement, et s'étendant sur plusieurs mois d'observation, celles-ci étaient au stade terminal de cette évolution ou tout près d'y parvenir, ce qui prouve que cette évolution est un processus naturel.

A signaler que sur les souches ne provenant pas de la bouza, il s'est produit à différentes reprises des variations macroscopiques des colonies, ne s'accompagnant d'aucune variation biochimique et transmissibles en série pure sans dissociation¹.

Cette description est susceptible de variations de détail, d'après les diverses souches observées dans les conditions naturelles ou artificielles.

* * *

Après avoir vainement cherché à communiquer ces anomalies d'une souche à une autre normale (car elles semblent bien fixées à la cellule microbienne elle-même), après avoir vainement cherché à isoler des colonies variables un principe filtrant causant ces variations, j'ai eu l'idée de voir si le bactériophage n'était pas susceptible de provoquer le même phénomène.

¹ M. Schoen (1912) de l'Institut Pasteur a bien voulu examiner de plus près la nature de cette gomme. Elle fournit par hydrolyse du lévulose pur. Ces bacilles se comportent donc, au point de vue de la formation de la gomme, comme le *Gommobacter* décrit par Fernbach et Schoen, c'est-à-dire que cette gomme ne prend naissance que dans des milieux *saccharosés*; ni en présence de glucose ni en présence de lévulose, ni en présence de saccharose interverti au préalable, le microorganisme ne produit de gomme. (*C.R. de l'Acad. des Sc.* 155, 54.)

Or, à part trois cas, où sont apparues des plages punctiformes, à peine visibles à l'œil nu et non transmissibles d'une façon régulière, je n'ai pas rencontré de bactériophage ayant une action lytique sur les bacilles fluorescents.

Mais s'il ne détruit pas ces germes, le bactériophage a cependant d'une façon très nette le pouvoir de les transformer¹.

Ces transformations peuvent se caractériser comme suit :

(1°) Elles sont toujours irrégulières : le même bactériophage opérant dans des conditions identiques et simultanées agit sur telle souche et est indifférent vis-à-vis de telle autre : il peut produire des variations d'un type chez une souche et d'autres de type très différent chez une autre.

(2°) Dans certains cas, il produit simplement des colonies macroscopiquement différentes, notamment plissées comme un *B. mesentericus* ou chagrinées comme un *B. anthracis*. Les germes de ces colonies sont en tous points identiques aux précédents ; par repiquages successifs en milieux solides, on obtient une souche homogène mais non stable ; en milieu liquide on maintient plus ou moins longtemps le mélange des deux types de colonies. Ces variations affectent donc très légèrement l'élément cellulaire. Elles peuvent s'obtenir par simple vieillissement des cultures, mais irrégulièrement.

(3°) Dans d'autres cas, la souche mise en contact avec le bactériophage se dissocie en deux ou plusieurs colonies différant tantôt par leur aspect macroscopique seul, tantôt en même temps par leurs caractères biochimiques, et leurs descendants sont stables : par exemple, aux dépens d'un bacille fluorescent non liquéfiant, se produiront des colonies liquéfiantes avec halo, d'autres non liquéfiantes plissées, et les deux produisent une descendance stable et sans mélange.

(4°) Enfin, le bactériophage reproduit parfois les variations particulières signalées plus haut sur saccharose ; elles apparaissent au début de leur évolution et la suivent en se dissociant pendant plusieurs générations, de la manière décrite plus haut.

(5°) Le bactériophage disparaît, tout au moins à l'état libre, une fois la variation opérée, et celle-ci demeure héréditairement.

Il est à remarquer qu'il y a un optimum de durée pour le contact du bactériophage en milieu liquide, soit 24 heures, et généralement un optimum d'activité qui se déclare parfois avec l'atténuation par chauffage du bactériophage.

Le plus souvent toutefois, il est impossible de reproduire à coup sûr des variations identiques, même dans des conditions apparemment identiques.

