Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 17 (1961)

Artikel: Effets antibactériens et pouvoir proinfectieux d'une fraction polypeptidique extraite du thymus de veau

Autor: Delaunay, Albert / Henon, Michelle / Pelletier, Monique

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307507

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 04.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

C. D.: 576.809.7

Service de Pathologie expérimentale, Institut Pasteur, Garches (Seine-et-Oise, France)

Effets antibactériens et pouvoir proinfectieux d'une fraction polypeptidique extraite du thymus de veau

Par Albert Delaunay

avec la collaboration de Michelle Henon et Monique Pelletier

Je voudrais présenter ici les résultats d'une série de recherches qui, effectuées dans mon service au cours de ces dernières années, nous ont conduits assez curieusement à mettre en évidence d'abord, in vitro, différents effets antibactériens d'une fraction polypeptidique puis, in vivo, une action proinfectieuse indiscutable du même produit. Les recherches in vitro ont déjà fait l'objet de plusieurs communications [1]. Je serai donc assez bref à leur sujet. Je m'étendrai, en revanche davantage, sur les expériences faites in vivo, attendu que celles-ci sont encore inédites.

I

Que des polypeptides basiques soient capables, in vitro, d'exercer plusieurs actions antibactériennes, nous ne sommes nullement les premiers à le prétendre. De 1944 à aujourd'hui, diverses observations intéressantes ont été publiées à ce sujet, qui montraient, par exemple, que, sous l'effet d'un polypeptide, des germes pigmentés peuvent perdre leurs pigments, que des microbes saprophytes peuvent entrer en lyse, que des germes pathogènes enfin peuvent perdre, en tout ou en partie, leur virulence. Qui serait désireux d'avoir des précisions sur tous ces points, pourra utilement se reporter à une revue générale récente, publiée par *Skarnes* et *Watson* [2]. Mais, le plus souvent, seul un point particulier était pris en considération. Au contraire, dans notre cas, les recherches effectuées ont été vraiment systématiques. Par là, tout en confirmant ou en complétant des notions déjà anciennes, elles ont été en mesure de mettre en relief nombre de faits nouveaux.

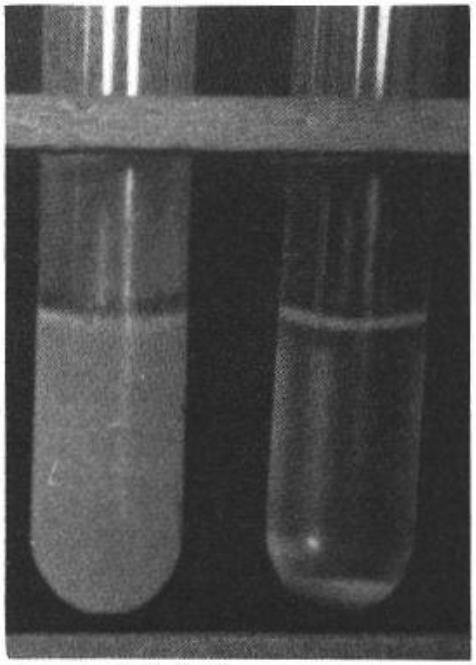
Les différents produits que nous avons utilisés avaient tous été extraits du thymus de veau, l'un, d'après une méthode mise au point par *Dubos* et

Hirsch [3], les autres par des méthodes inventées par nous-mêmes. Le plus actif nous a paru être celui que nous avons étiqueté P II. Aussi, dans ce court exposé, je ne parlerai que de lui. En bref, il était obtenu de la façon suivante (méthode personnelle). Thymus de veau broyé au mixeur, en présence d'acide citrique. Centrifugation. Culot repris par l'acide citrique, puis le ClH. Centrifugation. Addition au surnageant (pH 7) d'alcool à 96°. Formation d'un précipité abondant, qui était lavé par l'alcool et l'éther, enfin desséché. Le produit finalement obtenu se présentait sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans l'eau salée ($8^0/_{00}$) de pH 6,2. Rendement de la méthode: 7 g/kg de thymus. Diverses réactions chimiques appliquées sur une solution de P II ont donné les résultats suivants: Biuret +++; Hopkins 0; Millon +; Sakaguchi +++; Bial, Fehling, Molisch, Ehrlich (hexosamines) 0. Une solution aqueuse de P II, mise en présence de NH_4OH (au $^1/_5$), donne un abondant précipité, qui ne se redissout pas dans un excès d'ammoniaque. C'est en tenant compte de ces résultats, que nous avons admis que notre P II était une *substance polypeptidique sans copule glucidique*. Si nous avons cru pouvoir préciser: polypeptide basique, c'est aussi en raison, d'une part, de sa solubilité particulièrement grande en milieu acide et, de l'autre, de son affinité marquée pour les corps acides (héparine, acide chondroïtine-sulfurique, etc.), qu'au cours de nos expériences, nous avons eu souvent l'occasion de constater.

Ayant en mains cette fraction polypeptidique, disposant par ailleurs d'une grande variété de souches bactériennes, *Gram-positif* ou *Gram-négatif*, douées ou non d'un pouvoir pathogène, nous avons recherché l'action de notre fraction sur ces souches. Ainsi, avons-nous été conduits à voir que P II en solution, quand il a été ajouté à des germes en suspension dans l'eau, jouit d'un fort pouvoir agglutinant, qu'ajouté à un milieu de culture ensemencé depuis peu, il modifie presque toujours le développement bactérien (arrêt de la culture, ou germes restant agglutinés au cours de leur multiplication), qu'il inhibe par ailleurs la respiration de nombreux microorganismes, enfin, et peut-être surtout, qu'il se montre capable de renforcer la phagocytose par les polynucléaires. Sur tous ces points, il me paraît bon de donner les précisions suivantes.

A. Agglutination

Dix germes ont été examinés ici, les uns Gram +: un staphylocoque pathogène et un staphylocoque non pathogène, le *Micrococcus lysodeikticus*, une sarcine orange, un synocoque (Wagon), un *Chromobacterium violaceum*; les autres Gram —: un bacille typhique (forme smooth), un



1 2

Fig. 1. Intensité d'une agglutination bactérienne provoquée par la fraction polypeptidique P II. En 1: tube témoin (germes en suspension dans de l'eau physiologique); en 2: germes agglutinés, déposés au fond du tube.

colibacille très pathogène pour la souris (le colibacille Star), le bacille de *Danysz*, une souche de *Salmonella typhimurium*. Tous ces germes, après culture de 24 heures sur gélose, étaient lavés à plusieurs reprises par de l'eau physiologique. Le dernier culot était amené, également en eau physiologique, à une concentration convenable: 5 milliards de germes par ml. Cela fait, à des solutions plus ou moins concentrées de P II (deux volumes) était ajoutée, en tube, une suspension de germes (un volume). La préparation était ensuite maintenue pendant 2 heures à 18°. A ce moment, avait lieu – avec ou sans agitation préalable – la lecture des tubes.

