

DE L'ACTION MUTAGÈNE DES RAYONS GAMMA SUR LES LACTOBACILLES

par

R. DONIKIAN, L. R. VALETTE et G. DE SAINT-AUBERT

Institut Merieux, 69-Marcy l'Etoile

Introduction

Les lactobacilles jouissent depuis une vingtaine d'années d'un regain d'intérêt [3] en thérapeutique, alors qu'ils sont utilisés depuis des siècles en diététique et dans la préparation de produits alimentaires tels que yaourts, laits fermentés, fromages, etc.

Cet intérêt des lactobacilles est dû aux facteurs suivants :

1) Les lactobacilles sont des microorganismes parfaitement inoffensifs et sont les hôtes normaux du tube intestinal, du moins au cours des premières années de la vie [10].

2) En raison de l'orientation de la thérapeutique vers l'emploi de plus en plus fréquent d'antibiotiques, on a été amené à étudier des germes capables d'acquérir une antibiorésistance polyvalente et de prévenir ainsi par leur implantation, les troubles gastro-intestinaux survenant en cours de traitement. Parmi les différents microorganismes, les lactobacilles se sont montrés particulièrement aptes à acquérir ce caractère d'antibiorésistance et à remplir le rôle de complément à toute antibiothérapie.

Ceci explique notre choix des lactobacilles et l'étude de la possibilité de fixer par des rayons gamma ce caractère antibiorésistant, jusque-là phénotypique et par conséquent soumis à des variations.

Si, jusqu'à présent, les rayons gamma ont été utilisés soit dans l'irradiation stérilisante des germes [4], soit dans l'étude des modifications génétiques provoquées sur des germes du groupe des Enterobacteriacées, il semble que peu de travaux ont été effectués sur la fixation des caractères acquis des bactéries tels que les lactobacilles [5, 6, 7].

Matériel et méthodes

A) Matériel

Notre expérimentation a porté au début sur le variant tétracyclino-résistant du lactobacillus casei désigné ici par le symbole

casei Te. Pour l'irradiation, des cultures de 24 heures de Casei Te en milieu M.R.S. (1) ont été utilisées. L'irradiation a porté sur la culture, sur les germes centrifugés et repris soit par de l'eau physiologique soit par du tampon phosphate à pH 6,4.

Dans tous les cas, la suspension bactérienne renferme un agent inducteur qui est une base purique, à la concentration de 1,5 p. 1000 et l'antibiotique correspondant. Dans la première expérience, la tétracycline a été utilisée à deux concentrations différentes :

A1, soit 50 mg de tétracycline pour 10 ml de culture.

A2, soit 100 mg de tétracycline pour 10 ml de culture.

B) L'irradiation

De nombreux travaux, dont ceux de Dupuy [5, 6, 7], ont fixé les conditions de stérilisation du lait et de destruction des lactobacilles. Les doses de rayons gamma vont de 10 à 150 kilorads.

Notre but étant de provoquer une mutation stable au sein d'une population de lactobacilles et non de les détruire, il fallait déterminer la dose d'irradiation de rayons gamma la plus satisfaisante. Grâce à l'amabilité du C.L.A.A., nous avons pu étudier les effets de deux sources d'irradiation :

- 1) *L'une à faible débit de dose ;*
- 2) *L'autre à fort débit de dose.*

Irradiation à faible débit

Il s'agit d'un irradiateur CEA-Conservatome du type « Aurore ».

La chambre d'irradiation est cylindrique, le volume utile offrant la meilleure homogénéité de flux présente un diamètre de 70 mm pour une hauteur de 150 mm.

La source est constituée par 5 crayons de 20 cm de hauteur, de cobalt 60.

Les crayons sont disposés sur le pourtour de la chambre d'irradiation à égale distance l'un de l'autre.

Les échantillons à irradier sont introduits dans un évidement situé à la partie centrale du cylindre. Au moment des expériences le débit de dose était de 44 kilorads/heure.

Irradiation à fort débit

La source de cobalt 60 du C.L.A.A., est constituée par un cylindre dont le diamètre peut varier entre les limites usuelles suivantes : 25 cm et 50 cm. Les débits de dose étant respectivement de 2,5

(1) DE MANN ROGOSA et SHARPE, *J. Appl. Bact.*, 1960, **23**, 130.

