

Dr. J. KOŘÍNEK:

La dissociation chez les mycobacteria.

L'Institut de physiologie botanique à l'Université Charles de Praha.

Il faut regarder notre publication comme une note préliminaire. Nous ne voulons rien écrire de la littérature qui s'occupe de la dissociation microbienne en général. Nous citons seulement les noms suivants: J. A. ARKWRIGHT, P. HADLEY, AMAR NATH GOYLE, M. F. UPTON et N. KOPELOFF, A. SERPILLI et G. DENES, C. E. A. WINSLOW, J. DRBOHLAV, B. FEIERABEND et K. ZRŮNĚK.

Chez les espèces du genre *Mycobacterium* on peut plus ou moins facilement provoquer la formation des formes *R* et des formes *S*, suivant les conditions auxquelles la culture est exposée. Nous nous sommes occupés de deux agents qui peuvent influencer la dissociation microbienne. Ce sont la glycerine et l'oléat de potassium ajoutés dans le milieu de culture. On peut facilement constater que la température est aussi un agent de grande importance.

Nous avons essayé de rechercher les choses suivantes:

1. Dans quelles conditions se forment les colonies *R* et *S*,
2. quelle est la structure interne de ces deux types,
3. s'il existe une différence de coloration par la méthode de HEIDENHAIN, GRAM et ZIEHL-NEELEN.

L'oléat de potassium.

Nous avons ajouté cette substance dans la gélose glycinée et inoculé quelques espèces de *Mycobacteria*, surtout *M. smegmatis*, *M. tuberculosis poikilothermum* FRIEDMANN et *M. pellegrini*. C'est une espèce saprophytique, colorée en orange que nous avons obtenu à l'Institut Pasteur de Paris. Nous voulons négliger la description des détails et mentionner seulement les choses principales.

La présence du Kalium oleicum dans le milieu de culture favorise le développement de la forme *S*. Les colonies de *M. pellegrini* étaient colorées moins intensivement. Les microbes formaient des filaments consistant de granules de MUCH qui conservaient leurs acidoresistance. La forme *S* repiquée dans le milieu sans oléat de potassium reprenaient facilement la forme originale *R*. Nous avons pu certifier ce qu'écrivait C. E. A. WINSLOW: „Dissociation is also markedly influenced both in amount and in direction by environmental factors. Yet the relation is in no sense direct and specific, as in the case with impressed variations.“ Les colonies *R* ont une structure granuleuse, les colonies *S* une structure spongieuse. A la température de 37° C l'influence de Kalium oleicum est plus distincte qu'à la température normale. Voici la table qui nous démontre l'influence de la quantité d'oléat de potassium et de la température. Les chiffres signifient le nombre de gouttes d'oléat ajoutées dans les tubes à gélose glycinée (4%). La croissance *R* est désignée par +, la croissance *S* par —.

Temperature	0	3	6	9	12	24
22° C	++	+	±	—	---	----
37° C	+++++	++	±	—	---	-----

La glycérine.

On sait que les *Mycobacteria* exigent une certaine quantité de glycérine dans le milieu. Les espèces saprophytes sont à ce point moins exigeantes, mais elles aussi sont favorisées par la présence de cette substance dans le milieu nutritif. On regarde comme quantité optimale 4% de glycérine. Trop grande quantité change l'aspect de la colonie. Voici la table qui nous indique l'influence de la glycérine (+ signifie le degré de développement de la forme *R*, — le degré de la forme *S*).