Résultats (résumé)

1. Une solution de P II, qui contenait 2 mg de produit par ml, a entraîné une agglutination extrêmement nette de nos deux staphylocoques, du *Micrococcus lysodeikticus*, du *Chromobacterium violaceum*, de la *Salmonella typhimurium*, du bacille typhique, du colibacille Star, du bacille de *Danysz*. L'agglutination a été moins belle avec la sarcine orange et le synocoque Wagon.

2. L'agglutination, quand elle prenait place, se formait très rapidement. Elle était déjà nettement visible au bout de 1 heure; elle était complète en 2 heures (voir fig. 1). Les bactéries, d'abord réunies en amas, tombaient au fond des tubes. Que ceux-ci soient agités, elles se remettaient en suspension mais, les tubes rendus au repos, l'agglutination reprenait.

Tableau 1

Pouvoir agglutinant de quelques substances de nature définie

Nature des germes soumis à l'agglutination	Substances étudiées						
	Sulfate de protamine	Lysozyme	Arginine	Lysine	Histamine	Spermine	Acide tannique
Bacilles typhiques	++	++++	0	0	0	0	++++
Staphylocoques pathogènes	++++	++++	0	0	0	0	++++
Salmonella typhimurium	0	0	0	0	0	0	++++

3. L'agglutination diminuait de beauté, quand étaient mises en œuvre des solutions de polypeptide de plus en plus diluées. Ici, la dose limite d'action est apparue comprise entre 0,1 et 0,2 mg/ml du produit.

4. Des solutions de polypeptide, soumises à une tyndallisation de 1 heure à 56° pendant 3 jours consécutifs, ont conservé intact leur pouvoir agglutinant. De même, quand elles avaient été soumises à une dialyse de 48 heures contre de l'eau physiologique.

5. L'agglutination dont nous parlons n'était pas modifiée par des variations de pH comprises entre 6 et 8. En revanche, elle a pu être supprimée, quand au milieu avaient été ajoutés soit du Cl_2Ca, soit du Cl_2Mg. Doses actives de Cl_2Ca: M/300 pour le bacille typhique, M/15 pour *Salmonella typhimurium*, M/15 pour le staphylocoque pathogène. Doses identiques pour le Cl_2Mg.

6. Des expériences témoins nous ont permis de déterminer, à titre comparatif, ce qu'était, dans les mêmes conditions, l'effet exercé par différents corps comme le *sulfate de protamine*, le *lysozyme*, l'*arginine*, le *dichlorhydrate de lysine*, le *dichlorhydrate d'histamine*, le *tétrachlorhydrate de spermine*, enfin *l'acide tannique*. Tous ces produits (2 mg/ml) étaient dissous dans de l'eau salée ($8^0/_{00}$ de ClNa), à des pH compris entre 6 et 7. Trois germes ont été portés à leur contact: le bacille typhique, un staphylocoque pathogène et *Salmonella typhimurium*. Les résultats recueillis dans ces conditions se trouvent reportés dans le tableau 1.

B. Influence exercée par P II sur la croissance in vitro de quelques bactéries

Les germes utilisés en ce cas ont été les mêmes que ci-dessus. Au cours des expériences, leur ensemencement avait lieu dans trois types de milieux:

1. *Milieu A: Bouillon 50* (4 ml). Nous avons appelé *Bouillon 50* le bouillon standard, dont nous nous servons habituellement pour cultiver nos germes au laboratoire, quand il a été dilué au $^1/_{50}$ par de l'eau physiologique.

2. *Milieu B: Bouillon 50 (4 ml) + solution de P II (1 ml).* Cette solution renfermait 2 mg de polypeptide par ml d'eau physiologique. Chaque tube contenant désormais 5 ml de liquide, la concentration finale de polypeptide se trouvait donc ramenée à 0,4 mg/ml.

3. *Milieu C: Bouillon 50 (4 ml) + eau physiologique (1 ml).* Ce milieu constituait pour nous le témoin véritable du milieu B. PH des milieux A, B, C: 7 environ.

Les expériences elles-mêmes se sont déroulées ainsi: Les germes étaient d'abord entretenus par passages répétés en bouillon ordinaire. Puis, le moment venu, un nouveau passage nous conduisait à les mettre dans celui de nos milieux que nous appelons *milieu A*. 24 heures plus tard, 0,2 ml de la culture étaient portés dans des tubes contenant, soit un *milieu B* (5 ml), soit un *milieu C* (5 ml). Cela fait, les tubes étaient déposés dans une étuve à 37°, pendant 48 heures. A ce moment-là, avait lieu la lecture des résultats. Quand une culture (agglutinée ou non) avait pris place, une petite quantité de milieu (0,2 ml) était prélevée et, avec ce liquide, était ensemencée une nouvelle série de tubes stériles, contenant les uns, un *milieu B* analogue à celui qui nous avait servi, les autres, le *milieu C*.

Résultats

Ils ont été exposés en détail autre part [1]. Je me contenterai d'en donner ici un bref résumé.

a) Notre P II, dans quelques cas, a arrêté d'*emblée* le développement des germes mis en expérience. Parfois, une culture a pris place dans le premier tube ensemencé mais, en tout cas, cette culture était peu abondante et les germes étaient agglutinés. Cette culture, transportée dans de nouveaux tubes où se trouvait également le P II, pouvait donner lieu à des subcultures (analogues à la première). Elle pouvait aussi s'avérer stérile.

b) L'expérience nous a paru plus facile à réussir avec des milieux de culture, dont le pouvoir nutritif était relativement faible. C'est pourquoi, comme nous l'avons indiqué dans le protocole expérimental, nous avons utilisé de préférence un bouillon standard dilué au préalable 50 fois.

c) Cependant, même en milieu pauvre, les résultats sont apparus variables dans leur netteté d'un germe à l'autre. Les premières cultures à être arrêtées par P II ont été celles du *Micrococcus lysodeikticus*, de la *Salmonella typhimurium* et de notre staphylocoque pathogène.

d) Cette fois encore, à titre comparatif, il nous a paru bon d'effectuer quelques expériences avec des tubes, dans lesquels avaient été ajoutés au bouillon dilué, non pas le P II, mais du *sulfate de protamine* ou du *lysozyme* (concentration finale de ces corps dans le milieu: 0,4 mg/ml). Dans ces conditions, les faits suivants ont été observés: Le sulfate de protamine a suspendu *aussitôt* la culture du bacille typhique, de la *Salmonella typhimurium*, du *Micrococcus lysodeikticus*. Le lysozyme, de son côté, a, dès le commencement, arrêté la croissance du *Micrococcus lysodeikticus*. En revanche, malgré de nombreuses subcultures faites en sa présence, il n'a marqué aucun effet sur le bacille typhique et sur la *Salmonella typhimurium*.

Les résultats très frappants, obtenus ici avec le sulfate de protamine, méritent certainement d'être rapprochés de ceux enregistrés, il y a quelques années, par *Wolff* et *Brignon* [4].