TABLEAU I

IRRADIATION A FAIBLE DÉBIT DU L. CASEI TE

<i>Dose de Tétracycline en mg/ml</i>	<i>Dose d'irradiation en MR</i>	<i>Durée</i>	<i>En milieu de culture</i>	<i>En tampon</i>	<i>En eau physiologique</i>
A1	0,11	12 h 30	Nombreuses colonies autour des disques	Nombreuses colonies autour des disques	Nombreuses colonies autour des disques
	0,45	10 h	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
	0,90	20 h	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
A2	0,11	2 h 30	Quelques colonies autour des disques	Quelques colonies autour des disques	Absence de culture
	0,45	10 h	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
	0,90	20 h	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture

TABLEAU II

IRRADIATION A FORT DÉBIT DU L. CASEI TE

<i>Dose de Tétracycline en mg/ml</i>	<i>Dose d'irradiation en MR</i>	<i>Durée en mn</i>	<i>En milieu de culture</i>	<i>En tampon</i>	<i>En eau physiologique</i>
A1	0,1	8	Faible culture Rien autour des disques	Faible culture Rien autour des disques	Faible culture Rien autour des disques
5	0,4	32	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
	0,8	64	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
A2	0,1	8	Absence de culture	Faible culture Rien autour des disques	Faible culture Rien autour des disques
10	0,4	32	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture
	0,8	64	Absence de culture	Absence de culture	Absence de culture

