

## Chapitre 5

# RECHERCHES SUR LE BACTÉRIOPHAGE

---

### Premières observations

Les publications sur le rôle du bactériophage dans le choléra, plutôt rares durant les dix années qui suivirent la découverte de la bactériophagie par Twort (1915) et par d'Hérelle (1917), furent abondantes plus tard.

D'Hérelle lui-même (1922; voir aussi d'Hérelle, Malone & Lahiri, 1930), en rapportant ses premières observations sur ce sujet, déclarait:

« Parmi une centaine de cas de choléra étudiés en Indochine, on n'a pu en observer qu'un seul se terminant par la guérison. Dans ce dernier cas, malgré des examens de selles quotidiens, on n'a trouvé un bactériophage actif sur le vibron que dans un seul échantillon de fèces prélevé au début de la convalescence. Ce phage a donné environ 50 plages par ensemencement sur gélose. En dépit de nombreuses tentatives, il a été impossible de le cultiver par repiquages. Aucun des cas mortels n'a fourni de bactériophage. » [Trad.]

Après ces observations, faites en 1920, d'Hérelle (1923) poursuivit ses recherches sur les selles cholériques; il put alors démontrer régulièrement, la présence d'un principe lytique dans les fèces des cholériques par

*a*) incubation, pendant 12 heures à 37°C, de dilutions en bouillon ou de suspensions des fèces; *b*) filtration des liquides, d'abord sur terre d'infusoires, puis sur bougies, et *c*) après addition de vibrions cholériques, cultivés sur gélose, pour obtenir une concentration de 100 millions de germes par ml, incubation des mélanges à 37°C pendant 12-18 heures, temps après lequel on constatait la dissolution des vibrions.

Le principe lytique se manifesta dans les fèces cholériques 3-4 jours après le début de la maladie; il persista jusqu'à la mort des malades, et, dans le cas de l'unique convalescent examiné, jusqu'à la fin d'une période d'observation d'environ deux semaines. De même, dans le seul cas concernant un individu vacciné contre le choléra, le principe lytique s'était manifesté quatre jours après la première injection, pour disparaître deux semaines après l'administration de la seconde dose de vaccin injectée 8 jours après la première.

D'Hérelle était convaincu que les phénomènes précités ne provenaient pas de l'action du bactériophage, parce que: 1) contrairement à ce qu'on avait observé dans le dernier cas, il n'y avait pas de relation strictement

quantitative entre la concentration des filtrats et la quantité de vibrions cholériques par ml qu'ils pouvaient lyser: les filtrats dilués à 50% ne lysaient que 20-25 millions de germes par ml, et à la dilution de 10% ils n'exerçaient aucune action, même sur de faibles ensemencements; 2) la transmission en série s'avérait impossible; et 3) la formation des plages caractéristiques ne se produisait pas lorsqu'on étalait sur des plaques de gélose des vibrions cholériques en suspension dans des filtrats de selles actifs. En conséquence, d'Hérelle était porté à attribuer la vibriolyse, qu'il observait, à l'action d'un ferment (« diastasique ») bactériolytique.

Il n'est pas sans intérêt de noter qu'une affirmation semblable fut faite, ultérieurement, par Bernard & Guillermin (1933a) qui déclarèrent avoir obtenu — par une technique convenant à l'extraction des diastases et à partir de cultures en bouillon de *V. cholerae* ne contenant pas de bactériophage — une substance dotée d'un pouvoir lytique transmissible. Ainsi que ces deux chercheurs l'ont indiqué dans une seconde note (1933b), cette substance avait « les caractères d'un activateur de la diastase qui, dans les cultures normales, produit une autolyse des vibrions ». Cependant, même si l'on admet la validité de ce fait, ces observations ne sauraient infirmer la thèse, généralement admise parce que pleinement confirmée, de la nature virale des bactériophages.