C. Influence exercée par P II sur le métabolisme respiratoire de quelques bactéries

Germes étudiés: une *Salmonella typhimurium* (de notre collection personnelle), une *Salmonella typhimurium* (obligeamment fournie par le Dr *Rowley*, de Londres), le bacille typhique et le staphylocoque pathogène (Tin) de notre collection.

Ici, le *protocole opératoire* a comporté la mise en œuvre de deux techniques tout à fait différentes.

1. *Première technique*. 4 ml d'un bouillon 50 (bouillon de culture standard dilué 50 fois par de l'eau physiologique) étaient ensemencés avec 0,2 ml d'une culture d'un des quatre germes que nous venons de nommer, culture qui avait été faite en bouillon normal et qui était âgée de 24 heures. Les cultures en B 50 étaient elles-mêmes, avant toute expérience, maintenues 24 heures à 37°. A ce moment, leur étaient ajoutés, soit 1 ml d'eau physiologique, soit 1 ml d'une solution en eau physiologique contenant 2 mg (ou des doses plus fabiles) de P II par ml. Cela fait, les cultures abondantes étaient agitées et maintenues pendant 1 heure à 18°. A ce moment, 1 ml était retiré de chaque culture et porté dans une fiole de l'appareil de Warburg, où se trouvaient déjà 2 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M. Ultérieurement, enfin, était étudié, selon les règles les plus classiques, le métabolisme respiratoire des microorganismes mis en observation. Exactement, était déterminée la quantité d'oxygène, qui avait été consommée en 1 heure par 10^8 germes par ml. L'expérience était poursuivie pendant 5 heures.

2. *Seconde technique*. Dans un premier temps, était placé, dans une

Tableau 2

Nature du germe mis en expérience	Produit ajouté au milieu de culture	$Q/O_2/ml/h/10^8$ germes exprimée en μl
Salmonella typhimurium	Eau physiologique	10,3
Salmonella typhimurium	P II	0,9
Salmonella typhimurium Rowley	Eau physiologique	9,0
Salmonella typhimurium Rowley	P II	0,3
Bacille typhique	Eau physiologique	8,5
Bacille typhique	P II	0,3
Staphylocoque Tin	Eau physiologique	9,0
Staphylocoque Tin	P II	3,0

fiole du Warburg, qui contenait déjà 2 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M, 0,8 ml d'une suspension de germes provenant d'une culture normale en B 50, âgée de 24 heures. Après cela, étaient ajoutés dans les dérivations 0,2 ml d'une suspension de P II (2 mg/ml) ou 0,2 ml d'eau physiologique (témoin). La fiole une fois montée, l'ensemble était soumis dans le bain-marie, le robinet du manomètre restant ouvert, à 5 ou 10 minutes d'agitation. A ce moment, le liquide présent dans la dérivation était versé avec précaution dans la fiole. Puis, le robinet désormais fermé, commençait l'examen proprement dit. En ce cas, ce qui fut déterminé, c'est la quantité d'oxygène consommée en 1 heure par 10^7 germes par ml. Durée totale de l'examen: 5 heures. Un seul germe, cette fois, a été utilisé: la *Salmonella typhimurium*.

Résultats

1. Ceux obtenus avec la première technique se trouvent exposés dans le tableau 2.

La lecture de ce tableau met en évidence l'action inhibitrice considérable, exercée par P II sur le métabolisme respiratoire des germes. Nous pouvons préciser que cette action est *immédiate*.

Dans une série d'expériences à part, nous avons déterminé quelle était l'influence exercée sur le métabolisme respiratoire de la seule *Salmonella typhimurium* par des doses variables de P II, ajoutées à la culture 1 heure avant l'examen. Les nouveaux résultats obtenus se trouvent reportés dans le tableau 3.

2. Cependant, un exemple des résultats obtenus par la seconde technique se trouve reproduit dans le tableau 4.

On voit que, là encore, P II inhibe, de façon quasi totale, le métabolisme respiratoire du germe. Cette action, comme chaque fois, est apparue immédiate. Les mêmes essais effectués avec le bacille typhique nous ont conduits à des observations absolument comparables.

Tableau 3

Seul germe mis en expérience: Salmonella typhimurium

Dose de P II ajoutée à la suspension bactérienne (mg)	Concentration finale de P II dans le milieu (mg)	$Q/O_2/ml/h/10^8$ germes (μl)
1	0,2	0,46
0,5	0,1	0,34
0,2	0,04	0,10
0,1	0,02	0,25
0,01	0,01	1,04
0,05	0,004	7,11
0,02	0,002	9,87
0,001	0,001	9,66
0,002	0,0004	10,93
0,005	0,0002	11,44
Eau physiologique (témoin)	0	11,03

Tableau 4

Nature du germe	Nature du produit ajouté secondairement dans la fiole	$Q/O_2/ml/h/10^7$ germes (μl)
Salmonella typhimurium	Eau physiologique	8,36
Salmonella typhimurium	P II	0,90

3. Frappés par cette action si spectaculaire du P II sur le métabolisme respiratoire des germes, nous avons voulu savoir quel était, dans les mêmes conditions, l'effet de différents corps, apparentés ou non au P II.

Observations

a) Le lysozyme, l'héparine, le chondroïtine sulfate, les acides nucléiques, les sels de calcium et de magnésium (à diverses concentrations dans le milieu), l'arginine, l'histamine et la spermine (à la dose de 0,4 mg/ml) sont restés incapables, dans les conditions adoptées pour l'examen, de modifier, dans un sens ou dans un autre, le métabolisme respiratoire des bactéries.

b) La lysine, en revanche, a exercé, comparativement, une légère influence stimulatrice.

c) Le sulfate de protamine, enfin, s'est montré, lui, totalement inhibiteur.

4. Aux faits qui précèdent, ajoutons, pour terminer, les suivants qui furent enregistrés au cours de nouvelles expériences.

a) L'action normalement inhibitrice du P II sur le métabolisme respiratoire de la *Salmonella typhimurium* cesse de s'exercer, quand le milieu

contient aussi du Cl_2Ca, du Cl_2Mg, du chondroïtine sulfate et des acides nucléiques.

b) En revanche, elle arrive à se manifester encore, partiellement en présence d'héparine, totalement en présence de lysozyme.

D. Influence exercée par P II sur la phagocytose, in vitro, de différents germes

Phagocytes: Polynucléaires de cobaye retirés d'un exsudat péritonéal.

Germes étudiés: Bacilles typhiques, staphylocoques, bacilles de *Danysz*, colibacille (Coli Star), *Salmonella typhimurium*.