TABLEAU III

COURBE DE CROISSANCE ENREGISTRÉE AU BIOPHOTOMÈTRE DE JOUAN

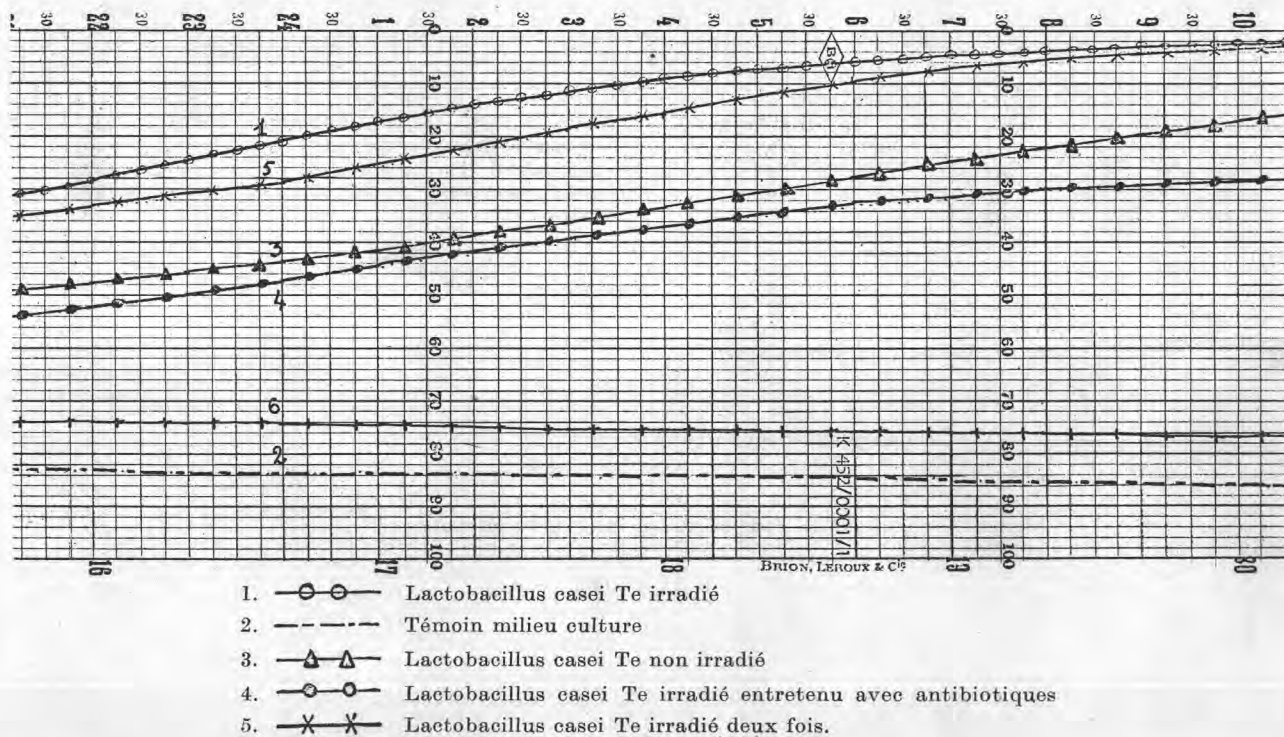


TABLEAU IV
ANTIBIORÉSISTANCE COMPARÉE DES SOUCHES

Concentration en Tétracycline des disques (en m c g)	Zone d'inhibition en millimètres				
	<i>Souche L Casei Te non irradiée entretenu avec antibiotiques</i>	<i>Souche Casei non irradiée entretenu sans antibiotiques</i>	<i>Souche irradiée entretenu avec antibiotiques</i>	<i>Souche irradiée sans antibiotiques (30 passages)</i>	<i>Souche irradiée deux fois</i>
1 000	28	Devient très	25	28	21
500	21	rapidement sensible	20	22	22
250	20	(30 mm à toutes	16	19	20
100	14	les concentrations)	14	14	14
50	Résistant		Résistant	Résistant	Résistant

et 1,5 megarads à l'heure, au centre du cylindre. Cette source est constituée par une centaine de barreaux de cobalt 60.

Lors des expériences, le débit horaire était de 750 kilorads.

C) Méthode d'isolement des mutants

Dans cette culture irradiée, il s'agit d'isoler ensuite les mutants les plus actifs ; la technique en est la suivante :

Aussitôt après irradiation, les cultures sont réparties sous un volume de 1 ml dans des boîtes de Pétri stériles puis de la gélose MRS fondue et ramenée à la température de 40° est versée dans la boîte de Pétri [8, 9, 11]. Après mélange et prise en masse de la gélose, des disques d'antibiotiques aux concentrations suivantes : 1 000 gamma, 500 gamma, 250 gamma, 100 et 50 gamma, sont disposés sur la surface. Ces boîtes sont mises ensuite à incuber à 37° C durant trois jours. Nous notons alors si la culture a résisté à la dose d'irradiation, et si le développement a lieu au niveau des disques d'antibiotiques. Ce dernier point nous intéresse surtout [1 et 2] car le germe est prélevé à ce niveau et ensemencé dans du milieu de culture neuf.

Résultats

Les tableaux I et II montrent l'influence de l'intensité de l'irradiation sur la survie et l'antibiorésistance du *Lactobacillus casei* tétracyclino-résistant.

D'après les résultats relevés sur ces tableaux, il est manifeste que l'action la plus nette est obtenue avec l'irradiateur à faible débit à la dose de 110 kilorads et à la concentration Al de tétracycline, soit 5 mg par ml. Par la suite, nos études ont porté sur la souche TAI/LO, 11. Cette souche a subi une trentaine de passages sur milieu MRS puis elle a été étudiée quant à son antibiorésistance et à sa vitalité vis-à-vis de la souche de départ non irradiée. De plus, nous avons voulu voir si une seconde irradiation à 120 kilorads à faible débit, pouvait améliorer l'antibiorésistance et la faire passer à un niveau supérieur.

Les tableaux III et IV montrent les résultats obtenus.

Ces tableaux montrent que :

- 1) La multiplication de la souche casei Te irradiée une fois est excellente et même supérieure à la souche de départ.
- 2) L'antibiorésistance de la souche est acquise et se maintient après trente subcultures en absence d'antibiotiques.
- 3) Une seconde irradiation semble améliorer l'antibiorésistance et la faire monter à un niveau supérieur. Mais nos résultats ne sont pas encore très probants. Nous poursuivons actuellement cette

expérimentation sur d'autres lactobacilles et streptocoques. Elle fera l'objet d'une communication ultérieure.

