

Résistance et sensibilité aux sulfamidés d'algues unicellulaires

Autor(en): **Blondel, Benigna**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **5 (1952)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-739523>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

RÉSISTANCE ET SENSIBILITÉ AUX SULFAMIDÉS D'ALGUES UNICELLULAIRES¹

PAR

Benigna BLONDEL

(Avec 14 fig.)

INTRODUCTION

Depuis la découverte de l'action thérapeutique du protonsil rubrum par Domagk en 1935 [1] et du p-aminophenylsulfamide par Tréfouel et coll. [2], l'étude des sulfamidés a fait l'objet de recherches extrêmement nombreuses. Ces recherches se sont étendues aux domaines chimique (synthèses de dérivés multiples), thérapeutique et biochimique.

L'action des sulfamidés, par le fait qu'elle est d'ordre bactériostatique, pose des problèmes biochimiques d'un grand intérêt. La découverte par Woods en 1940 [3] de l'intervention du PAB comme antagoniste de cette action fut le point de départ de quantité de recherches biochimiques, tout particulièrement en ce qui concerne les antivitamines, les synthèses d'acides nucléiques et d'une façon générale le mécanisme de résistance aux sulfamidés.

Ces travaux ont été faits sur les bactéries, ce qui s'explique par l'intérêt d'ordre thérapeutique des sulfamidés. Cependant, les bactéries, vu leur dimension, se prêtent difficilement à l'étude des modifications cytoplasmiques. De même, il n'est pas possible de suivre chez elles les modifications intéressant la division cellulaire sans procéder à des fixations et des colorations.

¹ Recherches effectuées à l'Institut de Botanique générale de l'Université de Genève, sous la direction du Professeur Fernand CHODAT.

En 1940, Chodat et coll. [4] constatèrent l'intérêt qu'il y aurait à utiliser des Algues unicellulaires pour l'étude des « phénomènes de cytotasie dus aux sulfamidés ». Diverses recherches sur l'intoxication d'Algues par les sulfamidés ont suivi cette constatation.

La première partie du présent travail porte sur les effets généraux des sulfamidés sur les Algues. Puis le centre du sujet de nos recherches s'est déplacé progressivement. Car, nous avons constaté que des Algues, considérées autrefois comme résistantes, dénotent, à la suite d'un examen plus étendu, des sensibilités temporaires aux sulfamidés. Notre étude s'est orientée, alors, vers une analyse de ce phénomène. Elle souligne, une fois de plus, la complexité que revêt en microbiologie, la notion de résistance d'un microorganisme à un toxique.

I. MÉTHODES

ORGANISMES, MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.

A. Organismes étudiés.

- Algue n° 116 *Oocystis naegeli* A.Br. ¹.
 » n° 3 *Scenedesmus obtusiusculus*.

La première s'était révélée résistante et la seconde sensible à la sulfanilamide, lors de travaux antérieurs [5 et 6].

Nous avons fait aussi quelques essais de culture en présence de sulfanilamide avec les Algues suivantes :

- N°s 89 *Oocystis*, non décrit.
 516 *Oocystis*, non déterminé.
 19 *Chlorella vulgaris* var. *genevensis* Chod.
 62 *Chlorella cladoniae rangiterina* Chod.
 68 *Chlorella cladoniae endiviaefolis* Chod.
 131 *Scenedesmus chlorelloides*.
 50 *Stichococcus diplosphaera*.
 598 et 614 *Stichococcus*.

¹ Noms conformes au catalogue de l'algothèque de Genève.

Les n^{os} 62, 68, 116 et 516 appartiennent à des genres très voisins, les Oocystis se différenciant des Chlorelles par leur forme ellipsoïde. Les Scenedesmus diffèrent des précédents par le fait qu'ils associent leurs cellules deux par deux ou quatre par quatre, association très peu stable d'ailleurs. Suivant les milieux, les cellules sont pour la plupart isolées, c'est le cas pour le detmer (milieu B). Le n^o 3 produit en vieillissant une grande quantité de carotènes.

Ces trois genres se reproduisent par autospores, formées dans une cellule mère.

Les Stichococcus ne forment pas de spores et se reproduisent par allongement et division de la cellule [7].

B. Milieux.

A: 4% d'extrait de malt,
1,5% d'agar,
1000 cm³ d'eau ordinaire.

B: dit de Detmer:

0,25 g MgSO₄ + 7H₂O,
0,25 g KCL,
0,25 g KH₂PO₄,
1 à 2 gouttes d'une solution à 1% de Fe₂Cl₆,
1 g de (Ca(NO₃)₂),
1000 cm³ H₂O distillée,
Diluer au tiers et additionner de 2% de glucose.

Les pH ne sont pas ajustés. Ils sont acides et pour le milieu B après stérilisation, au voisinage de 5.

Ces milieux, répartis par 50 cm³ en erlen Iena (contenance 100 cm³) sont stérilisés 15 minutes à 115° à l'autoclave.

Nous utilisons le milieu A pour l'entretien des souches d'Algues et le B pour nos essais.

C. Conditions de culture.

Ensemencement: Une forte pincée d'Algues est prélevée sur une culture en milieu A, transportée en eau distillée stérile,

de façon qu'un cm³ de cette suspension donne dans 50 cm³ de milieu B un trouble initial aussi constant que possible.

Illumination, température: Les erlenmeyers inoculés sont placés à une température d'environ 20° et éclairés par une lampe de 300 Watts, pendant 12 heures par jour.

Durée des cultures: Elle varie, suivant les expériences, de 4 à 50 jours et plus (cf. protocoles expérimentaux).

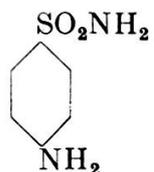
Remarque: Une des grandes difficultés rencontrée dans ce travail fut de reproduire rigoureusement pour les besoins de vérification les expériences faites. Des valeurs absolues sont difficilement reproductibles à cause de la sensibilité des cultures aux moindres variations de température, d'éclairage et d'inoculum. Les différences relatives restent constantes et suffisent pour les comparaisons.

MOLÉCULES DE SULFAMIDÉS EMPLOYÉES: MOTIF INITIAL
DU CHOIX; CONCENTRATIONS.

Des recherches antérieures avaient indiqué un apport probable d'azote par la sulfanilamide aux Algues, soit sensibles, soit résistantes [6].

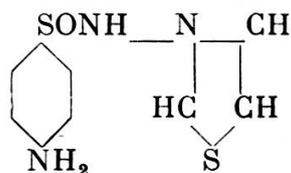
La question: « Est-ce l'azote de l'amine ou de l'amide qui est responsable de cet apport ? » est le motif initial du choix, pour notre travail, des sulfamidés qui suivent. En effet, des molécules présentant soit l'amine libre, soit l'amide libre, pouvaient permettre la solution de cette question.

Sulfanilamide:



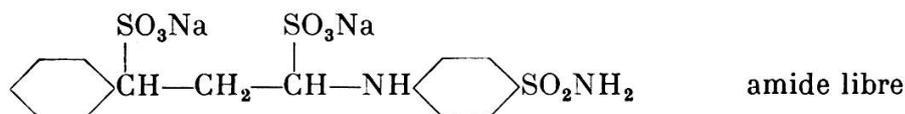
amine et amide libres

Cibazol:



amine libre

Soluseptazine (Spécia) ¹:



Ces corps sont ajoutés au milieu B, avant la stérilisation, en concentrations variant de 0,5⁰/₀₀ à 4⁰/₀₀.

N.B. — Au cours de ce travail, les abréviations suivantes sont employées pour ces molécules: sulfanilamide = S, cibazol = Ci, soluseptazine = Sp.

ESTIMATIONS DE LA CROISSANCE. CRITIQUE DES MÉTHODES.

Prélèvement des échantillons destinés aux mesures.

Les Algues adhérant au fond des récipients de culture sont soigneusement détachées au moyen de petits racloirs de caoutchouc, emmanchés à une baguette de verre, et stérilisés à l'autoclave. Puis, la culture est vivement agitée et 5 cm³ en sont prélevés et transportés en éprouvettes standard stériles qui seront introduites dans le néphélomètre.

Pour un type de culture et un temps donné nous avons mesuré, en général, les échantillons de cinq erlenmeyers.

Remarque: Pour éviter au maximum les risques d'infection, le contenu des éprouvettes n'est pas ultérieurement réintégré dans la culture. Aussi, est-il nécessaire de disposer de grandes séries de chaque type de culture afin de ne pas augmenter la concentration et changer les conditions en prélevant plus de deux ou trois fois 5 cm³ dans chaque flacon en cours d'essai.

I. Lectures néphéométriques.

L'évaluation de la croissance est donnée en unités néphéométriques (trouble relatif). Nous avons utilisé le disque comparatif 3, le filtre vert L2 et l'éclairage en coin du néphélomètre de Pulfrich.

¹ Au sujet de la stabilité de ce produit, cf. p. 132.

Critique de la méthode: Le néphélomètre mesure le pouvoir de dispersion de la lumière d'une suspension. Une modification des organismes en suspension (taille, lipogenèse, agrégation, etc.) fait varier le degré de dispersion de la lumière [8].

Le pH des solutions aurait également une action [9].

La néphélométrie permet, par des lectures pratiques et rapides, de suivre l'évolution d'une culture; mais il faut se souvenir que l'image quantitative qu'elle en donne est influencée par la qualité des microorganismes. Si nous avons employé la photométrie nous nous serions heurtés à des problèmes semblables [10].

Ajoutons cependant, que dans un travail avec des Algues, il est possible de suivre de visu l'évolution des cultures. Cela ne permet pas d'établir une courbe, mais de contrôler et de prévoir les résultats néphélométriques. Cette estimation visuelle est particulièrement précieuse quand il s'agit de comparer les croissances de cultures témoin et intoxiquées. Rappelons que le néphélomètre doit nous indiquer la concentration des cellules par unité de volume. Or, la qualité des particules est susceptible de modifier leur pouvoir de dispersion: la présence de substances toxiques entraîne de semblables variations. La comparaison des estimations visuelles et néphélométriques permet dans une certaine mesure de dépister ces variations.

II. *Sédimentation.*

Etant donné les critiques qu'on peut formuler au sujet de l'évaluation optique de la croissance de cultures d'Algues, nous avons cherché à mettre au point une méthode de sédimentation.

Matériel: Tubes à centrifuger se terminant par un capillaire de 1 mm de diamètre sur 2,5 cm de longueur.

Méthode: L'échantillon de culture à sédimenter est additionné de 2⁰/₀₀ de « Tween 20 » pour combattre l'adhérence des Algues aux parois du tube; puis réparti à raison de 2 cm³ par tube et centrifugé (3000 tours/minute, pendant 30 minutes).

La longueur de la colonne sédimentée est mesurée au cathétomètre [11]. Le nettoyage des tubes s'opère en y faisant circuler

de l'eau ou du mélange chromique au moyen d'un capillaire relié à une trompe à vide.

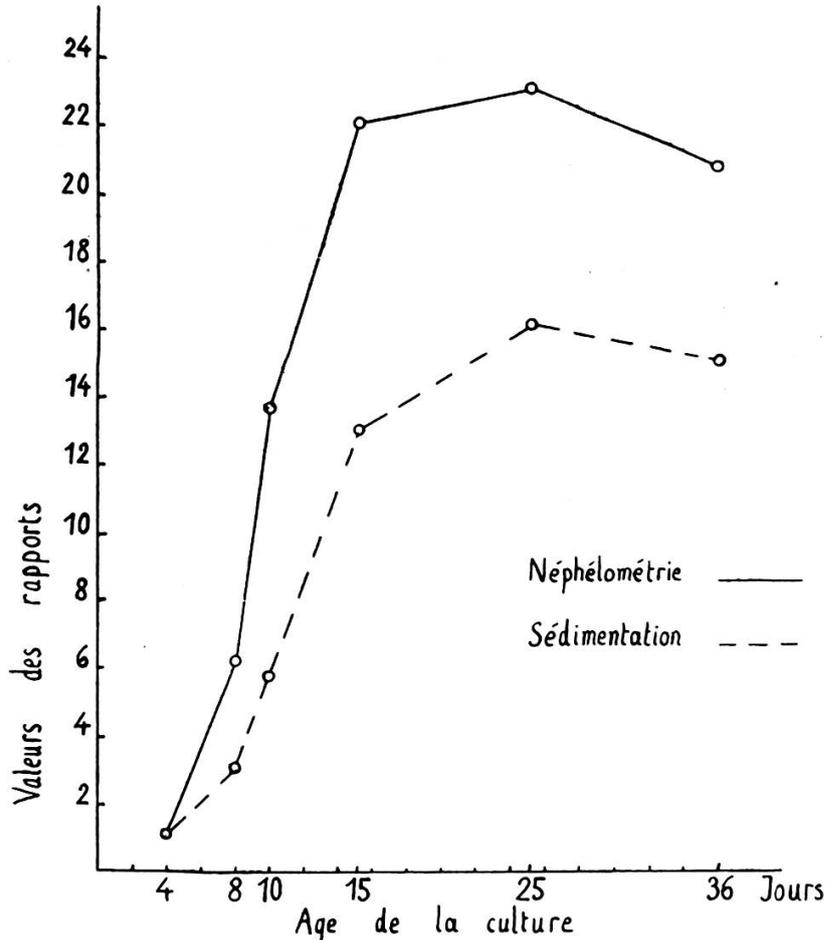


Fig. 1.

Courbes de croissance de l'Algue 116

établies d'après les valeurs du rapport: $\frac{\text{croissance au X}^{\text{e}} \text{ jour}}{\text{croissance au 4}^{\text{e}} \text{ jour}}$

Critique:

- a) Cette méthode demande des manipulations longues et minutieuses.
- b) Si on ne dispose pas de tubes rigoureusement identiques, on s'expose à des erreurs lors des comparaisons de mesures. Faire des calibrages de contrôle.
- c) La hauteur du sédiment nous renseigne sur l'augmentation d'une masse cellulaire (comprenant aussi bien les cellules

mortes que les vivantes); sur l'évolution de la pigmentation. (Dans certains cas imprévisibles et non reproductibles, nous avons obtenu une frontière très nette entre les cellules saines et celles déjà dépourvues de chlorophylle.)

- d) La hauteur du sédiment est fonction de l'état cellulaire. Pour une même vitesse et un même temps de centrifugation, les tassements varieront suivant cet état. Cette méthode ne permet donc pas des comparaisons plus rigoureuses que la néphélométrie entre des cultures diverses ou même des âges divers d'une culture.

Nous donnons ici l'étude de la croissance d'une culture du n° 116, évaluée néphélométriquement et par sédimentation (cf. fig. n° 1).

A notre avis, chaque méthode est valable pour elle-même, mais un rapport entre elles ne se justifie pas. Chacune de ces méthodes accorde une prédominance à une manifestation de la croissance.

La conversion des valeurs néphélométriques en valeurs de sédimentation n'est possible que dans un système défini de conditions, qu'il faudrait établir pour chaque variation de condition.