Protocole opératoire. Des culots leucocytaires étaient repris en tubes par 1 ml d'une solution de Ringer, ou 1 ml de sérum frais de cobaye dilué au demi, ou encore 1 ml d'un sérum de cobaye chauffé, également dilué au demi. A ces suspensions, rendues parfaitement homogènes par agitation, étaient secondairement ajoutées 4 gouttes d'une suspension, soit d'un germe normal, soit d'un germe qui, au préalable, était demeuré 2 heures au contact d'une solution de P II (2 mg/ml) et qui, après centrifugation, avait été remis en suspension dans de l'eau physiologique. Etapes ultérieures: Après agitation soigneuse des mélanges, les tubes

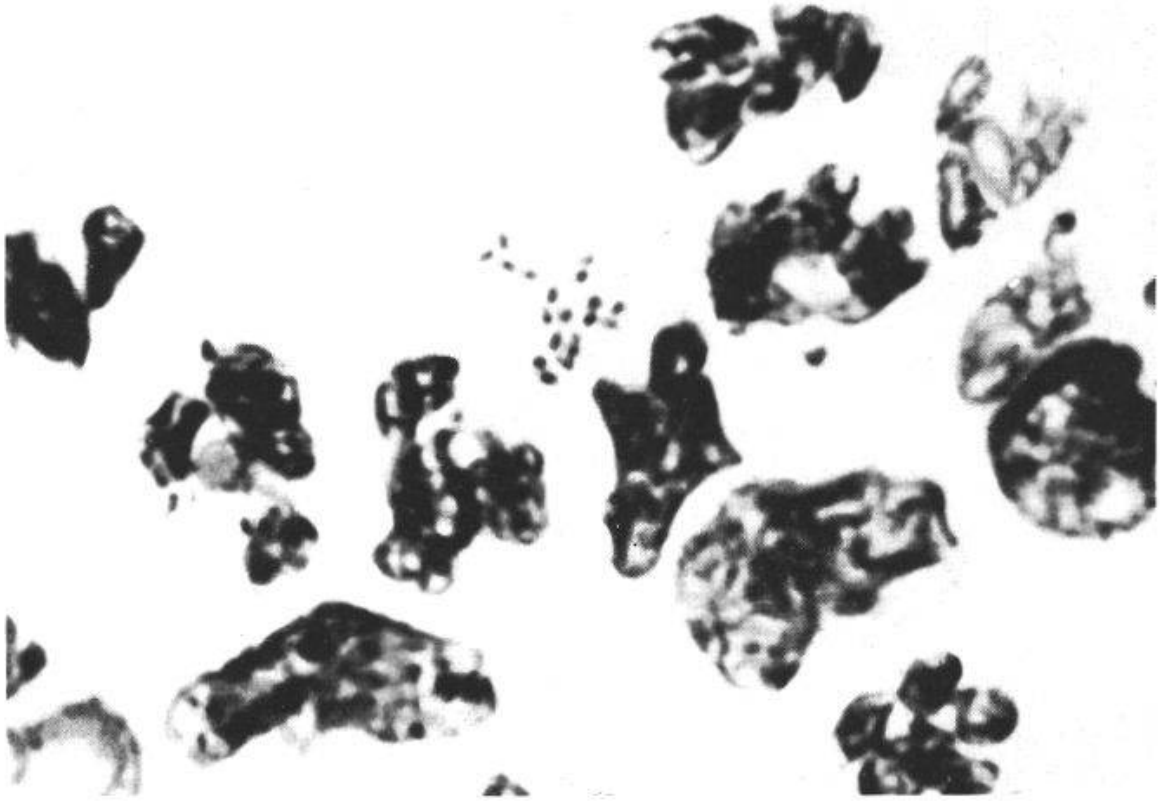


Fig. 2. Bacilles typhiques normaux en présence de polynucléaires de cobaye. Aucune phagocytose.

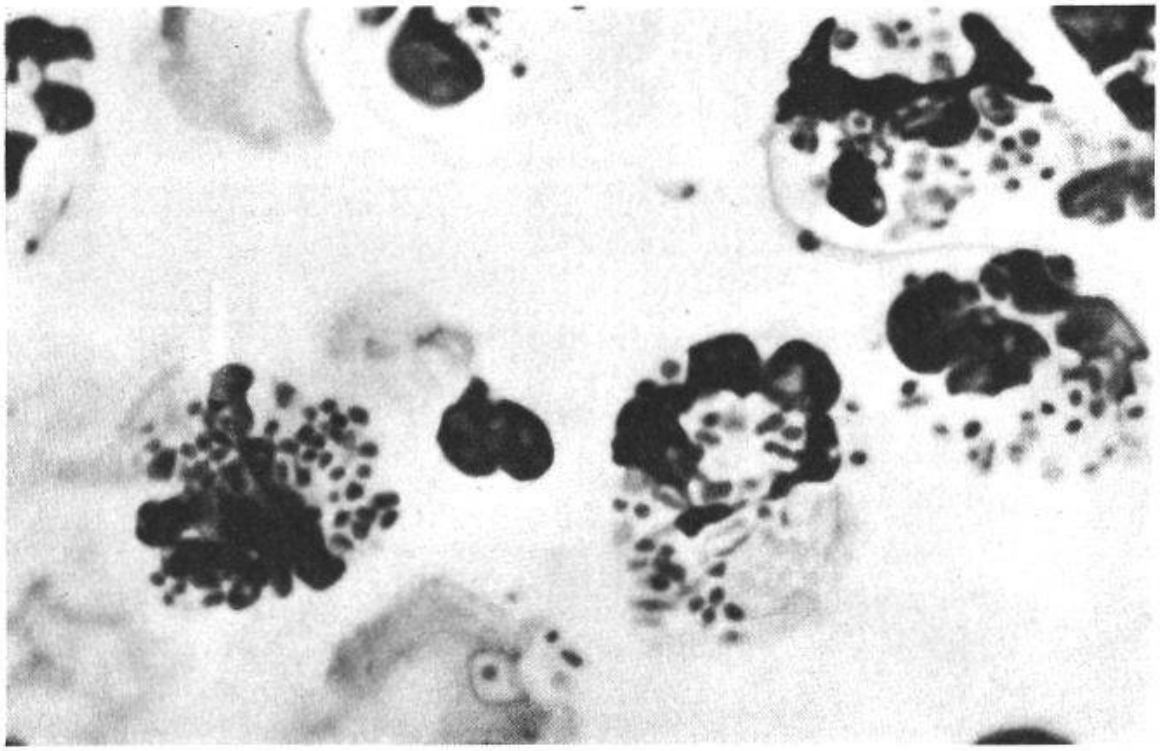


Fig. 3. Bacilles typhiques d'abord traités par la fraction polypeptidique P II, puis mis en présence de polynucléaires de cobaye. Phagocytose très remarquable.

étaient gardés à 37° pendant 1 heure. Ce délai écoulé, la crème leucocytaire, qui s'était spontanément déposée au fond des tubes, était recueillie et étalée sur lames. Les frottis étaient finalement colorés par du bleu de méthylène.

Résultats

1. *Bacilles typhiques.* Dans les préparations témoins, phagocytose pratiquement nulle. Au contraire, phagocytose extrêmement marquée des germes d'abord traités par le P II (voir fig. 2 et 3). Ici, l'action opsonisante exercée a été de toute beauté, et cela, quelle qu'ait été la nature du milieu utilisé: Ringer, sérum frais ou sérum chauffé; l'existence d'une phagocytose en l'absence de tout milieu sérique nous paraît particulièrement digne d'être soulignée.