Les observations de d'Hérelle (1920), témoignant de l'intervention d'une bactériophagie réelle dans le cas du choléra, trouvèrent leur première confirmation dans un travail de Jötten (1922) qui put démontrer un exemple d'activité spécifique du phage dans un filtrat provenant d'une souche cholérique de collection. Par contre, Flu (1923) obtint des résultats entièrement négatifs avec les filtrats de 13 souches cholériques repiqués chaque mois après avoir été isolées sept ans auparavant à Java.

De même, Ciuca (1923) constata que des filtrats provenant de selles de cinq cholériques (dont quatre guérissent) n'étaient actifs que sur les bacilles dysentériques et *E. coli*, mais pas sur les 17 souches de *V. cholerae* qu'ils avaient éprouvées. Petrovanu (1924a) déclare cependant que Ciuca et lui-même avaient pu, par la suite, mettre en évidence une légère action lytique des filtrats de selles cholériques sur des souches hétérologues de *V. cholerae* qui ne provenaient pas directement des malades.

Meissner (1924), en faisant des réactions de Pfeiffer « incomplètes » par injection dans le péritoine des cobayes de doses létales de *V. cholerae* et de petites quantités d'immunsérum cholérique, trouva que les filtrats de l'exsudat péritonéal de ces animaux faisaient preuve d'une activité bactériophagique typique qui était transmissible en série. Comme elle travaillait, manifestement, avec du matériel contaminé par le phage, elle obtint des résultats identiques avec les exsudats péritonéaux de cobayes qui n'avaient reçu dans le péritoine que du bouillon nutritif.

En contraste avec les observations de Meissner, Petrovanu, (1924a) fut dans l'impossibilité de démontrer une action lytique de l'exsudat

péritonéal de lapins inoculés dans le péritoine avec des doses létales ou non létales de *V. cholerae*. Toutefois, Petrovanu (1924 b) constata que les filtrats des eaux de lavage de broyat d'intestin grêle de lapins vaccinés contre le choléra, exerçaient une action bactériophagique typique sur les microbes récemment isolés du sang du cœur des lapins infectés de choléra, bien qu'ils fussent sans effet sur aucune des souches de collection employées pour l'immunisation de ces animaux. En notant ces résultats, et d'autres tout aussi discordants qu'il obtint avec des filtrats et des vibrions cholériques de différente origine, Petrovanu soutint que ces microbes pouvaient, évidemment, subir des variations, quelquefois même des changements rapides, dans leur comportement vis-à-vis des bactériophages.

Flu (1924, 1925) a fait une étude de valeur sur la sensibilité et la résistance des vibrions cholériques à l'action du bactériophage. Ainsi que le résume parfaitement le *Tropical Diseases Bulletin* (1926), la thèse de ce chercheur était

« que les souches résistantes à la bactériophagie, non seulement sont, ou peuvent être, résistantes, mais encore peuvent par leur croissance, en bouillon notamment, déterminer une diminution constante de la puissance de tout bactériophage éventuellement présent; naturellement, on ne réussit pas à transporter le bactériophage par repiquage si les souches résistantes prennent le dessus et font disparaître ou inactivent ce principe lytique.

» De cette idée de l'auteur découlent un certain nombre de propositions:

» 1) Une souche lysogène tuée ou associée à une jeune culture d'une souche lysosensible fournit souvent un bactériophage puissant.

» 2) Les souches lysogènes cultivées en bouillon produisent souvent des souches résistantes dont le temps d'incubation est prolongé.

» 3) Les souches résistantes au bactériophage déterminent par leur culture la disparition de tout bactériophage présent. » [Trad.]

D'après Flu, ces considérations expliquent, d'une part, pourquoi d'Hérelle, soumettant ses cultures à une incubation trop longue, n'a pu le plus souvent mettre en évidence le bactériophage cholérique, et d'autre part, pourquoi Meissner, qui sûrement travaillait avec une souche particulièrement lysogène, obtenait des résultats positifs même dans les épreuves pratiquées avec l'exsudat péritonéal de cobayes normaux.