III. *Compte des cellules à l'hématimètre.*

Plusieurs auteurs [10; 12 à 16] ont compté les Algues dans un hématimètre de Thoma, Rosenthal ou Bürker.

Pour notre part, après quelques essais, nous avons abandonné cette méthode parce que longue et surtout trop imprécise quand il s'agit de cultures se développant mal sous l'effet d'un toxique. Car, en suivant le procédé de Rodhe [12], nous compterions les cellules d'un volume de 37.10^{-3} de millimètre cube, ce qui représente moins du millionième du volume total de la culture (50 cm^3). Cette fraction ne peut donner une image exacte d'une culture dont la population n'est pas homogène, mais composée de sporanges, de spores, de petites et de grandes cellules ayant souvent tendance à s'agréger. Il faudrait compter séparément ces divers éléments sur un volume beaucoup plus élevé et concentrer la population des cultures à faible développement.

Remarque: En résumé, l'étude de la croissance d'une culture d'Algues ne dispose pas encore de techniques absolument satisfaisantes.

II. EFFETS GÉNÉRAUX DES SULFAMIDÉS SUR LES ALGUES

REMARQUES CONCERNANT LE pH.

Dans nos essais, le milieu B et le milieu B plus sulfamidé ne sont pas tamponnés.

Nous avons suivi l'évolution du pH, au cours de la croissance, dans des cultures d'Algues 116 en milieu témoin et en milieu intoxiqué.

Appareil: potentiomètre de Beckmann.

Sulfamidé: sulfanilamide 2⁰/₀₀.

Résultats.

En milieu témoin:

- a) Pendant les premiers jours de culture le pH évolue rapidement vers la neutralité, passant de 5 (environ) à 7. Une fois la neutralité atteinte et dépassée (7,4), le pH demeure constant (mesures post: 23, 38, 50, 69, 118 jours).
- b) Cette modification débute à la fin du lag et se prolonge pendant la première partie de la phase logarithmique de croissance.

En milieu intoxiqué:

- a) La présence de S 2⁰/₀₀ abaisse le pH initial du milieu par rapport au pH initial du milieu témoin (abaissement: environ 0,6 au maximum).
- b) Le pH tend vers 7 et rejoint le pH de la culture témoin.
- c) Cette évolution commence à la fin du lag et se prolonge pendant la phase logarithmique de croissance.
- d) La présence de S 2⁰/₀₀ n'entrave donc pas l'alcalinisation du milieu.

Soit dans la culture témoin, soit dans la culture intoxiquée, l'évolution du pH exprime l'intensité du développement de la culture. Ainsi, dans des cultures faiblement inoculées, la neutralité est moins rapidement atteinte que dans des cultures parallèles fortement inoculées, ce qui s'explique puisque le développement des premières est en retard sur celui des secondes (cf. p. 157).

L'évolution du pH est un signe mesurable des transformations biochimiques qui accompagnent et conditionnent les premières phases de la croissance d'une culture.

TOXICITÉ COMPARÉE DES MOLÉCULES DE SULFAMIDÉS.

I. *Estimations néphélométriques.*

Ne connaissant pas le comportement de l'Oocystis 116 en présence de cibazol et de soluseptazine, nous l'avons cultivé parallèlement avec les trois sulfamidés choisis et présents en concentrations variées.

Nous avons fait les mêmes recherches avec le Scenedesmus n° 3.

Résultats: (cf. fig. 2).

a) Algue 116: cette Algue est résistante à l'action de sulfanilamide aux concentrations de 0,5, 1, 2⁰/₁₀₀ et à celle de la soluseptazine à la concentration de 0,5⁰/₁₀₀.

Elle se développe moins bien en présence de 0,5⁰/₁₀₀ de cibazol et à peine avec les concentrations de 1⁰/₁₀₀ de cibazol et 4⁰/₁₀₀ de sulfanilamide.

Cet organisme est sensible au cibazol à la concentration de 2⁰/₁₀₀ de cibazol et ne se développe pas non plus en présence de soluseptazine aux concentrations de 1, 2, 4⁰/₁₀₀.

Il ressort de ces constatations que, vis-à-vis de cette Algue, la molécule la moins toxique est la sulfanilamide et la plus toxique, la soluseptazine. Le cibazol a des effets intermédiaires.

b) Algue 3: cette Algue est sensible à l'action de la sulfanilamide et du cibazol; elle ne se développe pas en présence de

ces molécules, quelles que soient les concentrations essayées (0,5, 1, 2, 4‰).

Elle est sensible également à la concentration de 2‰ de soluseptazine (seule concentration employée avec cette Algue).

Ces résultats indiquent la spécificité de l'action des sulfamidés vis-à-vis des Algues; les effets sont différents suivant l'Algue, la molécule de sulfamidé et les concentrations.

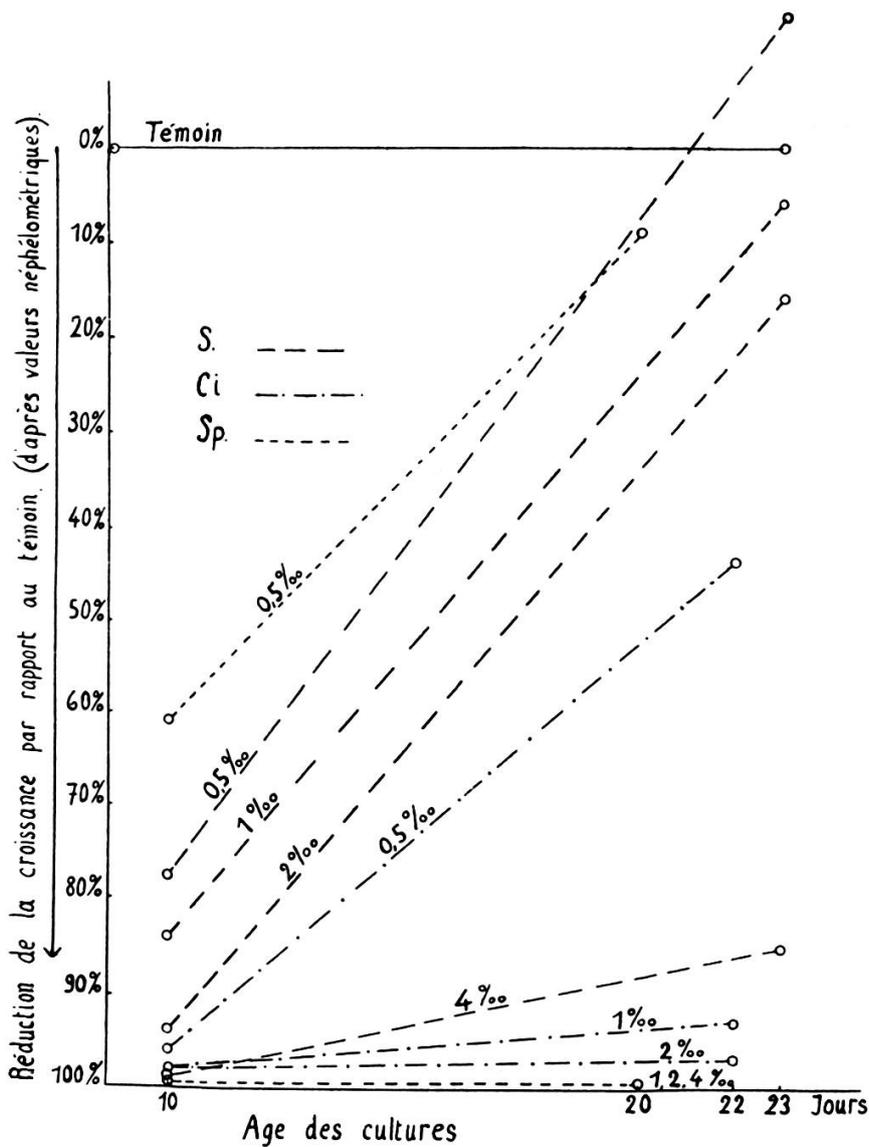


Fig. 2.

Algue 116. — Toxicité comparée des trois molécules de sulfamidés. Exprimée en pour-cents de réduction de la croissance.

Remarque sur la thermolabilité de la soluseptazine.

La figure n° 2 relate les résultats obtenus en présence de soluseptazine ajoutée aseptiquement et à froid au milieu B après sa stérilisation. En effet, d'autres expériences nous font croire à une thermolabilité de la soluseptazine. Cette molécule se scindrait à l'autoclave en libérant, vraisemblablement, de la sulfanilamide (cf. fig. 3).

De façon générale, les essais faits avec ce produit révèlent une inconstance des propriétés de cette préparation.

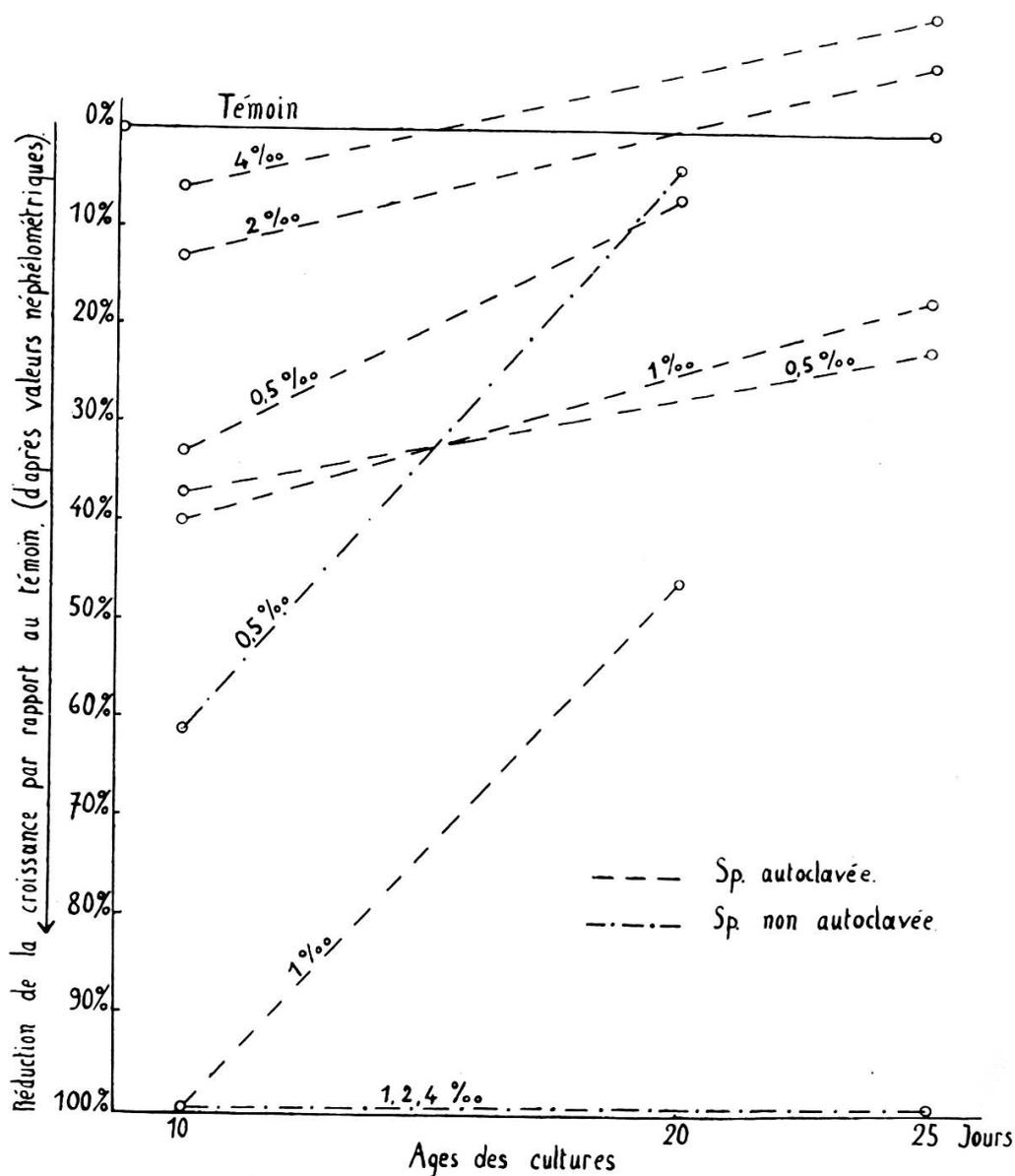


Fig. 3.

Algue 116. — Thermolabilité de la soluseptazine.

II. *Estimations colorimétriques.*

Nous avons cherché s'il était possible d'estimer la croissance par la quantité de chlorophylle produite.

Méthode.

- a) Les cultures servant au dosage de la chlorophylle sont préalablement mesurées par néphélométrie.
- b) Extraction de la chlorophylle: Pour chaque estimation, il est prélevé 5 cm³ de quatre erlenmeyers préalablement raclés et agités. Ces 20 cm³ de culture sont centrifugés, le dépôt repris par un peu d'acétone et transporté en mortier. Quand la majeure partie de l'acétone est évaporée, le dépôt humide est longement pilé au sable de quartz, puis transporté en éprouvette en présence de l'acétone dont on rince le mortier. Le mélange est abandonné trois ou quatre jours, puis filtré pour séparer le sable qui est lavé à l'acétone. Le filtrat acétonique est agité en présence de 10 cm³ d'éther de pétrole, puis coupé et lavé deux fois à l'eau. Avant de procéder à la mesure colorimétrique, la couche étherée, chargée des pigments, est encore filtrée pour éliminer l'émulsion grasseuse.

Vu la petite quantité de matériel, nous n'avons pas procédé à la séparation des caroténoïdes d'avec la chlorophylle [17], afin de ne pas augmenter les causes d'erreurs. La chlorophylle domine et c'est elle qui influence les lectures.

Appareil.

L'extrait pétroléique est estimé au photomètre de Pulfrich (filtre rouge S66 — cuve d'épaisseur 20,02 — liquide de référence: H₂O distillée).

Résultats (cf. fig. 4).

Adjonction d'asparagine: Des cultures intoxiquées par les sulfamidés et enrichies d'asparagine à 1⁰/₀₀, ont également été faites avec la même Algue 116; leur croissance fut évaluée par néphélométrie et par production de chlorophylle.