2. *Staphylocoques.* Phagocytose nette des germes «nus» dans le sérum frais, faible dans le sérum chauffé et dans le Ringer. Phagocytose nette des germes d'abord enrobés par P II dans ces trois milieux.

3. *Bacilles de Danysz.* Phagocytose faible des germes «nus» dans le sérum frais, nulle dans le sérum chauffé et dans le Ringer. En revanche, phagocytose considérable, et même massive, des germes d'abord traités par le P II et placés secondairement au contact des globules blancs (même dans le sérum chauffé, même dans le Ringer).

4. *Colibacilles.* Pas de phagocytose des germes «nus» dans les milieux

sériques et dans le Ringer. *Idem* quand étaient employés des germes d'abord traités par le P II, à une exception près: phagocytose légère de ces germes traités quand ils étaient mis au contact des globules blancs dans du sérum frais.

5. *Salmonella typhimurium.* Ce germe «nu» n'est pas phagocyté en présence de Ringer et de sérum chauffé. Il l'est un peu dans du sérum frais; cependant, il devient très phagocytable dans les deux milieux sériques quand, dans un premier temps, il a été recouvert de P II.

II

La connaissance des différents effets antibactériens que nous venons, très sommairement, de rapporter – surtout du dernier – conduisait presque obligatoirement à se poser cette question: *In vivo, le P II*, tel que nous l'obtenons à partir du thymus de veau, *ne pourrait-il pas exercer un effet antiinfectieux* ? Avec l'espoir de répondre à cette question, nous avons mis en route un très grand nombre d'expériences. Ces expériences, les voici. Mais peut-être, sans plus tarder, devons-nous dire que la conclusion atteinte fut exactement contraire à celle que nous attendions.

Protocole expérimental

Nos expériences in vivo ont comporté deux temps. D'abord, nous avons voulu savoir si P II était toxique, ou non, pour les animaux de laboratoire. Dans un second temps, les résultats fournis par la première série d'expériences ayant été tout à fait satisfaisants, nous sommes passés à la recherche proprement dite d'un pouvoir antiinfectieux éventuel.

1. Contrôle de la toxicité

Ce contrôle a comporté une injection ou des injections, sous-cutanées, intrapéritonéales ou intraveineuses, de doses fortes d'une solution fraîchement préparée de P II en eau physiologique chez des souris, des lapins et des cobayes. Ont été recherchées, à la fois, une toxicité «primaire» et une toxicité «secondaire» d'ordre allergique.

2. Recherche d'un pouvoir antiinfectieux

Toutes nos expériences ont été faites sur des souris infectées par un germe pathogène et traitées, ou non, par des injections de notre fraction polypeptidique en solution.

Souris. Plus de 500 animaux, au total, ont été utilisés. Il s'agissait de souris blanches, d'un poids de 20 g, et des deux sexes.

Germes pathogènes. Trois ont été retenus : a) *un staphylocoque* : le staphylocoque *Tin* (suspension contenant 2 milliards de germes par ml); b) *une Salmonella typhimurium* (100 millions de germes par ml); c) *une Salmonella paratyphi C* (133 millions de germes par ml). Les souches nous avaient été aimablement fournies, la première par le Dr *Vaisman* (Institut A. Fournier, Paris), les deux autres par le Dr *Rowley* (Institut *Wright-Fleming*, Londres). Les cultures utilisées (sur gélose) étaient âgées de 24 heures. Les germes, une fois recueillis par centrifugation, étaient lavés et remis en suspension dans de l'eau physiologique. Chaque injection de cette suspension était faite chez l'animal sous le volume de 0,5 ml. Cette injection avait toujours lieu par voie intrapéritonéale.

Solution de P II. Il s'agissait d'une fraction polypeptidique fraîchement extraite du thymus. Elle était dissoute dans de l'eau physiologique (2 mg/ml). Cette solution a été injectée, chez les animaux, sous le volume de 1 ml, dans différentes conditions.

a) *En mélange avec une suspension de germes*, ce mélange ayant été préparé *aussitôt* avant l'injection, ou bien encore 30 minutes ou 1 heure avant elle. Durant cet espace de temps, la préparation était conservée à +18° C. Dans les préparations témoins, de l'eau physiologique avait pris la place de la solution de P II.

b) *1 heure avant l'injection des germes.* En ce cas, l'introduction de l'agent chimique était faite, soit par voie intrapéritonéale, soit par voie intraveineuse.

c) *1 heure après l'injection des germes.* Seules ont été faites, en ce cas, des injections intrapéritonéales. Là encore (et aussi pour b), une injection d'eau physiologique remplaçait l'injection du polypeptide chez les animaux de contrôle.

d) *24 heures avant ou après l'injection des germes.* Voie d'introduction uniquement intrapéritonéale. Cette série d'expériences a été seulement effectuée chez les animaux infectés par l'un ou l'autre des deux germes Gram-négatif que nous avions choisis : *Salmonella typhimurium* et *Salmonella paratyphi C.*

Résultats

1. Contrôle de la toxicité

a) La *souris* a supporté impunément une injection intrapéritonéale (1 ml) de notre solution de P II (2 mg/ml). Cette injection a pu, sans dommage, être répétée 3 fois à 2 heures d'intervalle. Même observation, après une injection intraveineuse (1 ml d'une solution à 2 mg/ml).

b) Aucun incident non plus n'a été relevé après injection sous-cutanée de la même solution chez le *lapin* et le *cobaye*. Chez le lapin, au point

Tableau 5

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	4 jours	1 semaine
Staphylocoques Tin.....	90	50	10
Staphylocoques Tin + P II après mélange extemporané	35	0	

Tableau 6

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	48 heures	1 semaine
Staphylocoques Tin	80	53,33	10
Staphylocoques Tin + P II (mélange injecté 1 heure après sa préparation) ...	23,33	0	

d'injection, nous avons pu mettre en évidence – au moyen du bleu trypan – une augmentation de la perméabilité capillaire. De même, aucun incident ne fut à signaler après injection intraveineuse, chez le *lapin*, de 1 mg et même de 5 mg de P II.

De l'ensemble de ces données, la conclusion à tirer est évidemment simple: *notre polypeptide ne jouit d'aucune toxicité primaire.* D'autres expériences (mettant en œuvre des injections séparées par de longs intervalles) nous permettent d'ajouter qu'il ne jouit pas davantage d'une *toxicité secondaire.*

2. Recherche d'un effet antiinfectieux

Si les résultats précédents étaient conformes, en somme, à notre espérance, il devait en aller tout à fait autrement pour la seconde partie de nos recherches. En effet, ici, ce que nous devions finalement admettre, c'était, non pas un effet antiinfectieux mais, beaucoup plus souvent, un effet proinfectieux. Cet effet produit par le P II a, notamment, été observé dans *tous les cas*, où la substance était introduite chez l'animal par voie intrapéritonéale, en mélange avec le germe, ou bien encore 1 heure avant ou après lui. La nature du germe est apparue sans importance. A titre d'exemple, nous reproduirons quelques-uns de nos résultats dans les tableaux suivants (tableaux 5–10).