Flu trouva donc légitime, pour les raisons précitées, d'utiliser à nouveau dix des souches cholériques qui avaient donné des résultats négatifs dans ses tests du bactériophage en 1923. Il adopta, à cet effet, la technique suivante:

« Pour chacune de ces souches, on a mis en suspension, dans 3 ml de bouillon ou d'eau physiologique, la culture bien développée de quatre géloses inclinées, et l'on a mélangé cette suspension avec la quantité de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhydre suffisante pour former une masse solide. Après avoir broyé soigneusement celle-ci dans un mortier, on a émulsionné la poudre dans 100 ml de bouillon qu'on a chauffés ensuite à 58°C pendant une heure. Après refroidissement, on a distribué ce bouillon dans dix flacons contenant chacun 100 ml de bouillon. Chaque flacon a été ensemencé avec une des souches cholériques à éprouver. On a ainsi obtenu dix séries tests, de dix flacons chacune.

» Après deux semaines d'incubation, on a chauffé pendant 1 heure à 58°C quelques ml prélevés dans chaque flacon, et on s'est servi de quantités de 0,1 ml de ces liquides pour les tests du bactériophage avec chaque souche cholérique soumise à l'examen. » [Trad.]

Les tests pratiqués suivant la technique que nous venons de décrire montrèrent, d'une part, qu'une souche seulement, parmi les dix examinées, était nettement lysogène, c'est-à-dire capable d'exercer une action lytique sur les souches sensibles au phage, et d'autre part, que les neuf souches restantes n'étaient pas toutes sensibles à la lyse. En fait, comme l'établit Flu,

« On ne trouva que trois (de ces) souches qui donnaient la lyse en toutes circonstances et qui montraient une formation de plages sur les plaques ou les tubes inclinés; elles seules, parmi 20 souches de ma collection, étaient utilisables pour la culture en série du bactériophage. » [Trad.]

La souche fortement lysogène n'était pas seulement lyso-résistante au bactériophage qui en provenait, mais elle était aussi capable d'inhiber l'action du phage en milieux liquides et d'amener, après des repiquages répétés en ces milieux, la disparition totale du bactériophage.

Bien qu'il n'ait pu démontrer la présence du bactériophage cholérique en se servant des techniques de Jötten, de Meissner ou de Petrovanu, Nobechi (1926 a) trouva efficace la méthode recommandée par Flu. Nobechi déclara, toutefois, qu'il avait obtenu des résultats au moins aussi bons en filtrant simplement les cultures en bouillon contenant du bactériophage.

En faisant des tests croisés avec 18 souches de *V. cholerae* sur le bactériophage et le filtrat de leur culture sur bouillon, Nobechi en trouva 3 résistantes au phage et lysogènes, tandis qu'un deuxième groupe de 6 souches s'avéraient résistantes mais non lysogènes, et un troisième comprenait des vibriions lyso-sensibles et non lysogènes. Il nota que la clarification des cultures en bouillon des souches lyso-sensibles, sous l'influence du bactériophage, se manifestait après 3 heures pour atteindre son maximum au bout de 4-5 heures. On devait donc observer les tubes dès le commencement de l'épreuve, parce que, en cas d'examen tardif, une culture secondaire rapide pouvait masquer la présence du bactériophage. Nobechi recommanda aussi de faire les repiquages pendant la phase de la lyse maximum.

Nobechi (1926 b) constata, en étudiant les mutations de *V. cholerae* sous l'influence du bactériophage, que celles-ci n'avaient pas un caractère permanent: la réversion au type se manifestait après quelques passages en milieu de bouillon contenant du phage, et les souches en question devenaient en même temps résistantes à l'action du bactériophage, non lysogènes et aussi auto-agglutinables. Cependant, on n'observait plus l'agglutination spontanée lorsqu'on repiquait ces souches sur gélose.

Nobechi trouva, en outre, que l'injection dans le péritoine des cobayes de 0,3-0,5 ml de culture de bactériophage protégeait les animaux contre une inoculation intrapéritonéale d'épreuve de 3-10 DLM de *V. cholerae*, avec manifestation chez eux du phénomène de Pfeiffer. L'administration du bactériophage par voies orale, sous-cutanée ou intraveineuse, ne proté-

geait généralement pas les animaux contre l'inoculation d'épreuve. Les filtrats des cultures lysogènes ou non lysogènes n'avaient aussi qu'un faible pouvoir protecteur. Les injections intraveineuses de bactériophage ne firent pas disparaître les microbes de la vésicule biliaire des animaux d'expérience qui étaient devenus porteurs de *V. cholerae*.