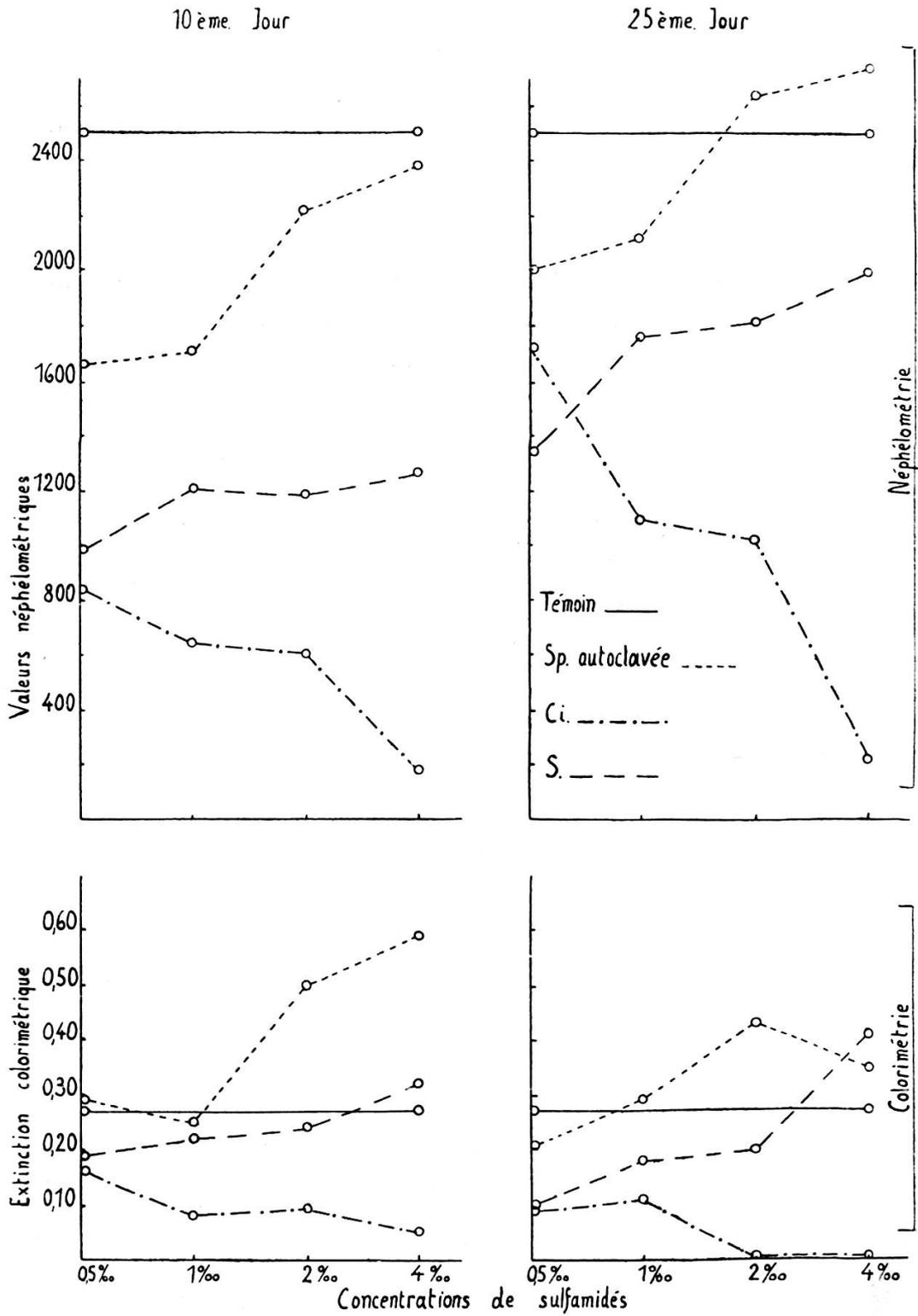


Fig. 4.

Algue 116. — Estimation de la croissance par néphélogométrie et par colorimétrie de la chlorophylle produite en fonction des concentrations de sulfamidés.

L'adjonction d'asparagine, si elle exalte légèrement la croissance, ne modifie pas l'action des sulfamidés.

Commentaires des courbes de la figure 4: La réduction de croissance due aux sulfamidés est révélée par la néphélométrie, mais masquée et même inversée par l'estimation colorimétrique des pigments extraits.

Cette constatation est vraie:

1° avec ou sans asparagine,

2° pour les trois molécules utilisées (en tenant compte qu'il s'agit ici de la soluseptazine chauffée),

Causes possibles de la divergence des résultats néphélométriques et colorimétriques:

a) Première hypothèse: « les cellules intoxiquées et les cellules témoin contiennent la même quantité de chlorophylle ».

L'estimation colorimétrique ferait croire que les sulfamidés favorisent la multiplication cellulaire, ce qui n'est pas le cas.

b) Deuxième hypothèse: « les cellules intoxiquées libèrent, au cours de l'extraction, plus aisément leur chlorophylle que les cellules témoin ».

Les résidus d'extraction des deux sortes de cultures étant également décolorés, nous empêchent de souscrire à cette hypothèse.

c) Troisième hypothèse: « les cellules intoxiquées contiennent une plus grande quantité de chlorophylle que les cellules témoins ».

Les constatations du verdissement des Algues au contact des sulfamidés [6] (cf., p. 136) viennent à l'appui de cette hypothèse. Il nous faut, alors, considérer les valeurs colorimétriques comme illusoires, en ce sens qu'elles font croire à un plus grand nombre de cellules qu'il n'y en a en réalité. L'hyperchromie cellulaire peut être, lors des lectures néphélométriques, un facteur de perturbation de la relation:

$$\frac{\text{dispersion de la lumière par les cellules}}{\text{nombre de cellules}}$$

Valeurs respectives des deux méthodes: Les deux méthodes: estimation néphélométrique de la suspension et estimation colorimétrique de la chlorophylle produite, fournissent des résultats également vrais, mais révélateurs de phénomènes différents: la néphélométrie exprime la multiplication cellulaire, alors que la colorimétrie souligne l'exaltation pigmentaire due aux sulfamidés. Ces deux procédés ne peuvent être employés l'un pour l'autre, parce que les sulfamidés font varier la pigmentation indépendamment de la croissance.

EFFET DES SULFAMIDÉS SUR LA CONSERVATION DE LA CHLOROPHYLLE.

Quelle que soit l'expérience envisagée, nous avons constaté, tout au long de notre travail, que les Algues traitées par les sulfamidés et qui leur résistaient (plus ou moins bien) devenaient plus vertes et le restaient beaucoup plus longtemps que les cellules témoin.

Remarquons que:

- 1° Cette conservation de la chlorophylle et cette exaltation probable du pouvoir de synthèse de la chlorophylle se développent en fonction de l'augmentation des concentrations de sulfamidés (dans la limite où la cellule résiste à ces dernières).
- 2° Au cours d'expériences où les sulfamidés sont ajoutés à une culture en voie de croissance, ce pouvoir de conservation diminue progressivement: plus l'adjonction est tardive, moins il y a conservation de la chlorophylle.
- 3° Au cours de certaines expériences, faites en présence de S 2⁰/₀₀, nous avons remplacé le liquide de culture usagé (méthode de décantation, cf. p. 143) par du liquide frais de même composition. Un renouvellement tardif du milieu intoxiqué favorise la conservation pigmentaire par rapport à un renouvellement précoce.
- 4° L'examen d'une culture de l'Oocystis 116, développée durant un mois et demi en présence de S 2⁰/₀₀, révèle une désorganisation cellulaire épargnant, en apparence, le plastide.

5° La persistance de la chlorophylle sur les chromatophores de cellules intoxiquées ne semble pas liée à la lipogénèse dans les cas que nous avons étudiés. Les lipides diffusent dans les cultures traitées comme dans les cultures témoin (film irrisé à la surface du liquide).

VALEUR NUTRITIVE (AZOTE) DE CES TROIS MOLÉCULES.

Lors de travaux antérieurs Chodat et coll. [6] avaient trouvé que la sulfanilamide n'était pas une source de carbone pour une Algue résistante. Par contre le remplacement de l'azote nitrique du milieu B par la sulfanilamide permettait une croissance des organismes et les protégeait contre une dégénérescence graisseuse en présence ou en absence de sucre (conservation de la chlorophylle).

Nous nous sommes proposé de vérifier cet apport d'azote par la sulfanilamide et de connaître s'il était dû à l'amine ou à l'amide en employant notre jeu de molécules.

Méthode.

Le calcium du milieu B est apporté sous forme de phosphate. L'azote est remplacé par des concentrations variables (0,5, 1, 2, 4⁰/₁₀₀) du sulfamidé envisagé.

L'inoculum provient soit d'une culture âgée de quinze jours dépourvue d'azote, soit d'une culture sur milieu A et subissant un lavage.

Algues utilisées: n° 116.

Résultats.

Contrairement aux résultats antérieurs, dans aucun des cas nous n'avons obtenu une croissance.

De ce fait, nous ne pouvons connaître la part respective de l'amine et celle de l'amide (Sp. chauffée ici).

L'examen microscopique montre des cellules malades ou envahies de lipides, avec seulement quelques traces de chlorophylle.

Ce résultat montre que dans ces conditions l'Algue est incapable de s'appropriier l'azote de ces molécules de sulfamidé et nous fait croire que cet azote ne joue pas le rôle supposé ci-dessus dans la résistance de cette Algue aux sulfamidés.

III. RESTAURATION SPONTANÉE DU TAUX NORMAL DE CROISSANCE CHEZ DES CULTURES INTOXIQUÉES: « COMPENSATION »

Le phénomène de compensation.

Les publications antérieures [5 et 6] ainsi que les deux chapitres précédents appliquent les étiquettes de « sensibles » et « résistantes » aux Algues étudiées en présence de sulfamidés.

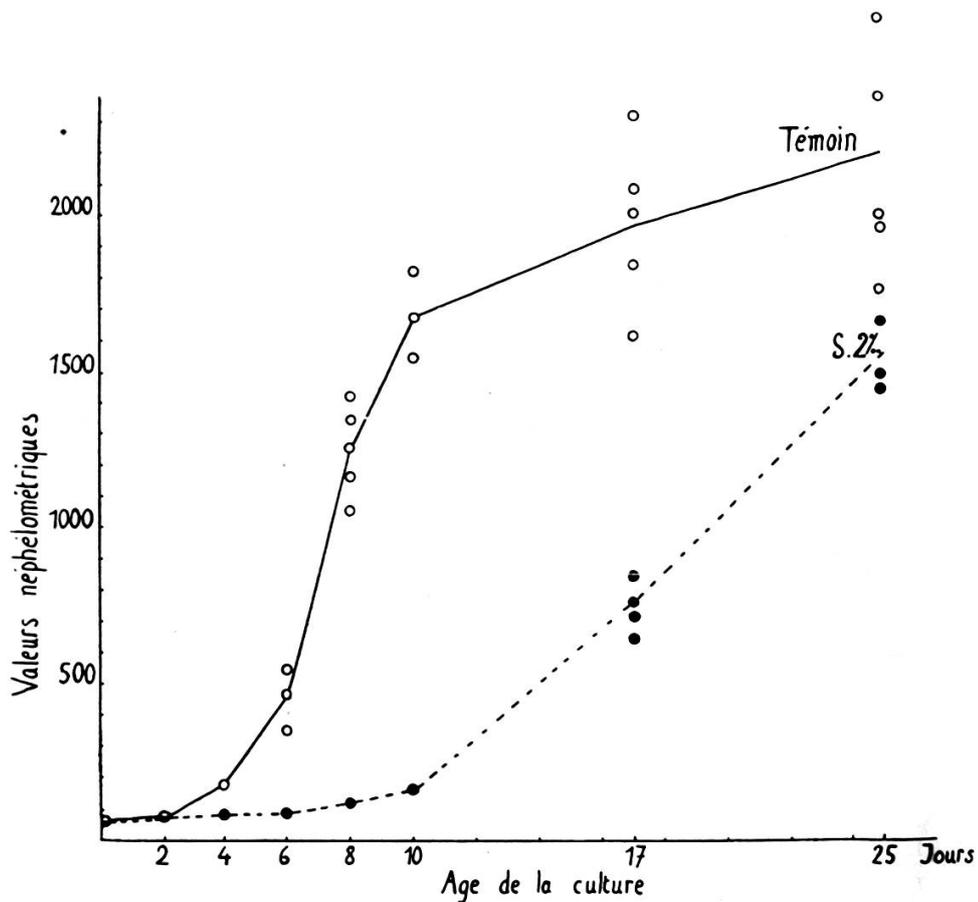


Fig. 5.

« Compensation » par l'Algue 116 en présence de sulfanilamide 2 ‰.

Cela signifie qu'au bout d'un temps plus ou moins long, les cultures intoxiquées présentent soit une croissance nulle, soit une croissance égale à celle du témoin. Ces appréciations s'appliquent à l'état final de la culture.

En effet, l'étude systématique des croissances nous montre que le terme de résistant n'est pas complet, car il ne rend pas compte du processus de développement de la culture intoxiquée. Les Algues dites résistantes ne croissent pas en milieu témoin et en milieu intoxiqué selon un rythme semblable (cf. fig. 5).

En présence de sulfamidé, la culture d'Algues subit une période de « lag » prolongée. Cette inhibition se dissipe progressivement jusqu'à devenir nulle.

Nous appellerons « compensation » cette restauration spontanée du taux de croissance et tenterons d'en étudier la nature.

Aspect génétique de la compensation: adaptation.

La première explication du phénomène de compensation à laquelle on songe, est l'adaptation sélective des Algues aux molécules de sulfamidés.

Cette acquisition d'une résistance aux sulfamidés est-elle transmissible aux générations suivantes ?

Dans ce cas, des populations dont l'inoculum serait issu d'une culture ayant compensé ou en train de le faire, auraient, en milieu intoxiqué, un développement se rapprochant de celui de cultures témoin.

Partie expérimentale.

Des cultures en présence de sulfanilamide, suivies de repiquages successifs dans le même milieu intoxiqué, ont été faites avec diverses Algues.

Algues	Sulfamidé	Nombre de subcultures
3	S 0,5 ‰	1
62	»	1
68	»	1
516	S 2 ‰	2
116	»	3

Résultats.

Le n° 3 ne se développe pas en présence de sulfanilamide.

Pour les autres Algues, un « freinage » suivi de « compensation » se manifeste chaque fois, de culture en culture.

Le rythme de croissance des subcultures est, aux erreurs d'expérience près, le même que celui de la culture.

La compensation n'est donc pas une sélection, ni une mutation d'organismes plus résistants aux sulfamidés.

Aspect métabolique de la compensation.**I. RESTAURATION EXPÉRIMENTALE DU TAUX NORMAL DE CROISSANCE PAR ADDITION DE PAB ET D'ACIDE FOLIQUE.**

L'action *in vitro* du PAB comme antagoniste des sulfamidés pour de nombreuses bactéries est une expérience classique. Ce pouvoir de protection a déjà été signalé pour les Algues [5].

Il était intéressant de connaître l'action de cette molécule sur les Algues que nous étudions au point de vue de leur compensation.

*Partie expérimentale.**a) Adjonction de PAB ante inoculum:*

Le PAB, à raison de 0,0005⁰/₀₀, est adjoint au milieu B plus sulfamidé avant l'inoculation.

Algues étudiées	Sulfamidés	Résultats
62	S 0,5 ⁰ / ₀₀	Protection par le PAB
68	S 0,5 ⁰ / ₀₀	» »
116	S 2 ⁰ / ₀₀	» »
116	Ci 2 ⁰ / ₀₀	» »
3	S 0,5 ⁰ / ₀₀	» »
3	S 2 ⁰ / ₀₀	Pas de protection
3	Ci 2 ⁰ / ₀₀	» »
3	Sp 2 ⁰ / ₀₀	» »

Commentaires.