Dans 1 cas, l'effet proinfectieux de la fraction polypeptidique est apparu moins net: ce fut quand la solution correspondante était injectée chez les animaux par voie intrapéritonéale et 24 heures avant l'intro-

Tableau 7

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	48 heures	1 semaine
Eau physiologique puis, 1 heure plus tard, staphylocoques Tin	81,66	58,33	3,33
P II puis, 1 heure plus tard, staphylocoques Tin	10	0	

Tableau 8

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	4 jours	1 semaine
Eau physiologique puis, 1 heure plus tard, *S. typhimurium*	78	42	10
P II puis, 1 heure plus tard, *S. typhimurium*	50	0	

Tableau 9

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	4 jours	1 semaine
Eau physiologique puis, 1 heure plus tard, *S. paratyph. C*	100	46,66	13,33
P II puis, 1 heure plus tard, *S. paratyph. C*	36,66	0	

Tableau 10

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	3 jours	1 semaine
S. typhimurium puis, 1 heure plus tard, eau physiologique	95	75	10
S. typhimurium puis, 1 heure plus tard, P II	65	0	

duction des germes (tableau 11). Néanmoins, dans ce cas encore, il existait. Il suffit, pour s'en convaincre, de regarder comparativement les résultats obtenus avec les témoins (animaux ayant reçu, à la place de P II, de l'eau physiologique). Un second fait s'impose également à la lecture du tableau 11, à savoir l'effet protecteur exercé par une injection préalable d'eau physiologique (se reporter comparativement au tableau 10).

Tableau 11

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	4 jours	1 semaine
Eau physiologique puis, 24 heures plus tard, *S. typhimurium*	100	100	80
P II puis, 24 heures plus tard, *S. typhimurium*	80	80	60

Tableau 12

Nature des injections	Pourcentage, en fonction du temps, des animaux survivants		
	24 heures	4 jours	1 semaine
Eau physiologique (en i.v.) puis, 1 heure plus tard, staphylocoques Tin (en i.p.)	73,33	16,66	10
P II (en i.v.) puis, 1 heure plus tard, staphylocoques Tin (en i.p.)	70	16,66	11,11

Enfin, un dernier cas mérite d'être médité: celui où l'injection de la solution de polypeptide, ou d'eau physiologique, faite 1 heure avant l'injection des germes, était effectuée par voie intraveineuse. Ce que nous avons noté ici, c'est encore une diminution, voire même une disparition, de l'effet proinfectieux du P II (voir tableau 12).

Ajoutons pour terminer que, dans certaines séries d'expériences, l'introduction d'eau physiologique dans la circulation, 1 heure avant l'injection des germes, a ralenti un peu le rythme de la mortalité des animaux.

III

Après avoir exposé les faits, voyons maintenant quels commentaires il est permis de leur ajouter. Tour à tour, nous considérerons les observations faites in vitro, puis celles faites in vivo. Les unes et les autres paraissent, à un examen superficiel, se contredire. Elles n'ont qu'un point commun: leur netteté.

A. Effets antibactériens in vitro

Rappelons, en quelques phrases, ce que nous avons essentiellement remarqué ici. Une fraction polypeptidique basique, appelée P II, s'est montrée capable:

- de provoquer l'agglutination de germes divers, Gram-positif ou Gram-négatif, pathogènes ou non, mis d'abord en suspension (homogène) dans de l'eau physiologique;
- de modifier le développement des bactéries dans un milieu de culture (bouillon): ou bien, la culture était suspendue, ou bien, si elle se produisait encore, les germes de nouvelle formation restaient collés les uns aux autres;
- d'inhiber le métabolisme respiratoire de nombreux microorganismes (Gram-positif ou Gram-négatif), cette inhibition pouvant être déterminée par des doses très faibles de produit;
- enfin, et peut-être surtout, P II s'est encore montré capable de renforcer – voire même de déclencher – la phagocytose de nombreux germes par des polynucléaires, cette dernière action rappelant, par sa netteté, celle des meilleurs anticorps opsonisants.

Comment expliquer ces différents effets? Ici, la première réponse à donner est simple; c'est que P II a le pouvoir de se fixer sur la surface des bactéries et que, par cette fixation, il la modifie du tout au tout.

Qu'il y ait effectivement fixation de P II à la surface de la bactérie, cela ne nous paraît pas douteux. Comme preuves, nous donnerons au moins les suivantes:

- des germes d'abord traités par P II restent agglutinés, quand secondairement, et même après lavage, on les maintient dans de l'eau physiologique;
- quand le *Micrococcus lyosdeikticus* a été conservé 5 heures dans une solution de P II, il devient, même après lavage, insensible à l'action lytique du lysozyme;
- des bacilles typhiques, d'abord traités par P II, deviennent ultérieurement incapables d'adsorber l'anticorps spécifique et le complément;
- ajoutons enfin, qu'en employant de fortes concentrations de germes, nous sommes parvenus à «épuiser» une solution de P II. Le liquide surnageant n'avait plus de pouvoir agglutinant; de même, il ne précipitait pas, quand on l'ajoutait à un sérum de cobaye frais, ce que fait une solution normale de P II.

Mais comment la fixation en cause arrive-t-elle à se produire? Là encore, la réponse est facile. P II est un corps basique, donc chargé positivement; la surface bactérienne, au contraire, est, on le sait, chargée négativement. Dans ces conditions, il est naturel que prenne place une combinaison, une fixation d'*ordre électrostatique*.

Quels sont, cependant, les constituants de la surface bactérienne qui sont responsables des charges négatives? On peut répondre cette fois que

ce sont les substances à groupements anioniques. A la surface des bactéries, nombreuses sont ces substances. Nous citerons au moins les suivantes:

- pour toutes les bactéries: l'*acide muramique* et l'*acide diaminopimélique;* c'est à dire les deux acides qui prennent part à la constitution du mucopeptide (ou glucopeptide), pièce maîtresse insoluble de la charpente pariétale;
- en outre, pour les bactéries Gram-positif: l'*acide glutamique* et, du moins pour un grand nombre d'entre elles, un polymère du *ribitol-5-phosphate*, nommé *acide teichoïque;*
- pour les bactéries Gram-négatif, à côté des corps précédents, une quantité notable de *lipides*, en particulier de phospholipides (25–40%); ceux-ci portent en effet des groupements anioniques de l'acide phosphorique qu'ils contiennent. A ajouter encore certains constituants des polyosides antigéniques comme un *acide sialique* et, du moins pour certaines bactéries (colibacilles), de l'*acide colominique*, qui est un polymère de l'acide-N-acétylneuraminique.

Etant donné que P II semble constitué par des molécules relativement petites, on pourrait imaginer aussi que, diffusant au delà de la paroi, il a le pouvoir de se fixer encore sur les groupements anioniques des *phospholipides* et des *dérivés ribonucléiques* que la bactérie porte à la surface de son cytoplasme.