Dans son ouvrage *Le bactériophage et son comportement*, d'Hérelle (1926), tout en mentionnant ses propres expériences antérieures et celles de quelques travailleurs cités plus haut, rapporte une seule observation qu'il avait faite plus récemment :

« En 1924, lors du passage des pèlerins revenant de La Mecque, pendant leur quarantaine au lazaret de Tor, j'ai isolé des déjections d'un pèlerin (qui ne présentait d'ailleurs aucun symptôme de choléra)... un vibron agglutinant aux taux limite sous l'action d'un sérum anticholérique. Gardé au lazaret, les déjections de ce pèlerin ont été examinées chaque 48 heures : lors de l'examen suivant, un vibron non-agglutinant a été isolé, tout vibron avait disparu 48 heures plus tard.

» Or le vibron agglutinant était bactériophagé d'une manière parfaite par le bactériophage de Flu, celui non-agglutinant isolé 48 heures après était réfractaire. A ce moment les déjections renfermaient un bactériophage d'une virulence assez forte pour le vibron agglutinable. »

Si intéressante que soit cette observation, l'information fournie par d'Hérelle est trop pauvre pour montrer si le vibron « inagglutinable » trouvé après la disparition des microbes spécifiquement agglutinables était un vibron cholérique R. Il est donc parfaitement possible que l'apparition, dans les selles du pèlerin, de vibrions non spécifiquement agglutinables soit accidentelle.

Pour compléter cette revue nous devons mentionner à nouveau l'observation de Van Loghem (1926) — citée dans le chapitre précédent — d'après laquelle l'action du bactériophage accélérerait la libération de l'endohémolysine de *V. cholerae*.

### Recherches ultérieures

Une nouvelle époque dans l'histoire du sujet que nous passons en revue a débuté en l'année 1927, lorsque d'Hérelle et ses collaborateurs (voir d'Hérelle & Malone, 1927) et aussi Morison (voir Morison & Vardon, 1929) entreprirent dans l'Inde des recherches de grande envergure sur la bactériophagie du choléra, sous les auspices de l'Indian Research Fund Association. Tandis que, comme nous le décrivons ci-dessous, Morison et ses collègues continuaient à apporter leurs importantes contributions à la connaissance des bactériophages cholériques et à leur rôle dans la prévention et la thérapeutique de la maladie, le travail de d'Hérelle fut repris en 1928 par Asheshov (voir Asheshov et al., 1930) qui publia le rapport final de ses expériences et de celles de son équipe en 1933 (voir Asheshov et al., 1933).

Les principaux résultats que ces chercheurs et certains autres ont obtenus, en travaillant dans l'Inde ou ailleurs, seront discutés dans les paragraphes suivants, pour autant qu'ils entrent dans le cadre de la présente dissertation.

*Types de bactériophages cholériques*

Dans leur rapport final (II<sup>e</sup> partie) Asheshov et al. (1933 b) ont ainsi décrit les propriétés de trois bactériophages cholériques qu'ils avaient découverts dans leur travail antérieur (Asheshov et al., 1930), et de deux autres phages trouvés par Pasricha, De Monte & Gupta (1932 a).

» Ch $\varphi$ A (c'est-à-dire le cholérophage A) est un bactériophage d'action rapide: sa meilleure variété peut produire une lyse totale des vibrions en moins de deux heures. Sa période de génération est comprise entre 45 minutes et 1 heure 15 minutes environ.