1. Pour les nos 62 et 68, la présence de PAB supprime la prolongation du « lag » due à S 0,5⁰/₀₀, rétablissant le rythme normal de croissance.

Il en est de même pour l'Algue 116 en présence de S 2⁰/₀₀. Cet organisme compense mal en présence de Ci 2⁰/₀₀; dans le milieu intoxiqué, enrichi de PAB, la compensation est complète et s'organise plus rapidement.

2. L'Algue 3, qui ne compense pas en présence de S 0,5⁰/₀₀, se développe dans le milieu intoxiqué enrichi de PAB. Par contre, le PAB n'a pas d'effet protecteur vis-à-vis des molécules de S, Ci et Sp à la concentration de 2⁰/₀₀, et les cultures ne croissent pas.

L'action du PAB est beaucoup plus significative avec le n° 3 (non compensant) qu'avec les autres Algues. Nous avons vis-à-vis de S 0,5⁰/₀₀ une réelle restauration expérimentale du taux de croissance, alors que nous n'obtenons pas cette restauration dans les autres cas. Il y a là une correspondance avec les expériences déjà faites sur les bactéries concernant l'action compétitive du PAB avec les sulfamidés [18 à 20].

b) Adjonction de PAB post inoculum:

Le PAB est adjoint au milieu toxique plus ou moins longtemps après l'inoculation.

Nous n'avons pas fait ici de recherches systématiques. Nous avons simplement tenté quelques essais de « guérison » tardive de cultures demeurées en stasie complète sous l'effet de sulfamidés.

Nous donnons les résultats à titre d'indications dans le tableau qui suit:

Age auquel PAB est ajouté	Algues	Sulfamidés	Concentration en PAB *	Résultats
20 jours	116	Sp 2 ⁰ / ₀₀	1 ⁰ / ₀₀	Pas de protection
22 »	116	Ci 2 ⁰ / ₀₀	5 ⁰ / ₀₀	Protection
37 »	3	S 0,5 ⁰ / ₀₀	7 ⁰ / ₀₀	Protection
47 »	3	Sp 2 ⁰ / ₀₀	6-8 ⁰ / ₀₀	Pas de protection
50 »	116	Sp 2 ⁰ / ₀₀	6-8 ⁰ / ₀₀	Pas de protection

* Concentrations de PAB en $\gamma.10^{-1}$.

Ces résultats sont en accord avec des données acquises, soit :

- 1° l'Algue 3, en présence de S 0,5⁰/₀₀, est protégeable par le PAB;
- 2° la soluseptazine est la molécule la plus toxique.

Ce tableau indique le pouvoir régénérateur de la division cellulaire par le PAB, après une stasie prolongée. Dans les cas où ce pouvoir ne se manifeste pas (Sp 2⁰/₀₀), on peut se demander si la concentration en PAB est insuffisante ou s'il s'agit de cultures dont les cellules ont passé de l'état de stasie à celui de mort.

Ces indications font entrevoir qu'il y aurait toute une série de recherches à faire sur la concentration minimale du PAB en fonction de la concentration et de la nature de la molécule du sulfamidé; sur l'âge-limite auquel le PAB peut avoir encore une action en fonction de l'Algue et des molécules de toxique.

Protection par l'acide folique.

Quelques-unes de nos Algues étant protégeables par le PAB, nous nous sommes demandé si elles l'étaient également par l'acide folique. L'acide folique, d'après les hypothèses admises actuellement, serait un corps intermédiaire dans la chaîne des réactions conduisant à la synthèse de certaines purines, thymine, acides aminés.

L'inactivation par le sulfamidé du système enzymatique en relation avec le PAB suspendrait la synthèse de l'acide folique. En effet, en donnant de l'acide folique à certaines bactéries (certains Streptococcus), on les protège contre l'effet des sulfamidés.

Partie expérimentale.

Adjonction ante inoculum.

Milieu B plus S 0,5⁰/₀₀ plus acide folique à la concentration de 0,0015⁰/₀₀. (Nous avons choisi cette concentration d'après les données de Lampen et Jones [20] sur l'activité moindre de l'acide folique par rapport à celle du PAB.)

Algues: n^{os} 3, 62, 68.

Résultats.

Dans ces conditions, l'acide folique ne protège pas le n° 3 et n'abrège pas le lag prolongé, en présence de S 0,50/00, des Algues 62 et 68.

Ces résultats négatifs peuvent avoir plusieurs causes:

- a) Concentrations insuffisantes en acide folique.
- b) Ces Algues ne peuvent pas employer l'acide folique tel quel (du moins pas celui-ci; il y en aurait plusieurs).
- c) Ces Algues ne peuvent utiliser que l'acide folique synthétisé à partir du PAB.
- d) Ces Algues n'ont pas besoin d'acide folique.

Comme on le voit, ces essais demanderaient à être complétés pour mieux connaître le métabolisme de ces microorganismes.

II. HYPOTHÈSES CONCERNANT LE MÉCANISME DE LA COMPENSATION.

La protection par le PAB, notée au chapitre précédent, se traduit par une restauration expérimentale du taux normal de croissance.

La restauration spontanée, sans l'apport expérimental de PAB, se fait-elle par l'intervention d'un PAB ou de celle d'autres substances aux effets similaires produits par les Algues ?

La protection par le PAB n'élucide pas le mécanisme de la compensation; elle suggère l'existence de substances contre-poison.

S'il y a formation de ces substances:

- a) sont-elles diffusibles dans le milieu ?
- b) sont-elles endocellulaires ?

III. RECHERCHES DE SUBSTANCES ANTAGONISTES DIFFUSIBLES ET DÉCELABLES DANS LE MILIEU DE CULTURE.

A. Procédé par soustraction: technique de la décantation.

Hypothèse.

En soustrayant le liquide de culture, nous enlevons aux Algues les substances antisulfamides qu'elles sont supposées y avoir secrété, et nous entravons ainsi la compensation.

Technique.

- a) Culture du n° 116 en présence de sulfanilamide 2⁰/₀₀.
- b) Pour soustraire le liquide de culture nous n'avons pas choisi la méthode de centrifugation vu la longueur des manipulations qu'elle exigeait, puisque nous devons opérer aseptiquement sur un grand nombre de flacons.
- c) Grâce au phénomène de sédimentation naturelle des cellules de cette Algue et grâce surtout à leur adhérence au fond de l'erlenmeyer, nous avons pu procéder à une simple décantation du liquide de culture surnageant.
- d) Le liquide soustrait est remplacé par une quantité identique de milieu frais de même composition.
- e) L'expérience comporte:
- 1^o une série de cultures qui ne sont pas décantées:
 - soit: 15 erlenmeyers de milieu B (témoin),
 - et 15 » » » B plus sulfanilamide;
 - 2^o plusieurs séries de cultures décantées chacune une fois:
 - soit: A) 5 erlenmeyers de milieu B (témoin),
 - 15 » » » B plus sulfanilamide,
 - décantés au bout de 48 heures.
 - B) 5 erlenmeyers de milieu B (témoin),
 - 15 » » » B plus sulfanilamide,
 - décantés au bout de 4 jours.
 - C) etc., etc.
- f) Age des cultures au moment de leur décantation: 48 heures, 4, 6, 8 et 12 jours.

Résultats et critique.

La décantation n'exerce aucun effet négatif ou positif tant sur le témoin que sur l'intoxiqué, quel que soit l'âge auquel elle a été faite.

Ce résultat paraît exclure l'hypothèse de substances anti-sulfamides **largement** diffusées dans le milieu. Cependant, la technique employée n'élimine pas la totalité du liquide de culture (quantité restante: 0,5 à 1 cm³) et la portion restante

pourrait contenir suffisamment de substances antisulfamides, de telle sorte que le liquide enlevé ne jouerait pas de rôle.

La ou les substances antisulfamides pourraient encore avoir été adsorbées sur les cellules et être donc difficilement éliminables par ce procédé.

Les expériences de décantation n'excluent pas définitivement l'hypothèse de l'existence d'un principe diffusible demeuré en quantité suffisante dans le liquide résiduel (action-trace).

B. Procédé par addition : technique de l'adjonction de filtrat de cultures.

Parallèlement aux essais dits de décantation, nous avons recherché la présence de substances antisulfamides diffusées dans le milieu au cours de la compensation, par une seconde méthode. Cette dernière consiste à introduire dans la culture intoxiquée une certaine quantité de filtrat d'une autre culture. Le rythme de croissance de la culture intoxiquée additionnée de filtrat doit nous révéler la présence ou l'absence de substances antisulfamides dans le filtrat. La qualité des cultures à filtrer joue, donc, le rôle principal dans ces essais.

Si le principe d'adjonction de filtrat est simple, sa réalisation expérimentale peut être envisagée de diverses façons :

- 1° filtrat témoin sur culture témoin,
- 2° » » » » intoxiquée,
- 3° » intoxiqué sur culture témoin,
- 4° » » » » intoxiquée.

Ces quatre cas se subdivisent encore :

- a) selon l'âge auquel la culture est filtrée,
- b) selon l'âge de la culture à laquelle est ajouté le filtrat,
- c) selon la quantité de filtrat ajoutée.

On suppose dans les cas 1 et 2 l'existence d'un principe diffusé spontanément par les cellules en voie de division. On s'attend aussi à des actions inhibitrices produites par des filtrats âgés (staling effect).

En présence de sulfamidé, une diffusion différée, éventuellement exaltée, de substances contre-poison, conditionnerait la compensation; le cas 4 devrait justifier cette hypothèse.

Partie expérimentale.

a) *Obtention du filtrat stérile.*

La culture raclée et agitée est filtrée sur filtre Seitz.

b) *Age de la culture à filtrer.*

Nous avons, en général, choisi des cultures jeunes, soit juste à la fin du lag (3 ou 4 jours), soit en pleine phase de division (10 ou 11 jours), estimant que c'était à ces moments que les substances antisulfamides devaient probablement se former et que la concentration en toxines serait la plus faible.

c) *Quantité de filtrat ajoutée (cf. tableau).*

d) *Age de la culture à laquelle est ajouté le filtrat.*

Sauf mention spéciale *, les milieux de culture sont additionnés de filtrat avant d'être inoculés.

Effet du filtrat d'une culture non intoxiquée.

Cultures additionnées de filtrat		Provenance du filtrat			Concentration en filtrat	Résultats
Algues	Milieu	Algues	Milieu	Age		
116	B	116	B	10 jours	50%	Prolongation du lag
116	B+S 2 ‰	116	B	10 »	50%	Effet nul
116	B+S 2 ‰	116	B	3 »	10%	Effet nul
116	*B+Sp 1 ‰	116	B	9 »	6%	Croissance de la culture
3	*B+S 0,5 ‰	116	B	10 »	6 et 16% 33%	Effet nul Croissance
3	*B+S 1, 2, 4 ‰	116	B	10 »	6 et 16% 33%	Effet nul » »
3	*B+Ci 0,5, 1, 2 ‰	116	B	10 »	6 et 16% 33%	Effet nul » »

Commentaires.

a) Le filtrat d'une culture témoin n'a eu aucune action sur les cultures intoxiquées qui se sont comportées comme les cultures intoxiquées sans filtrat.

A cette constatation principale, ajoutons que dans les cultures témoin, la prolongation du lag révèle l'action freinante due aux substances amenées par le filtrat. Une action semblable a déjà été décelée dans des cultures d'Algues [20-21], mais avec des cultures plus âgées.

Les seuls effets protecteurs furent observés dans les conditions suivantes: tentative de « guérison » tardive (* filtrat ajouté au 34^e et au 38^e jour de culture) d'un échantillon de culture demeurée en stasie complète. Il ne s'agit pas dans ces deux cas d'essais en grande série.

Effet du filtrat d'une culture intoxiquée.

Cultures additionnées de filtrat		Provenance du filtrat			Concentration en filtrat	Résultats
Algues	Milieu	Algues	Milieu	Age		
116	B	116	B+ S 2‰	11 jours	50%	Prolongation du lag
116	B+ S 2‰	116	B+ S 2‰	11 »	50%	Effet nul
116	B+ S 2‰	116	B+ S 2‰	45 »	50%	Effet nul

Commentaires.

a) La prolongation du lag en milieu témoin est certainement due à l'apport en sulfanilamide par le filtrat.

b) Des cultures en train de compenser (11 jours), ou ayant compensé (45 jours), donnent un filtrat inactif sur des cultures intoxiquées.

Les résultats obtenus paraissent, comme dans les essais de décantation, exclure l'hypothèse d'un principe antisulfamide diffusé dans le milieu.

La technique de filtration a l'avantage sur celle de la décantation de mettre en œuvre la totalité du liquide de culture, y

compris l'intercellulaire. Si ce liquide intercellulaire contenait un principe actif, même en quantité infime, le filtrat aurait dû se révéler actif.

IV. RECHERCHES DE SUBSTANCES ANTAGONISTES ENDOCELLULAIRES.

Les expériences précédentes font supposer que les substances antagonistes des sulfamidés sont endocellulaires et non pas exocellulaires.

L'époque à laquelle elles expriment leur pouvoir peut contribuer à la connaissance de leur nature.

DÉTERMINATION DE L'ÂGE DE LA CULTURE AUQUEL SE MANIFESTENT CES SUBSTANCES

Toutes les expériences faites au cours de ce travail tendent à prouver qu'il existe un seuil de concentration d'une substance inconnue, nécessaire au départ de la multiplication des Algues en présence de sulfamidés. Cela est vrai aussi pour le témoin (période de lag).

Emettons l'hypothèse suivante: « Les sulfamidés freinent la production de la substance nécessaire. Le débit intracellulaire de ce principe est donc diminué: le temps nécessaire pour atteindre le seuil est augmenté d'où la prolongation du lag. Elle peut être infinie si le freinage est total. »

Quel est alors l'âge, dans une culture témoin, à partir duquel est atteint le seuil de concentration suffisante pour vaincre une dose X de sulfamidé ?

a) *Technique des intoxications différées.*

1. Pour chaque Algue et chaque sulfamidé testé les séries d'erlenmeyers suivantes sont inoculées:

a) 15 erlenmeyers de milieu B (témoin).

b) » » » B plus sulfamidé (ajouté avant l'inoculation).

- c) 15 erlenmeyers de milieu B plus sulfamidé ajouté après 48 heures de culture.
- d) 10 » » » B plus sulfamidé ajouté après 4 jours de culture.
- e) Etc., etc.

2. Le sulfamidé est ajouté stérilement à la culture de façon à obtenir une concentration de 2⁰/₀₀ dans le milieu de culture.