Substances nombreuses, donc. Mais c'est ici que les difficultés commencent. Sur laquelle ou sur lesquelles va se fixer le P II ? A cette question tentent de répondre des recherches en cours mais, au point où elles en sont, nous ne pouvons donner encore aucune précision. Au moins, on peut affirmer ceci: P II pourrait se fixer sur tous les groupements anioniques qui sont encore libres à la surface ou dans les bactéries, en d'autres termes, qui restent ionisés.

Nous avons vu qu'en conséquence de la fixation de P II sur les germes, se produit une neutralisation de la charge superficielle. Ce phénomène conduit à une floculation. Celle-ci se traduit macroscopiquement par une agglutination des particules.

Cependant, on pourrait imaginer, pour le même corps, des effets plus subtils. Ainsi, P II pourrait entraîner des modifications de la perméabilité de la cellule bactérienne. Sans doute, il exerce cette action rien qu'en changeant le caractère électrostatique de la surface. Mais il pourrait aussi le faire, en occupant la place du «récepteur» (ou lieu de passage) de certains métabolites. On pourrait également penser que P II inhibe presque nécessairement certaines réactions enzymatiques, s'il va se com-

biner à des coenzymes indispensables (comme le TPN, le DPN, l'ATP, l'ADP, etc.) ou à des substrats (comme les hexoses phosphates). Tout cela, toutefois, reste du domaine de l'hypothèse. En ce moment, nous ne pouvons en dire plus.

B. Pouvoir proinfectieux du polypeptide P II

Ici, l'ensemble de nos constatations peut être condensé dans ces deux conclusions.

a) Une simple injection intrapéritonéale d'eau physiologique est suffisante pour élever la résistance non spécifique de la souris à l'injection faite 24 heures plus tard, et par la même voie, de germes pathogènes.

b) Le P II isolé par nous du thymus de veau, loin de bénéficier d'un pouvoir antiinfectieux, comme nous l'avions pensé sur la foi des expériences in vitro, exerce au contraire dans l'organisme une action proinfectieuse.

Quelle explication donner à la première de ces constatations ? Elle nous paraît assez simple. L'eau physiologique doit exercer un double rôle. Bien que peu irritante par elle-même, elle modifierait l'état du péritoine et cette modification s'opposerait à la rapide diffusion des germes. En second lieu, elle pallierait jusqu'à un certain point à la déshydratation de l'organisme, qui est une des conséquences les plus évidentes de l'infection. Le premier rôle, toutefois, nous semble plus important que le second, attendu que l'injection dans le péritoine – c'est à dire là même où va éclater l'infection – est plus efficace que l'injection intraveineuse.

Reste maintenant à expliquer le mécanisme du pouvoir proinfectieux exercé, dans le cas présent, par P II. A plusieurs reprises, déjà, nous avons eu l'occasion de dire que ce pouvoir nous avait surpris.

Mais, à la réflexion, avons-nous eu raison d'être surpris ? Ce n'est pas absolument sûr. En effet, les observations rapportées dans ce mémoire ne sont pas les premières à faire état du pouvoir proinfectieux d'un polypeptide. Le fait a déjà été signalé pour des polypeptides extraits, non de tissus, mais d'un microorganisme: *Pseudomonas pseudomallei* [5]. D'autre part, *Linz* et *Lecoq*, dans une note récente [6], ont montré l'action également proinfectieuse que peut produire, chez l'animal infecté, une simple injection d'un bouillon de culture.

Mais, ceci dit, il reste à se demander ce qui se passe dans tous ces cas.

Les germes qui ont été injectés après avoir été mis au contact du P II, donc qui avaient fixé au moins une part de celui-ci, ont-ils conservé dans l'organisme leur couverture polypeptidique ? On n'a aucune raison de l'affirmer. Il est possible, en effet, qu'*in vivo*, certaines substances, plus

«avides» encore de P II que ne l'est la paroi bactérienne, soient venues détacher le polypeptide. Ces substances seraient, par exemple, dans les espaces extracellulaires, des mucopolysaccharides acides, des mucoprotéines, des phospholipides[1] etc. On pourrait aussi admettre que ce sont ces mêmes substances, qui ont fixé le polypeptide injecté isolément avant ou après les germes. Mais rien de tout cela ne nous paraît encore certain. Précisons, au contraire, qu'in vitro, nous avons été incapables d'arracher un P II fixé sur la paroi bactérienne au moyen de solutions diverses de mucopolysaccharides comme l'acide chondroïtine-sulfurique.

Pour ce qui est du pouvoir proinfectieux lui-même, on pourrait, à priori; invoquer une action de P II sur les phagocytes, les anticorps, ou encore sur des facteurs de résistance non spécifiques comme la properdine. Mais aucune de ces hypothèses ne paraît pouvoir résister à la critique.

On voit mal comment P II freinerait in vivo la phagocytose alors qu'il la favorise in vitro. On imagine mal une combinaison possible de P II avec des anticorps ou la properdine. Toutes ces substances ne sont pas de caractère acide. Il faut donc trouver autre chose. Dans l'état actuel de nos connaissances, l'explication la plus raisonnable paraît être la suivante: l'effet proinfectieux ici observé se produirait avant tout par une modification locale du terrain.

Le polypeptide thymique – et aussi des polypeptides bactériens – en agissant sur le tissu conjonctif et les vaisseaux (lymphatiques ou sanguins) favoriseraient la dissémination des germes et leur entrée dans la circulation. On sait déjà (cf: travaux de *Valy Menkin* et travaux anglais récents) qu'un grand nombre de polypeptides sont des agents phlogistiques puissants. On sait aussi, qu'au début de l'inflammation, il y a hyperhémie, augmentation de la perméabilité des vaisseaux. Tout cela favorise, on ne peut en douter, la dissémination, la dispersion des germes. Tout cela aide à transformer une infection locale en infection générale. Tout cela, en d'autres termes, favorise la virulence microbienne.

Des faits d'observation personnelle viennent, d'ailleurs, s'ajouter à ces données générales. 1. Nous nous sommes assurés de l'action propre de notre polypeptide; comme la leukotaxine de *Menkin*, il augmente la perméabilité vasculaire. 2. En second lieu, nous avons vu, au cours d'expériences qui seront rapportées autre part, qu'une action proinfectieuse, très comparable à celle produite par P II, peut être obtenue tout simplement en injectant avec les germes quelques dixièmes de ml d'une solution de peptone ou de bouillon nutritif (matériaux qui, eux aussi,

---

[1] Autant de substances fortement acides, donc chargées négativement.

sont connus pour leur action phlogistique) qu'on utilise dans la vie quotidienne des laboratoires de Microbiologie. Dans quelques cas même, le pouvoir proinfectieux exercé par le bouillon nous est apparu encore supérieur à celui qu'avait manifesté, entre nos mains, le polypeptide thymique.