	0%	4%	20%
<i>M. smegmatis</i>	++	+++++	+++
<i>M. tuberculosis</i> poikilothermorum Friedmann	+	-----	++++
<i>M. ranarum</i>	+	----	+++
<i>M. pellegrini</i>	—	+++	++

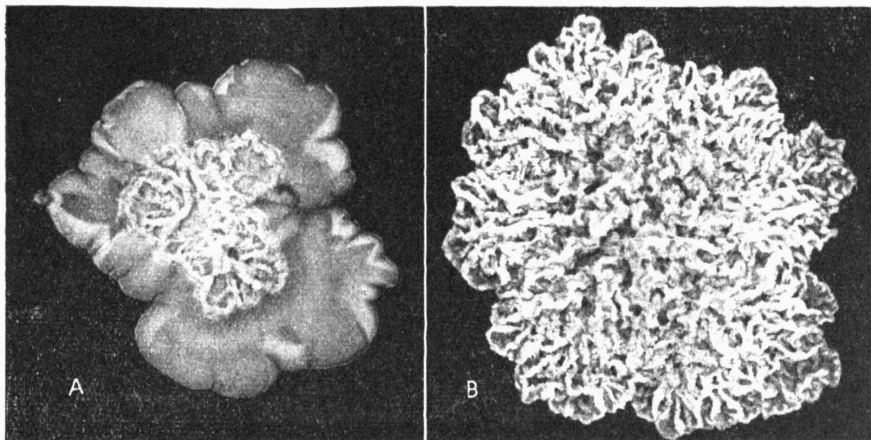
Resumé :

Dans le genre *Mycobacteria* il y a des espèces qui forment assez facilement les formes *S*; le plus facilement *M. pellegrini*, et *M.* de FRIEDMANN. Il y a en d'autres qui forment dans toutes les conditions les formes *R*. Quand les conditions sont trop défavorables elles ne poussent pas du tout. Ce sont *M. smegmatis* et surtout *M. tuberculosis* typus humanus. Il est très possible que la forme *S* de la tuberculose humaine aurait des propriétés très utiles à l'immunisation. On pourrait croire que la transformation en forme *R* est lié avec l'adaptation à la température plus élevée ainsi qu'à la vie parasitaire.

Nous avons préparé des suspensions des deux types des colonies dans l'eau physiologique et nous avons constaté la chose suivante: Plus la colonie *S* était typique, plus facilement on pouvait préparer la suspension et les microbes se tenaient en suspension plus longtemps. La durée pendant laquelle les suspensions persistaient, peut nous indiquer le degré du caractère de dissociation.

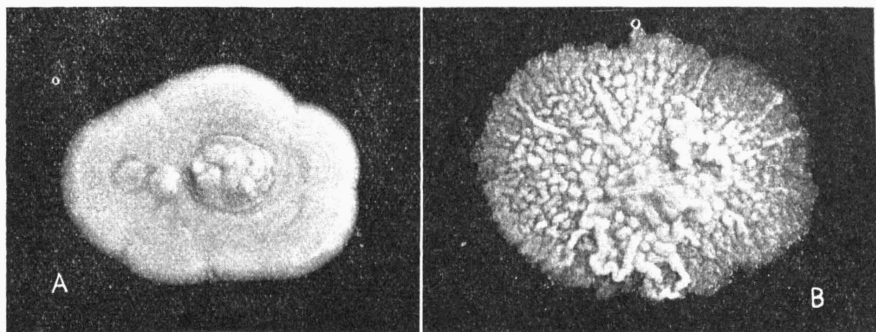
La structure interne des colonies.

Nous avons sectionner à l'aide de microtome les deux types des colonies comme le font les histologues avec les tissus des animaux. La méthode provient de LEGROUX et MAGROU. Le procédé est le suivant: La colonie est prélevée avec



1. *Mycobacterium smegmatis* :

- A) une colonie sur la gélose sans glycérine avec une colonie secondaire R
 B) une colonie sur la gélose sans glycérine avec 4% de glycérine typique forme R



2. *Mycobacterium tuberculosis poikilothermorum* FRIEDMANN

- A) une colonie sur la gélose avec 4% de glycérine la forme S
 B) une colonie sur la gélose avec 20% de glycérine la forme R