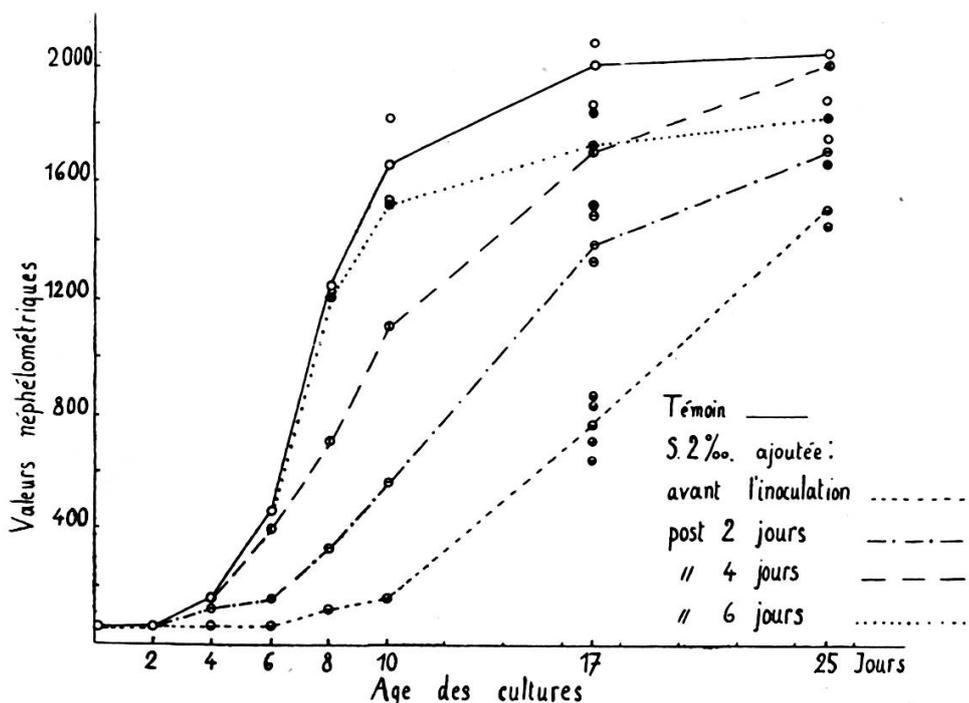


Fig. 6.

Intoxications différées de l'Algue 116 par la sulfanilamide 2⁰/₀₀.

3. Ages de la culture auxquels les sulfamidés sont ajoutés : 2, 4, 6, 8 jours, avec quelques variations d'un essai à l'autre (ex. : 2, 4, 5, 6, ou 1, 2, 3, 4, 5 jours).

4. Mesures : les mesures néphélométriques sont faites parallèlement sur cinq erlenmeyers de chaque série.

5. Algues utilisées : n° 116 et n° 3.

6. Sulfamidés ajoutés : sulfanilamide, cibazol et soluseptazine (non autoclavée) — Concentrations : 2⁰/₀₀.

Résultats (cf. fig. 6 à 11).

Algue 116: Les expériences précédentes ont montré que l'Algue 116 surmonte spontanément et à la longue (compensation) une intoxication par la sulfanilamide et le cibazol, ajoutés

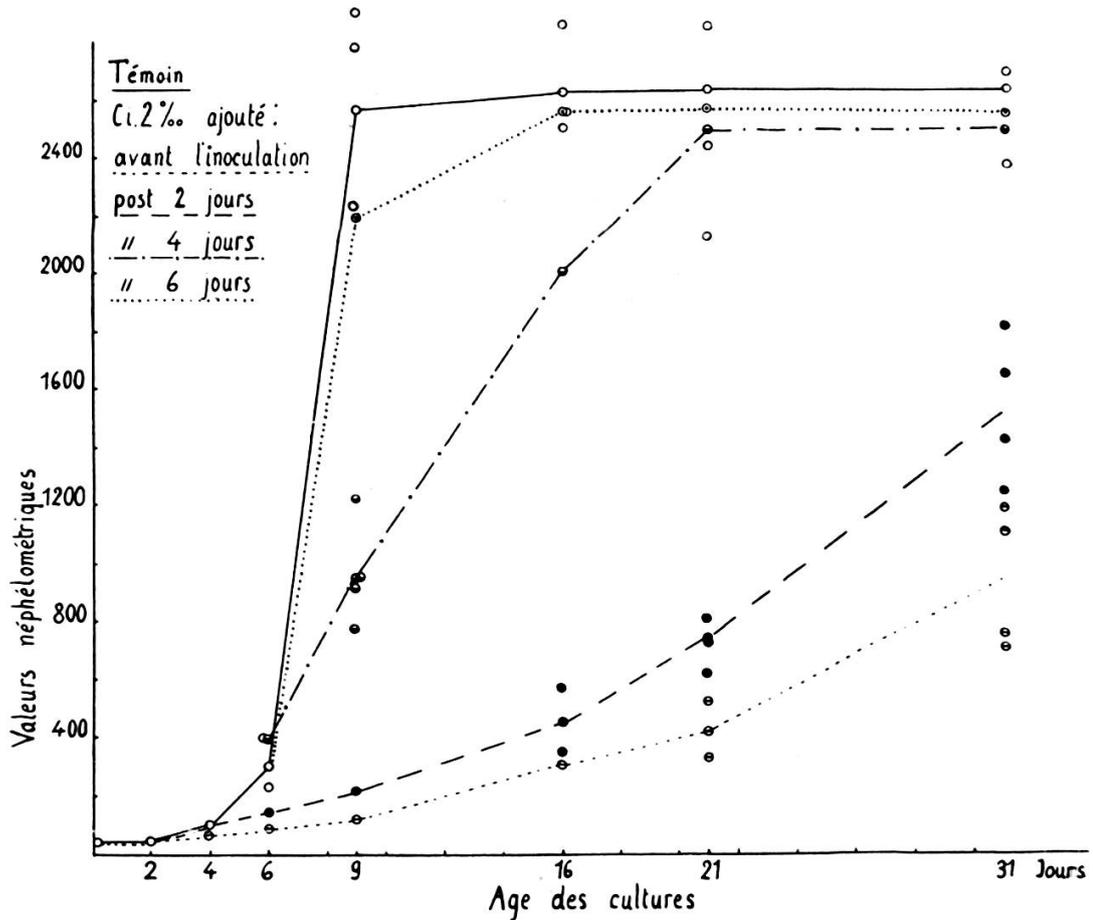


Fig. 7.

Intoxications différées de l'Algue 116 par le cibazol 2 ‰.

avant l'inoculation. Cet organisme ne compense pas, dans les mêmes conditions, l'intoxication par la soluseptazine intacte.

Les résultats indiqués par les figures 6, 7 et 8 montrent que :

- a) en présence de S 2 ‰ et de Ci 2 ‰, plus l'adjonction du sulfamidé est tardive, plus la compensation s'organise rapidement, jusqu'à rejoindre le rythme de croissance du témoin ;

b) l'intoxication du milieu opérée 48 heures après l'inoculation fournit avec la Sp. un résultat comparable à celui de l'intoxication *ante inoculum*: pas de compensation.

Par contre les adjonctions ultérieures n'ont pas d'influence sur la croissance qui égale celle du témoin.

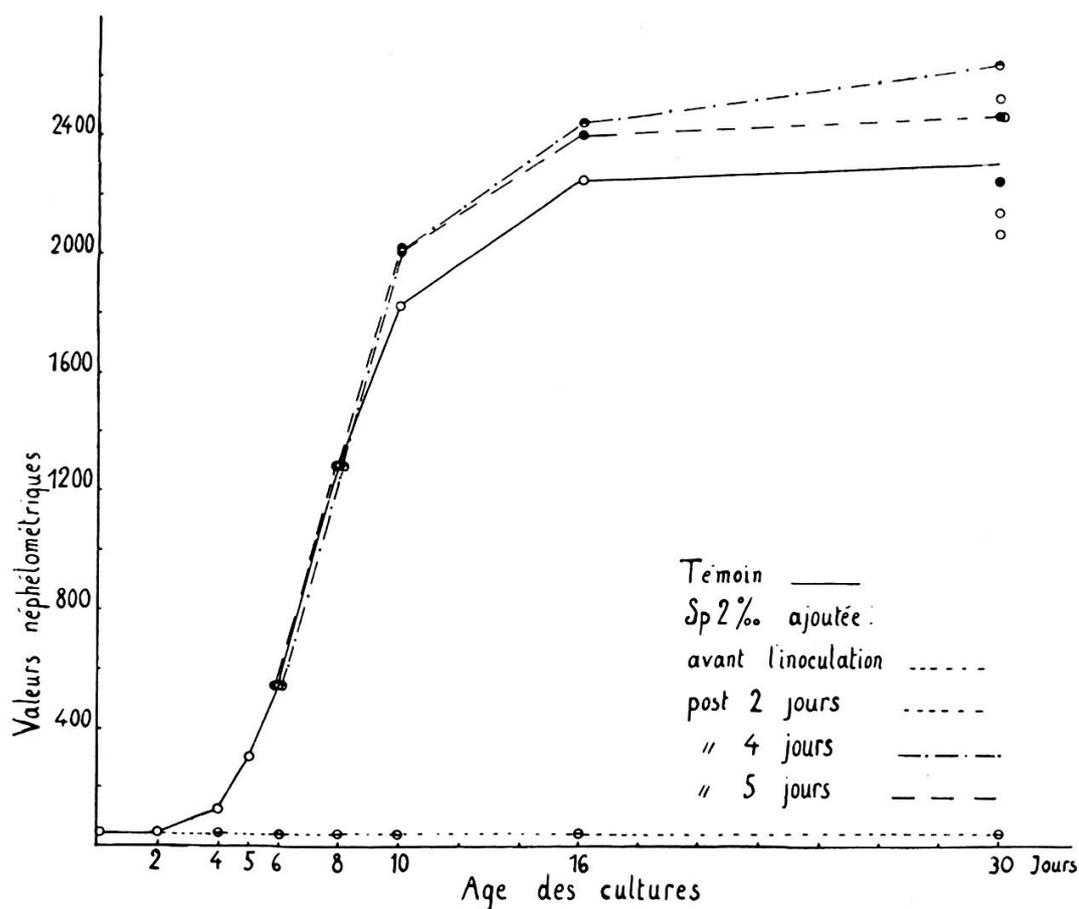


Fig. 8.

Intoxications différées de l'Algue 116 par la soluseptazine 2 ‰ intacte.

Algue 3: L'Algue 3 avait été considérée comme « sensible » attendu qu'elle ne fournissait aucune compensation lors d'intoxications faites avant l'inoculation.

Le comportement de cette Algue demeure le même quand la sulfamilamide est ajoutée après 24 heures de culture (fig. 9), le cibazol et la soluseptazine après 48 heures de culture (fig. 10-11).

Des additions plus tardives de chacune de ces molécules ont une efficacité moindre: inhibition temporaire de la croissance pour S 2⁰/₀₀ et Ci 2⁰/₀₀, inhibition nulle pour Sp 2⁰/₀₀.

Ces résultats nous font modifier l'étiquette de « sensible » appliquée à l'Algue 3. Elle n'est sensible (ne compensant pas) que si le sulfamidé est présent avant l'inoculation ou au tout début de la culture (24 à 48 heures).

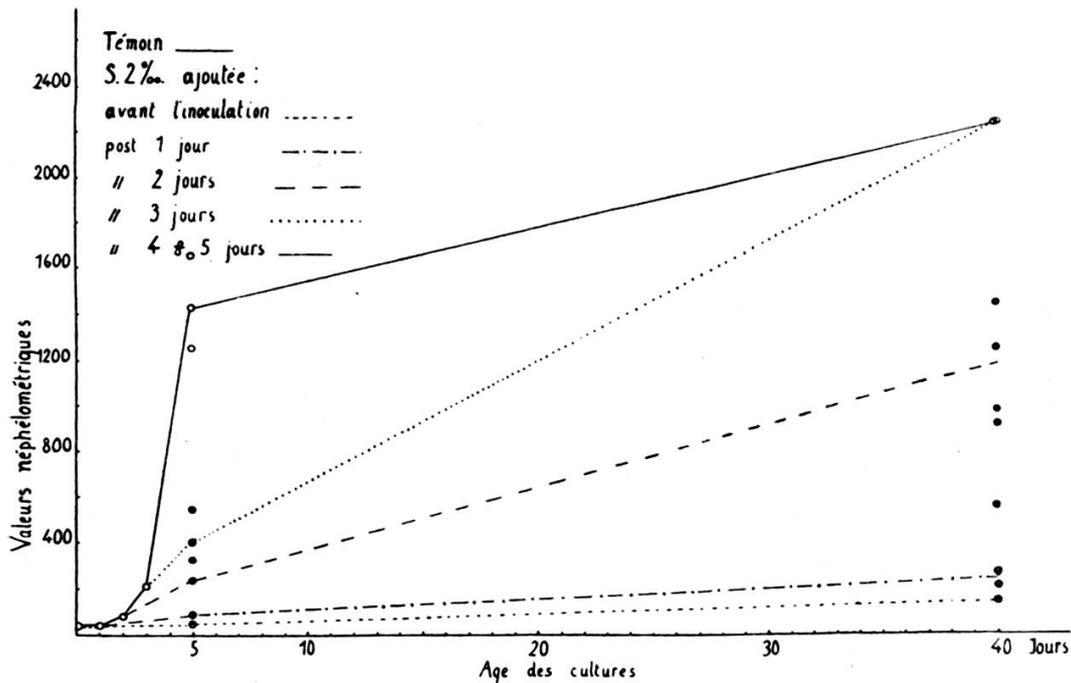


Fig. 9.

Intoxications différées de l'Algue 3 par la sulfanilamide 2 ‰.

En résumé, quelle que soit la molécule (sulfanilamide, cibazol, soluseptazine) sa toxicité diminue jusqu'à devenir nulle suivant l'époque à laquelle elle est ajoutée. Ceci reste vrai même pour un sulfamidé dont la toxicité n'est pas surmontée spontanément et à la longue par l'Algue (ex.: Algue 116 en présence de Sp.).

Ces expériences montrent que ces Algues offrent à partir d'un certain âge de culture (fin du lag) une insensibilité progressive à l'égard du poison. Cette époque d'insensibilité correspond au temps où le seuil de concentration suffisante en substances antisulfamidés est atteint. Les facteurs multiples qui président

à cet équilibre empêchent d'en fixer la date à un jour près pour un système expérimental donné.

b) *Technique faisant appel à des inocula de qualité différente.*

Les expériences d'intoxications différées montrent qu'après quelques jours, la culture est plus résistante qu'au début à l'action des sulfamidés.