En conclusion de cette étude sur les lactobacilles, il se dégage les points suivants :

a) Les lactobacilles sont sensibles aux fortes radiations ionisantes. Les doses limites d'irradiation sont de 100 kilorads ;

b) L'action mutagène la plus nette a été obtenue à partir d'une source de rayons gamma à flux lent, débitant 100 000 rads en 2 à 3 heures.

c) Pour obtenir une mutation dans un sens dirigé sous l'action des rayons gamma, il est nécessaire d'avoir déjà des germes sélectionnés, les rayons gamma fixant le caractère phénotypique et le faisant entrer dans le génotype. Les mutants ainsi obtenus semblent dans nos expérimentations en cours, depuis lors, génétiquement stabilisés. Il serait donc possible d'obtenir des souches de lactobacilles antibiorésistants, sans avoir recours à une sélection continue.

Résumé

Cette étude porte sur des lactobacilles utilisés en thérapeutique pour leurs caractères antibiorésistants, dans la prévention de certains troubles gastro-intestinaux. La possibilité de fixer par les radiations gamma ce caractère d'antibiorésistance jusque-là phénotypique donc soumis à des variations, a été étudiée. Il résulte de ce travail que les lactobacilles sensibles aux radiations ionisantes à partir de 200 kilorads, peuvent présenter des mutations lorsqu'ils sont soumis à des doses de 80 à 100 kilorads. Pour obtenir des mutants génétiquement stabilisés, il convient d'irradier des bactéries déjà sélectionnées envers le caractère désiré.

Summary

Mutagen action of gamma radiation upon lactobacillus :

This communication concerns a species of *Lactobacillus* employed in therapeutics for their antibioresisting characters in the prevention of some gastro-intestinal diseases. We study the possibility of fixing by gamma radiation this character of antibiorésistance ; this character was untill now phenotypical, therefore subjected to variations. From this study, it appears that the lactobacillus, which are sensible to ionizing radiations from 200 kilorads, may present some mutation when they are subjected to doses of 80 to 100 kilorads. To obtain mutants genetically stabilized, we must irradiate bacteria previously selected against the wanted character.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADELBERG (E.) et PITTARD (J.). Chromosome transfer in bacterial conjugation. *Bact. Reviews*, 1965, **29** (2), 161.
- [2] BAUDENS (J. G.) et CHABBERT (Y. A.). Analyse des facteurs de résistance transférables isolés en France. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **112**, 565.
- [3] DUBOS (R.). Le rôle biologique de la flore digestive. *Rev. d'Immunologie*, 1962, **26** (3), 97.
- [4] DE SAINT-AUBERT (G.), VALETTE (L.), PLAN (R.) et CHERBY (D.). Essais d'exposition aux radiations gamma de petits articles médicaux et de solutions protéiniques pharmaceutiques. *Radiostérilization of Medical Product I.A.E.A.*, Vienne, 1967.
- [5] DUPUY (P.) et TREMEAU (O.). Influence des conditions de culture sur la résistance aux radiations de quelques lactobacillus. *Ann. Alim. et Nutr.*, 1963, **17** (6), B 427.
- [6] DUPUY (P.). Microorganismes résistant aux radiations ionisantes. *Int. J. of Appl. Radiat. and Isotopes*, 1963, **14**, 29.
- [7] DUPUY (P.) et MOCQUOT (G.). Développement de Lactobacillus dans le lait irradié. *Int. J. of Appl. Radiat. and Isotopes*, 1964, **15**, 255.
- [8] FABRE (R.), CHEYMOL (J.), MAGUIER DE LA SOURCE (B.). Sur le contrôle des préparations thérapeutiques à base de ferments lactiques en vue de leur autorisation. *Ann. Pharm. Fr.*, 1953, **11**, 17.
- [9] GASSER (F.). Identification des Lactobacillus fécaux. *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, **106**, 778.
- [10] SEELIGER (H. P. R.) et WERNER (H.). Recherches qualitatives et quantitatives sur la flore intestinale de l'homme. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, **105** (5), 911.
- [11] SHARPE (F.). Toxinomie des Lactobacillus. *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 1961, 133.