* * *

On connaît depuis longtemps les mutations produites sur des colonies secondaires par le bactériophage. Il semble que cet agent détruise certains

¹ Voici la technique employée. Une colonie parfaitement isolée est ensemencée en bouillon et additionnée d'une goutte de bactériophage. Après 24 heures à 25° C. (les fluorescents ne poussent généralement pas à 37°) on repique sur le milieu solide choisi.

germes et empêche temporairement la multiplication de quelques autres. Quand ceux-ci recommencent à se reproduire, ils manifestent des propriétés nouvelles. Jamais toutefois, on n'avait signalé la production par le bactériophage de variations réversibles se reproduisant à chaque génération comme ci-dessus.

La littérature des phénomènes analogues observés à l'état naturel est moins abondante et moins connue, bien que plus ancienne. Elle remonte surtout à Neisser (1906) qui étudia le premier le *B. coli mutabile*; son étude fut reprise par nombre d'auteurs et étendue à d'autres espèces, notamment les bacilles typhiques et dysentériques. Les descriptions en sont généralement assez compliquées, mais les faits le sont encore davantage, et tout exposé en est forcément schématique à moins d'être diffus et presque incompréhensible.

La terminologie est également assez peu précise. On a beaucoup discuté s'il convenait de parler de variations ou de mutations; Arkwright a proposé le nom de "microbic dissociation" pour un phénomène (production de colonies *R* et *S*) qui se rapproche certainement beaucoup de celui-ci. Cette appellation paraît convenir parfaitement à cette séparation continue des colonies à partir d'un même ascendant; mais, récemment, P. Hadley a englobé sous le même nom des variations très diverses, ce qui ôte au terme de "dissociation microbienne" une grande partie de son intérêt. Appelons donc provisoirement "dissociations microbiennes" *sensu stricto* les phénomènes ressemblant à ceux que Neisser a signalé un des premiers. Que ce soit sur rhamnose, sur dulcité, lactose ou saccharose ou sur milieu monochloracétique, il existe pour chaque espèce *un* (ou un petit nombre) réactif qui permet leur mise en évidence. En son absence, la dissociation disparaît.

Les explications de ce phénomène n'ont pas manqué: il peut être intéressant de résumer et d'apprécier les principales. Neisser s'est abstenu de toute explication, le fait lui paraissant suffisamment remarquable. Son travail fut très discuté, ainsi que la question de savoir s'il convenait de parler de variations ou de mutations. Il me semble, comme il a été dit plus haut, que le mot mutation est trop précis. D'ailleurs, "mutation" veut dire avant tout "fait nouveau" et jusqu'à présent on ne savait pas qu'il y eut fait nouveau. Il y a plutôt une irrégularité continue et se reproduisant en série.

R. Müller, dont le travail est des plus remarquables, s'est inspiré de la phraséologie d'Ehrlich pour traduire en langage chimique la spécificité du réactif nécessaire à l'apparition du phénomène.

Beaucoup plus récemment, F. J. Stewart a eu recours aux théories de l'hybridation: il suppose que les microbes se conjuguent et qu'à un moment donné deux germes différents venant à se conjuguer il en résulte des hybrides; bien que très élégante, cette théorie ne nous explique pas grand'chose au prix des hypothèses qu'elle nécessite. Nous ne savons rien de positif sur la sexualité des microbes; pourquoi à un moment donné se scindent-ils de façon à donner des cellules-filles inégales; si cela est (on ne nous dit pas pourquoi), comment

expliquer les groupements des hybrides *microscopiques* de façon à reproduire les images qui figurent dans les colonies *macroscopiques*.

Récemment, P. Hadley a cherché à rapprocher le phénomène découvert par Neisser et la bactériophagie en les déclarant équivalents. Mais il a étendu la comparaison à toutes sortes de faits très disparates et sa conception du bactériophage est des plus extraordinaires; il en résulte une extrême confusion. Il semble d'ailleurs ignorer ce fait fondamental que la bactériophagie se transmet par filtrats, ce qui n'est pas le cas pour les dissociations microbiennes. L'argument nouveau que j'ai apporté de la production du phénomène de Neisser par réaction du bactériophage *in vitro* renverse cette comparaison¹.