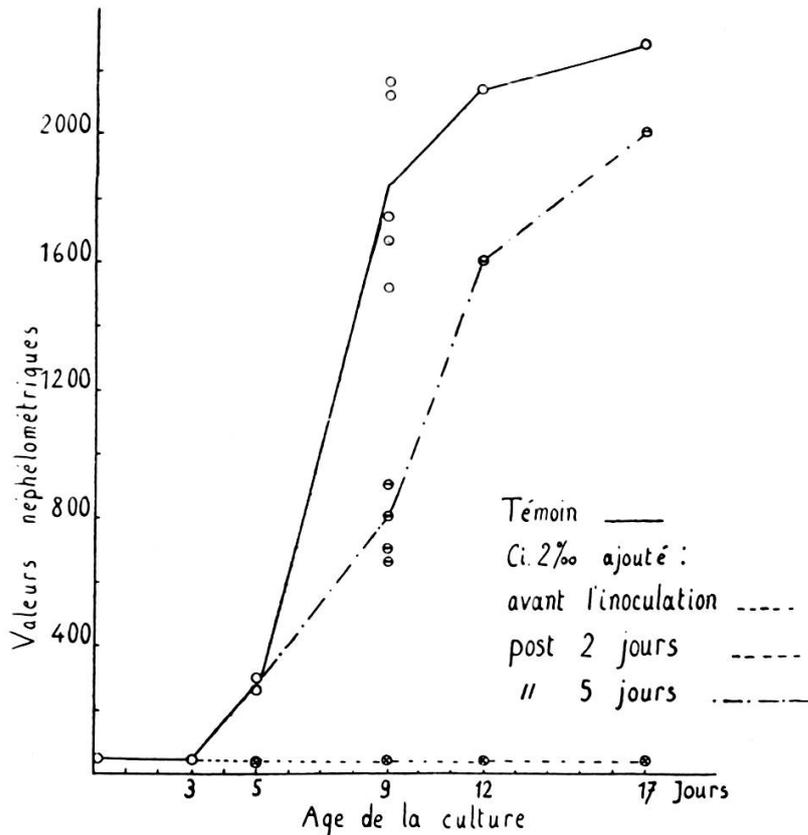


Fig. 10.

Intoxications différées de l'Algue 3 par le cibazol 2 ‰.

Quel est le facteur responsable de cette résistance ?

Les examens des liquides de culture (adjonction de filtrat — décantation) n'ont pas donné d'indice suffisant de l'existence d'un contre-poison extracellulaire.

Y a-t-il, alors, dans les Algues, après quelques jours de culture, accumulation d'une substance antisulfamide ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons cherché à connaître le comportement en présence de sulfanilamide, de

cultures parallèles, inoculées par des Algues de « qualité » différente (âges différents).

Partie expérimentale.

Expériences faites avec l'Algue 116.

Inoculum de cellules jeunes : Le liquide d'une culture (milieu B) âgée de cinq jours, est décanté; puis partiellement remplacé par 10 cm³ de milieu frais. Cette opération, répétée sur quatre

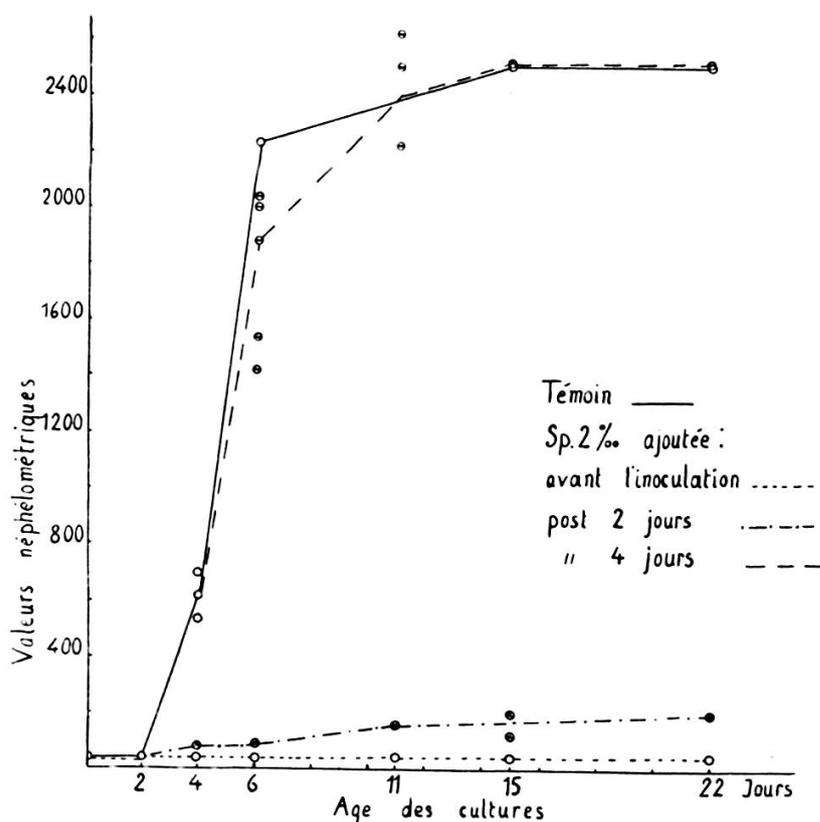


Fig. 11.

Intoxications différées de l'Algue 3 par la soluseptazine 2 ‰ intacte.

erlenmeyers, a pour but d'éliminer la solution nutritive usagée et de concentrer les cellules.

Les cellules adhérant au fond de l'erlenmeyer sont raclées et remises en suspension par agitation du flacon; cette suspension est transférée dans une éprouvette stérile et mesurée au néphélomètre. Cette provision d'Algues sert à l'inoculation de: quinze erlenmeyers de milieu B (témoin) et de quinze erlenmeyers de milieu B plus sulfanilamide 2 ‰.

Inoculum de cellules âgées: On prépare une suspension (de valeur néphélométrique égale à celle de la suspension de cellules jeunes) à partir de cellules développées durant un à deux mois sur malt-agar (milieu A). Cette suspension sert à l'inoculation d'une seconde série de milieux témoins et intoxiqués.

La difficulté de ces opérations réside dans l'obtention de suspensions de troubles équivalents.

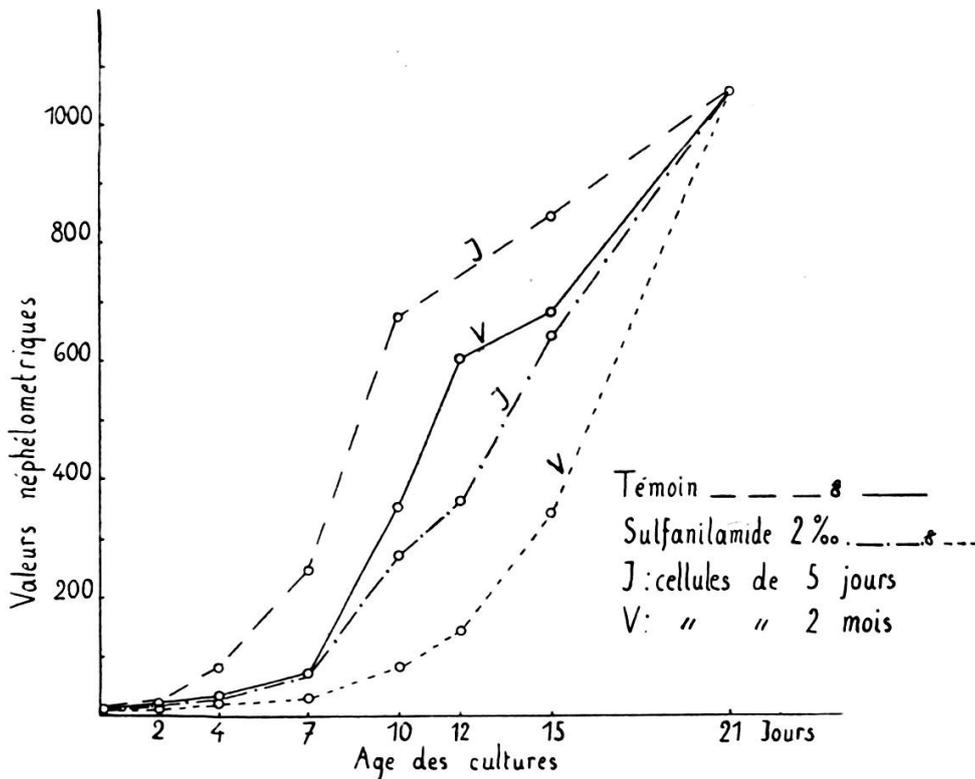


Fig. 12.

Croissances de cultures d'Algue 116 issues d'*inoculum* de qualité différente.

Résultats (cf. fig. 12).

Cultures en milieu témoin: Les cultures de la série J (jeunes cellules) accusent un lag très réduit et une croissance plus rapide que les cultures de la série V (cellules âgées).

Les cellules âgées de cinq jours ont donc une puissance multiplicatrice supérieure à celle des cellules âgées d'un mois.

Cultures en milieu intoxiqués: La compensation s'organise plus rapidement avec des cellules jeunes qu'avec des cellules

âgées. Toutefois, ces cellules jeunes croissent plus lentement en présence de S 2⁰/₀₀ qu'en l'absence de S 2⁰/₀₀.

La puissance multiplicatrice exaltée des cellules jeunes paraît jouer un double rôle: à la fois mitogène et antisulfamide.

Ce résultat renforce l'hypothèse d'un élément de résistance aux sulfamidés de nature endocellulaire synthétisé au cours des premiers jours de culture.

RÔLE DE L'OXYGÈNE

Nous supposons que, grâce à l'activité photosynthétique, il règne dans une culture d'Algues âgées de quelques jours, une plus grande tension d'oxygène qu'au début de la culture.

Nous avons vu que des cultures issues d'un inoculum constitué de cellules jeunes se comportent différemment de cultures issues d'un inoculum constitué de cellules âgées. L'inégalité de puissance photosynthétique de ces deux types de cellules explique, en partie, cette différence de comportement. Pratt [23] fixe le début de la chute du pouvoir photosynthétique d'une culture de *Chlorella vulgaris* à partir du quatrième jour de culture.

L'action des sulfamidés serait-elle plus grande sur des Algues à faible pouvoir photosynthétique, donc soumises à une faible tension d'O₂ ?

Des études faites sur *Pneumococcus* et *Streptococcus* [24-25] tendent à démontrer le contraire: les sulfamidés inhiberaient plus fortement la croissance en la présence d'O₂.

Partie expérimentale.

Nous avons comparé la croissance en milieu témoin et en milieu intoxiqué de cultures d'Algues 116, placées à l'obscurité dans une étuve à 20°, avec la croissance de séries de cultures identiques et parallèles, placées dans les conditions habituelles d'éclairement (12 heures/24 heures).

Sulfamidé: sulfanilamide 2⁰/₀₀.

Le milieu contient le 2⁰/₀ de glucose habituel.

Résultats.

Cultures en milieu témoin :

- a) Les cultures à l'obscurité se développent plus lentement que les cultures éclairées.
- b) Les cultures à l'obscurité produisent peu de chlorophylle et restent vert-jaune.

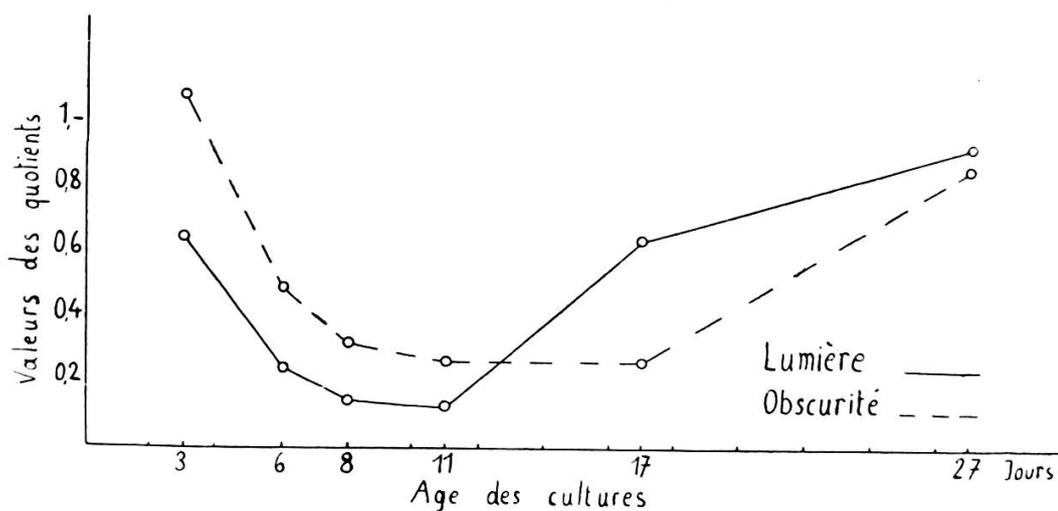


Fig. 13.

Algue 116. — Courbes des quotients:
 $\frac{\text{intoxiqué}}{\text{témoin}}$

Cultures en milieu intoxiqué :

Ces cultures accusent à l'obscurité, par rapport aux cultures éclairées, un retard analogue à celui des cultures témoin.

Nous avons établi le quotient: croissance de l'intoxiqué sur croissance du témoin, pour les deux conditions: lumière et obscurité (cf. fig. 13). L'allure des courbes figurant ces quotients montre que l'action de la sulfanilamide n'est pas plus grande à l'obscurité qu'à la lumière.

Ce fait atteste que:

- a) le mécanisme d'intoxication par la sulfanilamide n'est pas directement lié aux actes photosynthétiques,

- b) la tension d'O₂ n'a pas eu, dans ces essais, d'effet spécifique sur ce mécanisme d'intoxication,
- c) la lumière a pour effet principal d'accélérer le développement des cultures aussi bien en milieu intoxiqué qu'en milieu témoin.

TECHNIQUE FAISANT APPEL A DES QUANTITÉS DIFFÉRENTES D'INNOCULUM.

Dans les essais faits avec la technique des intoxications différées (par ex.: au 2^e et au 6^e jour), plus l'adjonction est tardive, plus la compensation est rapide. Or, une culture de six jours est plus riche en cellules qu'une culture de deux jours. Le nombre des cellules joue-t-il un rôle dans la résistance aux sulfamidés ?

Des études sur la croissance de *Chlorella vulgaris* ont montré que des variations quantitatives de l'inoculum étaient sans influence sur la densité finale des populations. Cependant les rythmes de croissance ne sont pas les mêmes pour un faible et un fort inoculum. Plus l'inoculum faiblit, plus le « lag » s'allonge et plus la période de croissance qui le suit est rapide [13].

Quelle va être l'influence de la grandeur de l'inoculum sur le développement de cultures en milieu intoxiqué ?

Partie expérimentale.

Des séries de milieux sont inoculées avec les quantités suivantes d'une suspension de l'Algue 116:

2 gouttes, 0,5 cm³, 1 cm³, 1,5 cm³, 2 cm³.

Chaque série comporte: 10 erlenmeyers de milieu B (témoin).
et 10 » » » B plus sul-
fanilamide 2⁰/₀₀.

Résultats (cf. fig. 14).