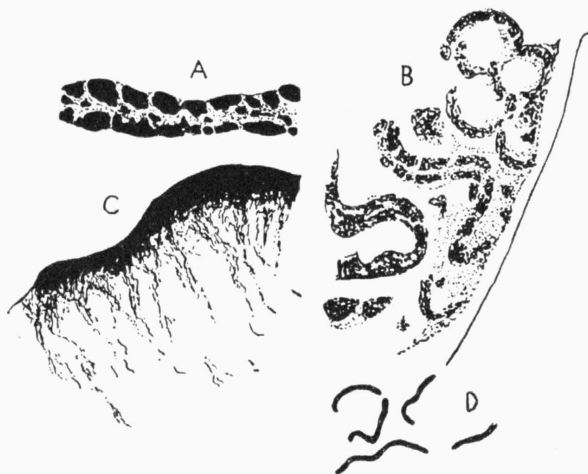
de la gélose, ou elle a poussé. Puis elle est trempée dans de la gélose liquide refroidie à 45° C de manière que la colonie soit enveloppée d'une couche de gélose et ainsi protégée. Maintenant on peut passer la colonie par tous les procédés de fixation et de lavages nécessaires. Nous avons constaté que la meilleure méthode de fixation est celle de B. NÉMEC, c'est à dire 100 *ccm* d'acide chromique à 1% et 8 *ccm* de formaline. Ladessus les colonies sont traitée par l'alcool, xylol, paraffine et coupée à l'aide de microtome.

L'aspect des coupes des colonies est très intéressant quoiqu'il n'est pas possible d'en tirer des conclusions générales. Une chose est très distincte: Les formes S ont la structure interne beaucoup plus simple que les formes R. Celles-ci ont une structure extrêmement compliquée. Les microbes forment des membranes qui se tortillent, plissent, et se courbent d'une manière pittoresque. Les coupes font toujours l'impressions des préparations histologiques disons d'une He-

patique enracinée dans le substratum. Le thallus formerrait une couche de microbes de laquelle pénètrent dans la gélose les filaments formés par les séries de microbes. Ces filaments ressemblent parfaitement au protonema.

Nous ne pouvons dire s'il existe une différence quant à l'enracinement parmi les formes *S* et *R*. Nous n'avons non plus constaté une différence dans la coloration par les méthodes de ZIEHL-NEELSEN (acidoresistance), GRAM et HEIDENHAIN.

Nous exprimons nos remerciements à Mr. le docteur P. MILOVIDOV qui nous a aidé dans la partie histologique.



3. *Mycobacterium tuberculosis poikilothermorum* FRIEDMANN

- A) La coupe transversale de une colonie S
- B) La coupe transversale de une colonie R
- C) Manière d'enracinement d'une colonie dans la gélose
- D) Les microbes (grossissement 1.500×) qui forment „les racines“ de la colonie.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ARKWRIGHT, J. A., The source and characteristics of certain cultures sensitive to bacteriophage. The british journal of experimental pathology. 5, 1924.
2. DRBOHLAV, J., Les formes de mutation du bacille typhi abdominalis. Bul. de l'Institut d'hygiène publique de l'Etat tchécoslovaque. Praha 1930.
3. FEIERABEND, B., et ZRÚNEK K., Srovnání účinnosti očkovací látky proti tyfu forem R a S. Praha 1932.
4. HADLEY, B., The dissociative aspects of bacterial behaviour. (Jordan a. Falk). Chicago 1928.
5. LEGROUX R. et MAGROU J., Etat organisé des colonies bactériennes. Annales de l'Institut Pasteur. 35, 1921.
6. SERPILLI A. et DENES G., Contribution à l'étude de la phase R des bactéries. Bollettino Vol. IV. Milano 1932.
7. UPTON M. F. et KOPELOFF N., Agglutination and dissociation studies with lactobacilli. Journal of bacteriology. Vol. XXIII. 1932.
8. WINSLOW C. E. A., The changing bacteria. Science 1932.