» La lyse n'est jamais permanente; elle est rapidement suivie d'une abondante culture secondaire résistante à tous les bactériophages du type A. Elle n'attaque que les éléments S de la culture, sans toucher les éléments R. Les membres de ce groupe sont très variables en activité, portée, virulence et stabilité. La virulence peut être exaltée, en particulier si le bactériophage vient d'être isolé. Mais la majorité des Ch $\varphi$ A d'isolement récent sont très instables. Ils meurent en très peu de temps, parfois en quelques jours, à moins qu'on ne les adapte aux conditions du laboratoire par de fréquents repiquages. L'étendue de la virulence de certaines variétés de ce type se restreint souvent à un petit nombre de souches de vibrions, mais il est relativement facile de les adapter à la lyse d'autres souches de vibrions cholériques lisses. Elles n'attaquent pas les vibrions non-agglutinables même lorsqu'ils sont lisses.

» Ch $\varphi$ B. La période de génération de ce bactériophage sur une culture S-R est généralement de 1 heure 15 minutes à 1 heure 45 minutes, et l'action lytique, même de son type le plus actif, est considérablement plus lente que celle de Ch $\varphi$ A. La lyse se produit rarement en moins de trois heures. Elle n'est pas non plus permanente, et elle est suivie d'une culture secondaire qui se manifeste plus tard que celle du type A. D'autre part, Ch $\varphi$ B est beaucoup plus stable que Ch $\varphi$ A. L'étendue de sa virulence est très large... Ch $\varphi$ B agit à la fois sur les éléments lisses et rugueux, et attaque aussi certains vibrions inagglutinables.

» Ch $\varphi$ C est un bactériophage cultivant lentement, avec un temps de génération de 2 heures à 2 heures 30 minutes. Il ne produit une lyse appréciable qu'avec les cultures R, et même rarement totale; la lyse est suivie de l'habituelle culture secondaire. Ch $\varphi$ C agit mieux à la surface de la gélose qu'en bouillon. La gamme d'action de ce type est très vaste: nous n'avons pas rencontré encore de souches de vibrions cholériques qui ne soit pas lysée par notre Ch $\varphi$ C. Il attaque également de nombreux vibrions non-agglutinables.

» Ch $\varphi$ D (Pasricha). Le temps de génération de ce bactériophage... est de 1 heure 20 minutes-1 heure 30 minutes sur une souche lisse et de 1 heure 30 minutes sur une souche rugueuse. L'action lytique est plus lente que celle de Ch $\varphi$ B, mais plus rapide que celle de Ch $\varphi$ C; il donne une lyse partielle en cinq heures environ... La gamme de l'activité et la stabilité de ce bactériophage n'ont pas encore été suffisamment étudiées.<sup>1</sup>

» Ch $\varphi$ E (Pasricha). Un bactériophage d'activité très ralentie, à période de génération de 1 heure 40-1 heure 50 minutes sur une culture rugueuse, qui paraît n'agir que sur les éléments R. L'action lytique est très lente mais plus prononcée que celle de Ch $\varphi$ C: la lyse de la culture rugueuse est plus complète que celle produite par Ch $\varphi$ C et la culture secondaire se produit difficilement. » [Trad.]

Morison (1932), Rao (1932) et White (1936 b, 1937) ont fourni d'importants renseignements supplémentaires sur ces choléraphages et en particulier sur les trois premiers types.

Morison (1932) a déclaré que les vibrions cholériques, rendus résistants au cholérophage du type A, acquéraient généralement, mais pas toujours,

<sup>1</sup> D'après Pasricha, De Monte & Gupta (1932 a), le cholérophage D a une gamme d'activité plus étendue que tout autre phage cholérique.

le caractère rugueux. Il a aussi attiré l'attention sur le fait que, si les souches isolées chez les malades avaient habituellement le caractère lisse, les lots de vibrions trouvés à Calcutta à la fin d'une épidémie étaient le plus souvent rugueux et, en même temps, résistants au cholérophage A. Cependant, tout en admettant que ces constatations s'accordaient avec celles de d'Hérelle (1926), Morison déclarait qu'il n'était « pas encore à même de discuter l'affirmation selon laquelle les souches résistantes sont avirulentes ».