Milieu témoin: Nous avons obtenu des résultats conformes à ceux de Pratt soit:

- a) l'augmentation de l'inoculum réduit le lag, et de ce fait rapproche de l'ordonnée le segment de courbe correspondant à la période logarithmique de croissance;
- b) une même densité de population est obtenue dans toutes les cultures après un certain nombre de jours, environ

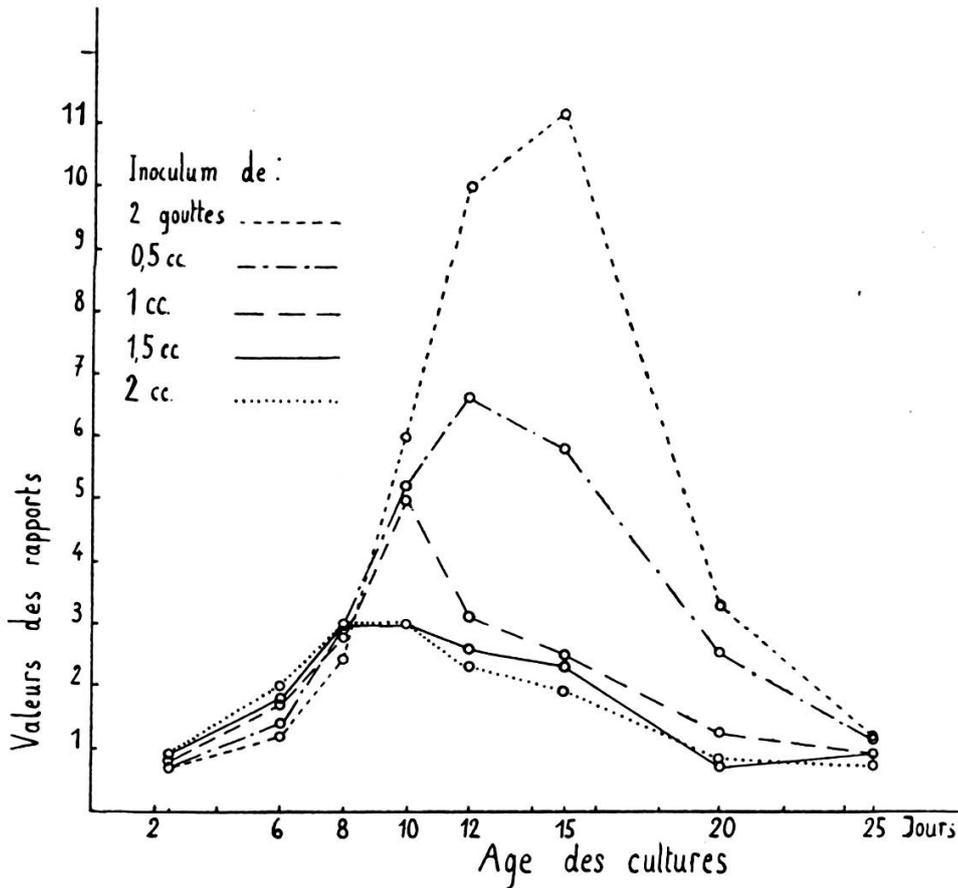


Fig. 14.

Algue 116. — Rôle quantitatif de l'inoculum.

Courbes des rapports :

$$\frac{\text{néphélométrie du témoin}}{\text{néphélométrie de l'intoxiqué}} = \text{efficacité de S } 2 \text{ ‰.}$$

douze jours (environ treize jours c/o Pratt), quelle que soit l'importance de l'inoculum.

Milieu intoxiqué :

- a) L'augmentation de l'inoculum réduit le lag.
- b) Plus l'inoculum est grand plus la compensation est rapide.

- c) Les variations quantitatives de l'inoculum produisent des effets plus marqués que dans les cultures témoin (écarts plus grands).
- d) Par extension, un inoculum suffisant pourrait contrebalancer la toxicité du milieu.

Ces expériences où interviennent des quantités différentes d'inoculum comportent la critique suivante: quel est le rôle des substances présentes dans le liquide intercellulaire de l'inoculum ? Pour répondre à cette question, nous avons renouvelé toute l'expérience en utilisant une suspension de cellules qui avait subi stérilement trois lavages successifs.

Les résultats sont en tous points semblables à ceux obtenus dans l'expérience qui précède.

La compensation plus rapide d'une culture faite à partir d'un fort inoculum ne dépend donc pas de substances actives apportées par le liquide intercellulaire.

Ces constatations nous permettent de supposer que, lors d'une adjonction tardive de sulfamidé, la compensation très rapide est due en partie au grand nombre de cellules présentes. Nous disons en partie, car les essais faits avec des inocula d'âges différents montrent que la qualité des cellules intervient dans la résistance.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

ASPECT SPÉCIFIQUE DE L'ACTION DES SULFAMIDÉS.

Au cours de nos recherches, deux types de réaction aux sulfamidés se sont manifestés, suivant l'Algue et la molécule de sulfamidé envisagées: type « compensation » et type « sensibilité ». Ils sont résumés dans le tableau ci-dessous qui ne concerne que l'action des sulfamidés ajoutés avant l'inoculation.

Algues	Sulfa- midé	Concentrations en sulfamidé				Résultats
		0,5 ‰	1 ‰	2 ‰	4 ‰	
62	S	+				Compense
68	»	+				»
116	»	+				»
116	S		+			Compense
131*	»		+			»
614*	»		+			» sans pig- mentation
116	S			+		Compense
516	»			+		»
50*	»			+		» faiblement
89*	»			+		»
116	S				+	Compense plus ou moins
3	S	+				Sensible
3	»		+			»
19*	»		+			»
598*	»		+			»
3	»			+		»
3	»				+	»
116	Ci	+				Compense
116	»		+			» plus ou moins
116	»			+		Sensible
50*	»			+		Compense faiblement
89*	»			+		»
3	»	+				Sensible
3	»		+			»
3	»			+		»
116	Sp	+				Compense
116	»		+			Sensible
116	»			+		Sensible
50*	»			+		»
89*	»			+		»
3	»			+		»
116	»				+	»

N. B. — Les numéros marqués d'un * ont été très peu étudiés; ils sont mentionnés à titre d'indication.

Ce tableau montre la spécificité d'action de ces trois sulfamidés en ce sens que :

- a) un même sulfamidé n'a pas une action semblable sur toutes les Algues traitées;
- b) une même Algue réagit différemment en présence de sulfamidés différents;
- c) une même Algue réagit différemment en présence de concentrations variées d'un même sulfamidé. Cet effet n'est pas très marqué.

LES DEUX TYPES DE RÉACTION AUX SULFAMIDÉS.

Type « sensibilité ».

Il est caractérisé par une stasie indéfinie.

Type « compensation » (restauration spontanée du pouvoir de division).

Au terme de ces quelques recherches, nous savons que le phénomène de compensation :

- 1° est précédé d'une période de sensibilité caractérisée par un lag prolongé;
- 2° n'est pas le résultat de la multiplication de cellules devenues génétiquement résistantes;
- 3° n'est pas dû à un apport nutritif par l'azote des sulfamidés;
- 4° ne semble pas être conditionné par la formation de substances antisulfamides exocellulaires;
- 5° se manifeste plus rapidement si l'inoculum augmente;
- 6° se manifeste plus rapidement avec de jeunes qu'avec de vieilles cellules.

Cette subdivision (compensation — sensibilité) et les observations qui sont rapportées ci-dessus concernent des cultures intoxiquées **avant** l'inoculation ou **très tôt** après celle-ci (cf. p. 29). A des adjonctions de sulfamidé de plus en plus tardives correspond une diminution progressive des manifestations de sensibilité collective de la culture.

CRITIQUE DU TERME « RÉSISTANCE ».

L'assertion, dans des travaux antérieurs, de la résistance d'Oocystis à la sulfanilamide a servi de point de départ à nos recherches.

Or, ce terme de résistance prête à équivoque.

Si on entend par lui que la cellule ne subit pas l'influence du toxique, que la culture croît au même rythme que son témoin, il est faux de l'employer dans le cas qui nous occupe. Car, l'Oocystis subit l'influence du toxique, sa sensibilité se manifeste par une stasie temporaire. Puis la croissance s'organise et la culture se développe, phénomène que nous avons appelé : compensation. Nous savons, d'autre part, que les cellules d'une culture ayant compensé ne sont pas génétiquement résistantes.

L'état final d'une culture intoxiquée ayant compensé a l'apparence de celui d'une culture résistante. Cette apparence masque la sensibilité de chaque individu et tout le travail accompli pour contrebalancer l'action du toxique.

A notre connaissance, ce problème n'a pas été soulevé en ce qui concerne les bactéries. Les auteurs se sont attachés à l'aspect final en assimilant croissance à résistance et croissance nulle à sensibilité. La question de l'équivoque du terme résistance se pose tout aussi bien pour ces organismes.

Nous estimons que l'action d'un agent toxique est à considérer à tous les stades de développement d'une culture, et qu'il serait bon en parlant d'un microorganisme résistant de préciser ce qu'on entend par là : indifférence au toxique, résistance finale, résistance acquise, etc., en fonction bien entendu des concentrations employées.

ANALYSE DE LA NOTION DE « COMPENSATION » ET
DE SES RAPPORTS AVEC LES SUBSTANCES RESPONSABLES
DU POUVOIR ANTISULFAMIDE.

Type sensible : cyto-stasie et cyto-cidie.

L'ensemble de nos recherches ayant porté essentiellement sur le type compensant, nous bornerons à quelques remarques la discussion au sujet du type sensible :

Il y aurait d'intéressantes recherches à faire sur les limites de la viabilité des Algues sensibles en état de stasie, et sur la dépendance de ces limites à l'égard de la concentration du toxique.

L'expérience suivante indique la capacité de ces organismes de survivre à une stasie prolongée:

Algue 3, en présence de Sp 2⁰/₀₀, pas de croissance.

Après quarante-sept jours de ce régime, les cultures sont décantées et le liquide intoxiqué remplacé par du milieu B frais.

Sous ce nouveau régime, ce n'est qu'au bout de cinquante jours que deux sur cinq cultures manifestèrent une croissance normale. Les cultures qui ne sont pas reparties le doivent, probablement, aux pertes de cellules survenues lors de la décantation, cette Algue adhérant fort peu aux parois.

Type « compensant ».

Il est essentiel de rappeler ici que ce type d'Algue est sensible à l'action des sulfamidés. La prolongation du lag est la manifestation de cette sensibilité. Il s'agit d'une sensibilité temporaire puisque ce lag prolongé est suivi d'une période de division cellulaire (compensation).

Le moment où s'amorce la compensation est comme un tournant dans l'évolution de la culture intoxiquée. Ce tournant, particulièrement difficile à expliquer, nous semble d'une grande importance. C'est en fait, une opposition à l'action toxique du sulfamidé.

Quelle est la nature de cette toxicité ?

Une quantité innombrable d'expériences et de théories ont vu le jour à ce sujet. Elles sont exposées et résumées dans un travail de Tschesche (1950) [26] et dans une communication de Woods (1948) [27]. L'hypothèse admise actuellement est l'interférence des sulfamidés dans la synthèse de corps tels que les acides aminés, les purines, la thymine et ses dérivés. Le point attaqué par les sulfamidés serait un système mettant en cause le PAB. Le mécanisme précis n'en est pas encore connu. Dans certains cas (thymine, purine), l'effet aurait lieu par l'intermédiaire de l'acide folique. On ne sait le rôle exact de PAB dans ces synthèses. Schopfer [28] arrive à la conclusion

qu'un système auquel le PAB prend part est inactivé. Il s'ensuit une perturbation dans la synthèse de purines, constituants des acides nucléiques. La stasie serait due à cette perturbation.

De nombreux faits démontrent que ce n'est là, d'ailleurs, qu'un des mécanismes d'action du sulfamidé (Schopfer).

Ces hypothèses sont nées à la suite d'expériences faites avec des bactéries. En ce qui concerne les Algues unicellulaires, Chodat et coll. [4] trouvent que la sulfanilamide freine la sporulation et non la croissance des cellules; Lwöff et coll. [29] arrivent aux mêmes hypothèses conclusives avec un *Streptococcus*.

Nos observations nous montrent que d'une façon générale les Algues unicellulaires sont sensibles à l'égard de divers sulfamidés. De plus, nos investigations confirment les résultats antérieurs [5] relatifs à la protection possible par le PAB des Algues intoxiquées par les sulfamidés.

Ces faits nous permettent d'affirmer que les sulfamidés agissent chez les Algues sur les mêmes mécanismes biochimiques que chez les bactéries. Ceci nous donne le droit de chercher à comprendre le phénomène de compensation à la lumière des théories émises au sujet des réactions des bactéries en présence de sulfamidés.

Nous savons qu'un inoculum massif abrège la durée du lag dans les cultures témoin et dans les cultures intoxiquées. Ce fait corrobore d'ailleurs, les résultats des expériences de Pratt (*Chlorella vulgaris* en milieu témoin) [13] et de Melchior et Klotz (*E. coli* en présence de sulfanilamide) [30] sur le rôle de l'inoculum. Nos expériences nous montrent qu'à une adjonction tardive de sulfamidé correspond une moindre prolongation du lag. L'âge de la culture dont provient l'inoculum influence aussi la durée du lag. Ce fait est conforme à celui noté par Youmans [31]: les bactéries prélevées au début du lag et pendant la phase stationnaire de la culture sont moins résistantes aux sulfamidés que celles prélevées à la fin du lag et durant la phase logarithmique.

Ces données suggèrent une **notion de seuil**. Mais seuil de quoi?

D'autre part, nos recherches apportent une documentation intéressante concernant les périodes de la culture pendant les-

quelles se manifestent des réactions d'antagonisme aux sulfamidés. Nous avons mis en évidence (expériences d'intoxications différées) que la culture est sensible pendant le lag, insensible (ou moins sensible) pendant la période logarithmique de croissance et que pendant la phase stationnaire qui suit, les cellules sont à nouveau sensibles. Il est bon de rappeler que ceci est également vrai pour une Algue dite du type sensible (cf. p. 30-31).

C'est donc pendant la période de division intense que se manifeste la résistance au toxique. Deuxièmement, l'effet du toxique est maximum au moment où la cellule ne se divise pas. Ces faits semblent paradoxaux puisque le sulfamidé est considéré comme un inhibiteur de la formation de substances nécessaires à la division.

Une explication de la compensation reposera donc sur la compréhension à la fois de ce **paradoxe** et de la **nature du seuil** susmentionné.

Les résultats des expériences de décantation et d'adjonction de filtrat (cf. p. 24 à 28) ne nous permettent plus de supposer qu'une substance à pouvoir antisulfamide est peu à peu sécrétée par les cellules dans le milieu. Ne pouvant rendre une sécrétion exocellulaire responsable de la compensation, nous devons localiser le pouvoir antisulfamide à l'intérieur des cellules.

Nos expériences faites avec des Algues d'âges différents (donc de qualité différente) ainsi que les expériences d'intoxications différées nous font supposer que la résistance aux sulfamidés dépend d'une certaine qualité de la cellule; ces expériences, nous l'avons vu, nous montrent que les cellules sont douées de cette qualité à certains moments de leur existence. Le mécanisme d'intoxication des sulfamidés tel qu'il est envisagé actuellement (cf. plus haut) implique une perturbation des biosynthèses endocellulaires. Cette interprétation classique ne s'oppose pas à une localisation intracellulaire du pouvoir anti-sulfamide. L'absence de sécrétion cellulaire antisulfamide et l'importance de l'état cellulaire étant acquises, deux éléments deviennent difficiles à comprendre: le rôle joué par l'importance de l'inoculum et la notion de seuil.