Est-ce là, toutefois, le seul mécanisme par lequel P II favorise, chez l'animal, l'infection ? Nous n'oserions l'affirmer. Comme nous le disions à propos de l'action antimétabolique que la substance en question exerce peut-être sur la cellule bactérienne, on pourrait aussi bien envisager des effets antimétaboliques s'exerçant sur l'organisme lui-même. Par exemple, P II pourrait aller se fixer sur un constituant tissulaire. Cette fixation entraînerait des troubles métaboliques divers et, en dernière analyse, ce serait ces troubles qui seraient les vrais responsables des faits observés.

A ce sujet, comment ne pas mentionner ce que vient de nous apprendre *Mc Ilwain* [7] : cet auteur a remarqué que la fixation d'histones sur un ganglioside du cerveau inhibe la réponse métabolique (augmentation de la respiration et de la glycolyse) à un stimulus électrique.

Mais, de toute façon, nous ne pouvons insister davantage. Les faits que nous avions observés méritaient, croyons-nous, d'être signalés, pour leur netteté. Et peut-être plus encore, ceux qui relèvent des observations faites in vivo. Ils contribuent en effet à mettre en évidence la grande fragilité de l'équilibre bactérie-hôte infecté. A qui reviendra la victoire, aux bactéries, à l'organisme ? Peu de chose, sans doute, suffit à faire pencher le fléau de la balance d'un côté ou de l'autre.

Il paraît exister, au demeurant, autant de substances capables de s'opposer à l'éclosion d'une infection qu'il en existe de propres à la favoriser (comme le fait notre fraction polypeptidique, comme le fait le bouillon). C'est ainsi, qu' au cours de nouvelles expériences, utilisant à la place du P II, mais dans les mêmes conditions, différents sérums d'animaux *normaux* (cheval, bœuf, mouton), nous nous sommes trouvés en présence d'une nette action antiinfectieuse. Par quel mécanisme ? C'est ce que nous cherchons à préciser. Mais, déjà, nous pouvons affirmer que des anticorps ne jouent en ce cas aucun rôle.

Conclusions

Dans une première partie, les auteurs ont examiné les différents *effets antibactériens* qu'arrive à produire in vitro une fraction polypeptidique de caractère basique (P II), isolée par leurs soins du thymus de veau. Ces effets sont les suivants : agglutination, opsonisation, arrêt ou modification des cultures bactériennes, paralysie du métabolisme respiratoire.

Tous ces effets sont non spécifiques. Ils s'exercent sur des germes Gram-positif et Gram-négatif, sur des germes pathogènes et des germes saprophytes.

Dans une seconde partie, ont été exposées des expériences qui montrent, qu'in vivo, la même substance jouit d'un *pouvoir proinfectieux*.

D'un côté, effets antibactériens, de l'autre, pouvoir proinfectieux. Quels peuvent être, ici et là, les mécanismes impliqués ?

Des faits et des hypothèses sont présentés.

Schlußfolgerungen

In einem ersten Teil haben die Autoren die verschiedenen *antibakteriellen Wirkungen* geprüft, die eine basische Polypeptidfraktion (P II) *in vitro* hervorzurufen vermag; P II konnten sie durch ihre Bemühungen aus dem Kälberthymus isolieren. Die Wirkungen sind folgende: Agglutination, Opsonisation, Stillstand oder Veränderung von Bakterienkulturen, Lähmung der Atmungsvorgänge. Alle diese Wirkungen sind nicht spezifisch. Sie erstrecken sich auf grampositive und gramnegative Keime, auf pathogene und saprophytäre Erreger.

In einem zweiten Teil wurden Versuche dargelegt, die zeigen, daß dieselbe Substanz *in vivo* einen *proinfektiösen Einfluß* ausübt.

Auf der einen Seite antibakterielle Wirkungen, auf der anderen Seite proinfektiöser Einfluß. Was können hier wie dort die im Spiel stehenden Mechanismen sein ?

Tatsachen und Hypothesen werden vorgelegt.

Conclusioni

Nella prima parte gli autori hanno studiato i diversi *effetti antibatterici* che può produrre *in vitro* una frazione polipeptidica a carattere basico (P II) isolata da essi dal timo di vitello. Tali effetti sono i seguenti: agglutinazione, opsonizzazione, soppressione o modificazione delle culture batteriche, paralisi del metabolismo respiratorio. Tutti questi effetti non sono specifici. Essi si manifestano su germi grampositivi e gramnegativi, su germi patogeni e saprofiti.

Nella seconda parte del lavoro vengono esposte delle esperienze che dimostrano come *in vivo* le stesse sostanze possiedano delle *proprietà favorenti l'infezione*.

Da una parte effetti antibatterici, dall'altra proprietà pro-infettive. Quali possono esserne, nell'un caso e nell'altro, i meccanismi responsabili ?

Vengono esposti fatti e ipotesi relativi.

Conclusions

In a first section, the authors have examined the different antibacterial effects produced *in vitro* by a polypeptide fraction of basic nature (P II), isolated by them from calf's thymus. These effects are the following: agglutination, opsonisation, stoppage or modification of bacterial cultures, paralysis of respiratory metabolism. All these effects are non-specific. They are to be detected on the Gram positive and Gram negative germs, on the pathogenic and saprophyte germs.

In a second section, experiments were made which showed that *in vivo* the same substance exhibits a *pro-infectious capacity*.

On the one side, antibacterial action, and on the other side pro-infectious capacity: what can be the mechanism involved in the two cases? Some facts and some hypotheses are given.

1. *Henon M., Pelletier M.* et *Delaunay A.:* Substances antibactériennes d'origine tissulaire. I: Pouvoir agglutinant de certains polypeptides basiques. Rev. Immunol. (Paris) **23,** 245 (1959). – II: Pouvoir opsonisant de certains polypeptides basiques. Rev. Immunol. (Paris) **23,** 258 (1959). – III: Influence de polypeptides divers sur la croissance «in vitro» de quelques bactéries. Ann. Inst. Pasteur **98,** 710 (1960). – IV: Action d'un polypeptide extrait du thymus et de corps divers sur le métabolisme respiratoire de quelques bactéries. Path. et Biol. **8,** 715 (1960).
2. *Skarnes R. C.* et *Watson D. W.:* Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. Bact. Rev. **21,** 273 (1957)
3. *Dubos R. J.* et *Hirsch J. G.:* The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus. J. exp. Med. **99,** 55 (1954).
4. *Wolff R.* et *Brignon J.:* Influence et mode d'action du sulfate de protamine sur la croissance bactérienne. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **36,** 1125 (1954).
5. *Levine H. B., Lien O. G.* et *Maurer R. L.:* Mortality enhancing polypeptide constituents from *Pseudomonas pseudomallei.* J. Immunol. **83,** 468 (1959).
6. *Linz R.* et *Lecoq E.:* Le bouillon, facteur favorisant de péritonites expérimentales mortelles du cobaye. C. R. Soc. Biol. (Paris) **152,** 1017 (1958).
7. *McIlwain H.:* Characterisation of naturally occurring materials which restore excitability to isolated cerebral tissues. Biochem. J. **78,** 24 (1961).