Selon Morison, les souches devenues rugueuses et résistantes aux choléraphages de type A prenaient, semblait-il, le caractère lisse si elles acquéraient la résistance aux phages B et C. Ainsi les choléraphages A paraissent induire la formation de souches rugueuses et les facteurs B et C celle de souches lisses.

Rao (1932) qui a étudié les rapports existant entre l'action des choléraphages et la réaction des milieux utilisés pour leur culture, en a conclu que :

« Dans les limites des conditions optimales, la lyse des bactériophages cholériques du type A est exaltée par une acidité croissante, et celle du type B par un accroissement de l'alcalinité. » [Trad.]

Rao soutenait donc, à très juste titre, que des différences dans la réaction des milieux employés pouvaient intervenir dans les résultats variables que l'on obtient dans les études sur le bactériophage cholérique.

White (1936 b) a souligné que le cholérophage A exerçait son action lytique exclusivement sur les souches cholériques classiques et sur les souches El Tor. En conséquence, les réactions positives obtenues avec ces souches étaient importantes pour le diagnostic; mais il fit remarquer que certains phages du type A n'attaquaient pas les souches de *V. cholerae* du type Inaba. Autre fait marquant: parmi les choléraphages connus de White, les phages du type A lysaient uniquement les formes S des vibrions qui leur étaient sensibles, mais pas les variétés R isolées des souches lisses sans l'intervention du bactériophage. Une observation analogue à la précédente montra que les cultures secondaires résultant de l'action des choléraphages A étaient « essentiellement, sinon totalement, rugueuses ».

En poursuivant l'étude de deux choléraphages A provenant respectivement de Morison et d'Asheshov, White (1937) constata que ces deux phages attaquaient toutes les souches du type Ogawa, quelle que soit leur origine géographique. Les souches Inaba de l'Inde étaient lysées par le phage A d'Asheshov mais non par celui de Morison. On ne pouvait cultiver aucun de ces phages, pas plus en eau peptonée que sur gélose, en présence des souches cholériques chinoises ou japonaises dont disposait White, à moins que l'activité de ces principes lytiques ne fût exaltée par l'addition de blanc d'œuf (lysozyme) aux cultures en question.

Quant à la découverte d'autres choléraphages que ceux que nous venons d'énumérer, nous signalerons d'abord que Pasricha, De Monte & Gupta (1932 b), en trouvant un bactériophage — primitivement isolé sur un vibron

pseudo-cholérique — capable d'attaquer les cultures secondaires résultant de l'action des cholérages déjà connus, avaient classé ce nouveau type comme cholérage « F ». En outre, ainsi que le précisent Pasricha et al. (1936): 1) Morison (1933; voir aussi une note préliminaire de cet auteur publiée en 1932) rapporta l'isolement de trois nouveaux types de cholérages « G », « H » et « J »; 2) Pasricha (1933) découvrit un type « K » actif sur les seuls vibrions rugueux; 3) un type « L » fut signalé en 1935 par Asheshov; et 4) on a isolé plus récemment un phage « M » d'une souche de vibron inagglutinable par le sérum anticholérique et dont la culture provenait des fèces d'un malade atteint de choléra. Pasricha et ses collègues (1936) ont noté que ce phage, bien que d'action lente, avait une activité très étendue: il lysait quelques vibrions pseudo-cholériques comme la plupart des souches cholériques.

Endiscutant ces observations, ces auteurs (1936) ont souligné que, parmi les cholérages connus jusqu'alors, seul le phage A restreignait son champ d'action aux vibrions agglutinables par l'immunsérum cholérique, et agissait en outre exclusivement sur les microbes possédant à un degré considérable le caractère lisse. Le cholérage A était aussi, du point de vue immunologique, d'une classe particulière, parce que ses antisérums inhibaient seulement l'action du phage homologue, tandis que les autres cholérages présentaient entre eux des relations sérologiques.