A propos de recherches sur *E. coli* en présence de sulfanilamide, recherches très semblables aux nôtres en plusieurs points, Melchior et Klotz [30] émettent une théorie d'ordre cinétique. Ils font intervenir la notion de vitesse d'action du sulfamidé sur les cellules. Pour bien comprendre la contribution de ces auteurs, il faut distinguer dans l'action du toxique deux composantes :

1) *Vitesse d'action*; Melchior et Klotz trouvent que l'hypothèse la plus séduisante serait d'assimiler cette vitesse d'action à une vitesse de passage du sulfamidé à travers la membrane cellulaire. Selon eux, cette pénétration serait lente. A notre avis, la vitesse de ce passage dépendrait des variations de la perméabilité cellulaire, du pH et de la composition du milieu de culture; 2) *efficacité toxique*.

L'importance relative de ces deux composantes varie selon les conditions d'expérience. Par exemple: quand le lag est raccourci (grand inoculum — jeunes cellules) le sulfamidé n'a plus le temps d'agir et de bloquer la croissance avant que la culture parvienne à sa phase stationnaire. Dans ce cas la composante « efficacité toxique » n'a pas varié. L'effet anti-sulfamide observé résulte ici d'événements d'ordre cinétique.

En envisageant le problème sous cet angle, nous avons cru au premier abord, pouvoir concilier le rôle joué dans la compensation par le nombre des cellules avec celui d'une localisation endocellulaire du pouvoir antisulfamide. Le seuil exprimerait, en fait, un équilibre entre la vitesse d'action et la toxicité moléculaire *sensu stricto*. Cependant, l'adoption de cette hypothèse cinétique en vue d'interpréter la compensation appelle des critiques importantes :

- a) Cette hypothèse n'explique pas la prolongation temporaire du lag; ni par quel mécanisme les cellules amorcent la compensation;
- b) elle n'explique pas non plus la durée relativement courte du lag, en présence de sulfanilamide, quand l'inoculum est important ou les cellules jeunes.

Les hypothèses d'Hinschelwood [32] nous ramènent à une conception plus biochimique du problème qui nous intéresse.

Cet auteur a analysé le comportement de *B. lactis aerogenes* en présence de sulfanilamide. Ses vues sont les suivantes :

1. Le lag est une période de restauration de l'activité enzymatique, d'éventuelles désintoxications et surtout de synthèses de substances **diffusibles** dans le milieu. Lorsque ces substances que l'auteur nomme « intermédiaires » de croissance auront atteint dans le milieu un taux suffisant, les cellules commenceront à se diviser. Cette donnée est basée sur des expériences d'adjonction de filtrat ou de centrifugat ainsi que sur des expériences d'autres auteurs sur le même sujet [33]. Elle rend clairement compte de l'influence de la quantité et de la qualité de l'inoculum sur la durée du lag en milieu témoin.

2. Les bactéries disposent probablement de plusieurs voies enzymatiques pour mener à chef les synthèses de ces substances « intermédiaires » précédant la division. Dès lors, si un système enzymatique est bloqué par un toxique, la cellule met en action un second système qui normalement n'est pas employé.

C'est, selon Hinschelwood, ce qui se passe dans ce qu'il nomme l'« adaptation » de *B. lactis aerogenes* à la sulfanilamide. Ce mode vicariant de synthèse est considérablement moins inhibé par le sulfamidé que le mode normal. Dans les conditions normales, l'intervention de ce second mode est éliminée par celle du processus habituel doté d'une efficacité supérieure. Ce second mode, d'efficacité moindre, requiert un temps plus long pour synthétiser le taux voulu de substances intermédiaires. Ceci explique la prolongation du lag en milieu intoxiqué. Grâce à l'emploi du mode vicariant de synthèse, la cellule « s'adapterait » à la sulfanilamide. Les progrès dans cette « adaptation » expliqueraient le raccourcissement progressif du lag constaté au cours du training auquel Hinschelwood soumet cette bactérie.

3. De plus, l'auteur suppose que le seuil nécessaire de concentration de substances « intermédiaires » serait plus élevé en présence d'un toxique. Comment expliquer autrement la prolongation du lag due à l'addition d'un toxique, dans un système

où le taux suffisant de substances intermédiaires est sensé être atteint (cas de jeunes cellules prêtes à se diviser).

La théorie susmentionnée rend parfaitement compte du phénomène de compensation observé chez les Algues. Le taux voulu de substances « intermédiaires » synthétisé plus lentement par le mode vicariant explique la prolongation du lag. Une fois ce **seuil** de substances atteint, les cellules se divisent, la compensation est amorcée.

En outre, le rôle joué par l'âge des cellules dans la compensation devient également compréhensible. Suivant l'âge des cellules, les phénomènes de désintoxication sont plus ou moins accomplis, les restaurations enzymatiques plus ou moins avancées et les substances « intermédiaires » de croissance plus ou moins près du taux voulu.

A ces constatations principales, nous ajouterons quelques commentaires :

1. La bonne conservation du plastide chez les cellules d'une culture intoxiquée et âgée, que nous avons constatée sans l'étudier dans ce travail (cf. p. 136), pourrait être un signe d'une déviation de systèmes enzymatiques chez les Algues intoxiquées.

2. Les résultats de nos expériences d'intoxications différées confirmeraient que selon les vues ci-dessus, le sulfamidé agirait sur les synthèses des substances « intermédiaires » de croissance. Songeons entre autres au cas de l'Algue 3 (cf. p. 150 et suiv.) : si le sulfamidé est ajouté avant que ces substances soient présentes en quantité suffisante dans le milieu, la multiplication n'a pas lieu ; par contre, l'adjonction de sulfamidé reste sans effet, quand, plus tard, le taux nécessaire de ces substances est atteint.

Cela nous conduit à penser que :

- a) le type sensible diffère probablement du type compensant par des ressources enzymatiques moins développées ;
- b) qu'à partir du moment où la cellule est prête à se diviser et pendant le temps où elle se divise, existe un état d'insensibilité aux sulfamidés.

Nous retrouvons ici le paradoxe cité au début de ce chapitre entre cette période d'insensibilité et la conception actuelle de l'intervention des sulfamidés.

Ce paradoxe est résolu, nous semble-t-il, en adoptant l'hypothèse selon laquelle les sulfamidés agissent sur un système de synthèses de substances de croissance, **précédant** la division cellulaire. Cette hypothèse s'accorde avec l'interprétation actuelle de l'intervention des sulfamidés dans la synthèse des constituants des acides nucléiques.

3. Au cours de notre travail, nous avons recherché des substances antisulfamides (adjonction de filtrat, décantation). Puis nous avons progressivement été amenés à penser qu'il n'y a pas chez les Algues de substances antisulfamides spécifiques, mais que toute substance antisulfamide doit être l'équivalent d'un des éléments de la chaîne des substances nécessaires et produites par la cellule. Ainsi, des substances « intermédiaires » de croissance dont la biosynthèse est entravée par les sulfamidés, peuvent être dites antisulfamides endocellulaires si, grâce à l'utilisation d'un autre processus enzymatique, la cellule parvient malgré tout à les synthétiser. Ceci n'est d'ailleurs pas une notion nouvelle, mais nous la formulons ici pour écarter le dualisme que ces termes de substances « intermédiaires » de croissance et substances antisulfamides pourraient créer dans l'esprit.

Ceci étant dit, force nous est de reconnaître que l'hypothèse d'Hinschelwood crée pour nous une difficulté justement en ce qui concerne ces substances « intermédiaires » de croissance. Car ni les expériences de décantation, d'adjonction de filtrat ou de lavage d'inoculum ne nous les ont révélées dans le milieu. Comment cependant expliquer sans elles, soit la notion de seuil, soit le rôle joué en milieu témoin et dans la compensation par l'importance de l'inoculum ?

Il est intéressant de noter ici que Pratt a reconnu cette influence de la grandeur de l'inoculum sur le lag des cultures d'Algues, sans en chercher la cause [13]. D'autre part, dans le cas de *B. lactis aerogenes*, Hinschelwood constate que dans certains milieux la grandeur de l'inoculum n'a aucune influence

sur le lag [34]. Il l'attribue au fait que dans ces milieux la croissance dépendrait moins des substances « intermédiaires » de croissance.

Nous voyons qu'il reste à ce sujet un grand point d'interrogation. Nous devons également nous demander si notre échec ne proviendrait pas des procédés expérimentaux employés ?

Donc, si nous nous appuyons sur l'hypothèse d'Hinschelwood pour interpréter la compensation observée chez les Algues, nous soulignons cependant que nous n'avons pu vérifier de manière concrète la présence, dans le milieu, de substances « intermédiaires » de croissance.

4. Nous n'avons pas soumis nos Algues à un training prolongé (très nombreuses subcultures en milieu intoxiqué) et n'avons donc pas constaté la validité de la notion de progrès dans l'adaptation au nouveau mode enzymatique de synthèse. Il serait faux de tenir à priori cette notion pour certaine, avec des organismes qui disposent probablement de par leur carboautotrophie, d'une plus grande richesse enzymatique que les bactéries.

En tenant compte des difficultés et problèmes restant à résoudre, nous pensons que c'est en le faisant reposer sur un changement d'utilisation des processus enzymatiques de la cellule d'Algue, que nous pouvons le mieux interpréter le phénomène complexe que nous avons nommé « compensation ».

Ajoutons pour terminer ce travail, que les Algues unicellulaires offrent dans leur développement comme un film au ralenti de ce qui se passe dans les populations bactériennes. Les analogies entre bactéries et Algues que nous avons relevées au cours de ce travail, montrent que ces dernières pourront devenir, une fois la mise au point des techniques de cultures et de mesures faite, un très bon matériel pour l'étude des réactions d'intoxications cellulaires.

RÉSUMÉ

L'action de trois sulfamidés (sulfanilamide, cibazol, soluseptazine) sur quelques Algues unicellulaires est étudiée. Elle se

révèle spécifique, c'est-à-dire variant suivant l'Algue, le sulfamidé, la concentration.

Les méthodes employées pour évaluer la croissance des cultures sont décrites et discutées.

Certaines Algues manifestent, dans les premiers jours de culture, une sensibilité aux sulfamidés qu'elles surmontent ensuite. Le facteur responsable de cette restauration spontanée du taux normal de croissance (appelée compensation) est tout d'abord recherché dans le milieu de culture. Il s'y avère absent; on le suppose, alors, être un facteur endocellulaire. Des expériences cherchant à déterminer l'âge de la culture auquel se forment, dans les cellules, les substances antisulfamidés, révèlent que la culture présente des périodes de sensibilité et d'insensibilité aux sulfamidés, et tout particulièrement: insensibilité (ou moindre sensibilité) pendant la phase logarithmique de multiplication. La discussion qui suit tend à expliquer ces phénomènes par la mise en action de processus enzymatiques de synthèses dont la cellule ne se sert pas en milieu normal.

BIBLIOGRAPHIE

1. G. DOMAGK: *Dtsch. med. Wschr.*, 61, 250, 1935.
2. J. TRÉFOUEL, M^{me} TRÉFOUEL, F. NITTI, D. BOVET: *C. R. Soc. Biol. Paris*, 120, 756, 1935 et 122, 1221, 1936.
3. D. D. WOODS: *Brit. J. exp. Path.*, 21, 74, 1940.
4. F. CHODAT, R. OLIVET: *C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève*, 57, 143, 1940.
5. F. CHODAT, S. SOLOWEITCHIK: *C. R. Soc. Phys. et Hist. nat. Genève*, 59, 167, 1942.
6. F. CHODAT, S. SOLOWEITCHIK: *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 6, 345, 1943.
7. R. CHODAT: *Matériaux pour la flore cryptogamique suisse*, 1, fasc. 3, 1902 et 4, fasc. 2, 1913.
8. J. M. W. MILATZ, P. B. ROTTIER: *Zbl. f. Bakt.*, 94, 227, 1936.
9. M. WELSCH: *C. R. Soc. belge de Biol.*, 130, 797, 1939.
10. S. ÖSTERLIND: *Symb. Bot. Ups.*, X: 3, 10, 1949.
11. H. CANO: *Arch. Sci. phys. et nat.*, 21, 320, 1939.
12. W. RODHE: *Symb. Bot. Ups.*, X: 1, 11, 1948.
13. R. PRATT: *Amer. J. of Bot.*, 27, 52, 1940.
14. W. H. PEARSALL, R. P. BENGRY: *Ann. of Bot. New Series IV*, 365, 1940.
15. W. H. PEARSALL, LOOSE: *Proc. Royal Soc. of London, series B, Biol. Sci.*, 121, 451, 1937.

16. M. WINOKUR: *Amer. J. of Bot.*, 36, 287, 1949.
 17. N. WATTIEZ, F. STERNON: *Eléments de chimie végétale*, Masson & C^{ie}, édit., 1935, p. 437.
 18. R. D. HOTCHKISS: *Ann. rev. of Microbiol.*, 2, 186, 1948.
 19. J. O. LAMPEN, M. J. JONES: *J. biol. Chem.*, 166, 435, 1946.
 20. J. O. LAMPEN, M. J. JONES: *J. biol. Chem.*, 170, 133, 1947.
 21. R. PRATT, J. FONG: *Amer. J. of Bot.*, 27, 431, 1940.
 22. R. PRATT: *Amer. J. of Bot.*, 29, 142, 1942.
 23. R. PRATT: *Amer. J. of Bot.*, 30, 404, 1943.
 24. A. GRÜMBACH: *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 11, 494, 1948.
 25. J. W. Mc LEOD, A. MAYR-HARTING, N. WALKER: *J. of Path. and Bact.*, 56, 377, 1944.
 26. R. TSCHESCHE: *Angew. Chem. Dtsch.*, 62, 153, 1950.
 27. D. D. WOODS: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 30, 730, 1948.
 28. W. H. SCHOPFER: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 30, 748, 1948.
 29. A. LWOFF, F. NITTI, M^{me} TRÉFOUEL, HAMMON: *Ann. Inst. Pasteur*, 67, 9, 1941.
 30. J. B. MELCHIOR, J. M. KLOTZ: *Arch. Biochem.*, 21, 40, 1949.
 31. A. S. YOUNG: *J. Bact.*, 55, 503, 1948.
 32. C. N. HINSHELWOOD: *The chemical kinetics of the bacterial cell.*, Oxford, 1946, p. 34 et suiv. et p. 121 et suiv.
 33. C. N. HINSHELWOOD: *The chemical kinetics of the bacterial cell.*, Oxford, 1946, p. 47.
 34. C. N. HINSHELWOOD: *The chemical kinetics of the bacterial cell.*, Oxford, 1946, p. 49 et 50.
-