Sans vouloir tenter l'explication d'un phénomène aussi exceptionnel dans la biologie, il est intéressant pour l'interpréter, de les rapprocher d'autres phénomènes analogues, à savoir les tumeurs malignes.

On a depuis longtemps comparé la bactériophagie au sarcome de Rous et à nombre de maladies à virus filtrants des plantes et des animaux. Dans tous ces cas, une variation cellulaire est transmise par un agent filtrant; le processus est contagieux et l'agent pathogène se multiplie au contact d'une cellule.

S'il est permis de comparer l'action directe du bactériophage au sarcome de Rous, il me semble légitime de mettre en parallèle l'action indirecte du bactériophage que j'ai observée sur les bacilles fluorescents avec le cancer expérimental des mammifères. Dans le cancer du goudron de la souris, par exemple, il n'existe pas d'agent filtrant; l'agent causal ne se multiplie pas et s'élimine, mais la lésion cellulaire très variable (hyperkératose, papillome et néoplasme, qui peuvent voisiner côte à côte) persiste et se transmet héréditairement, non seulement de cellule tumorale à cellule tumorale, mais même, à la faveur de la greffe, chez toute une série d'individus, perturbant plus ou moins les fonctions essentielles des cellules atteintes, et créant une *viciation héréditaire*. C'est de la même manière qu'agit ici le bactériophage. Par un contact momentané avec des éléments microbiens, il provoque une perturbation plus ou moins complète des fonctions cellulaires qui peut aller dans le cas de dissociation microbienne sur saccharose jusqu'à un trouble considérable du métabolisme, portant sur les pouvoirs protéolytique, saccharolytique et chromogène, et sur l'hérédité. Le processus n'est pas contagieux, la cellule atteinte par un action indirecte du bactériophage gardant jalousement sa "maladie" fixée.

Primitivement greffées sur des colonies normales, ces colonies anormales peuvent ensuite s'isoler et acquérir leur indépendance au point de ressembler à une espèce nouvelle.

Des expériences en cours permettent d'envisager la généralisation de cette conception à d'autres espèces microbiennes.

¹ Poursuivant des études analogues sur les bacilles du groupe Eberthus nous trouvons actuellement des bacilles typhiques et dysentériques qui donnent sur rhamnose des plages filtrantes produites par le bactériophage et des papilles non filtrantes existant sur les souches ultrastériles, côte à côte—fait qu'il sera difficile d'expliquer avec les théories d'Hadley.

RÉSUMÉ.

1. Les bacilles fluorescents présentent en milieu saccharosé des variations analogues à celles que Neisser a signalées sur lactose chez le *B. coli mutabile*, consistant en colonies gommeuses et vitreuses, se produisant de façon particulière et évoluant vers un type homogène différent du point de départ.

2. Le bactériophage peut provoquer l'apparition du même fait chez des bacilles fluorescents normaux.

3. Cette viciation héréditaire inhérente à la cellule, une fois produite, semble être du même ordre que le cancer expérimental des mammifères produit par l'action à distance du goudron ou d'un autre irritant.

OUVRAGES CITÉS.

- ARKWRIGHT, J. A. (1924). *Brit. J. Exp. Path.* 5, 23.
 HADLEY, P. (1927). *J. Infect. Dis.* 40, 1.
 D'HÉRELLE, F. (1921). *Le Bactériophage et son comportement*. Masson.
 LAGRANGE, E. (1926, 1927). *C. R. Soc. Biol.* 97.
 MÜLLER, R. (1911). *Centralbl. f. Bakt.* Abt. I. Orig. 58.
 NEISSER, M. (1906). *Ibid.* Ref. 38, 98.
 PENFOLD, W. J. (1911). *J. of Hygiene*, 11, 487.
 STEWART, F. S. (1926). *Ibid.* 25, 237.

Le lecteur trouvera une bibliographie de 16 pages dans l'ouvrage de Hadley (1927), voir aussi Stewart (1926).

(*MS. received for publication* 24. v. 1928.—Ed.)