White (1937) a déclaré qu'il se proposait de poursuivre son travail sur le cholérage L. Toutefois, il perdit la souche isolée à l'origine par Asheshov de l'eau d'égout à Calcutta; une seconde souche étiquetée L, reçue par la suite, se montra incapable de lyser les souches cholériques attaquées par le phage L original. En conséquence, White trouva judicieux de dénommer phage « LL » la seconde souche dont il disposait, montrant par là qu'elle était probablement distincte du type original. En résumant ses expériences avec cette deuxième souche, White indique que le phage LL

« est peut-être celui que l'on rencontre le plus fréquemment parmi les cholérages indiens. La majorité, au moins, des cultures de *V. cholerae* provenant de l'Inde sont LL-lysogènes. D'autre part, les souches cholériques chinoises et japonaises examinées jusqu'ici se sont montrées dénuées de LL et LL-sensibles. On a constaté que tous les *V. cholerae* examinés étaient soit infectés, soit sensibles au phage LL, tandis qu'on n'a pu déceler aucune de ces conditions chez les vibrions El Tor ni chez d'autres vibrions. » [Trad.]

Si, comme nous le verrons plus loin, le phage LL ne se limite pas tout à fait à la distribution géographique que supposait White, il est intéressant que ce chercheur ait noté que le phage limitait son action au *V. cholerae* classique.

Un autre fait intéressant établi par White fut que l'on pouvait exalter l'action lytique faible du phage LL par l'addition de lysozyme (c'est-à-dire du blanc d'œuf à la concentration de 1/25) aux milieux de culture. Nous avons déjà mentionné que White avait également constaté que deux choléra-

phages du type A qui ne pouvaient se multiplier sur les souches Inaba d'Extrême-Orient, malgré leur affinité spécifique pour les polyosides de ces souches, attaquaient fortement les microbes en question en présence du lysozyme du blanc d'œuf. En l'absence de cette affinité, le lysozyme était incapable de déclencher la bactériophagie. De l'avis de White, cette observation étayait la thèse d'après laquelle « le pouvoir de combinaison du bactériophage est nettement distinct de ses activités lytiques ».

Ce point de vue s'accordait apparemment avec l'observation de White d'après laquelle, malgré l'absence de bactériophagie chez des variétés *rugueuses* de *V. cholerae* indemnes de LL, exposées, sur gélose, à l'action de ce phage, celui-ci pouvait se multiplier indéfiniment sur les cultures R qui, tout comme les cultures lisses, devenaient lysogènes. Il ajoutait que

« Le cholérophage LL est fixé et inactivé par les polyosides du *V. cholerae* S, R et  $\rho$ , et il a probablement une affinité spécifique pour la substance que j'ai dénommée C $\gamma$  (White, 1936[a]). » [Trad.]

En poursuivant le travail sur le phage LL, Pasricha, Lahiri & De Monte (1941) établirent que *a*) les cultures secondaires obtenues après l'action de ce phage étaient lysables par les 12 autres types de cholérages (A  $\rightarrow$  M), tandis que *b*) réciproquement, le phage LL agissait sur les cultures secondaires résultant de l'action de chacun des autres types de cholérages. L'hypothèse de White d'après laquelle le phage LL était un type nouveau étant ainsi confirmée, Pasricha et ses collègues ont proposé de lui donner le nom de cholérage « N ».

Comme le cholérage A, le type N n'exerçait aucune action sur les vibrions pseudo-cholériques. On ne put le mettre en évidence que dans 3 souches parmi 115 vibrions cholériques d'isolement récent, mais il faut noter que toutes ces souches avaient été isolées, en un court laps de temps, dans une seule et même localité. On obtint des résultats positifs avec toutes les souches indiennes de collection et aussi, contrairement aux expériences de White, avec quelques souches de Hong-Kong: trois de celles-ci fournirent le phage N, tandis qu'une quatrième se montrait résistante et la cinquième sensible à l'action de ce phage. Pasricha et ses collègues confirmèrent les observations de White en trouvant que le lysozyme du blanc d'œuf était un excellent moyen de propagation du phage N, mais ils obtinrent aussi des résultats satisfaisants avec la gélose solide ou molle.

Dans leur article décrivant les cholérages des types D et E, Pasricha, De Monte & Gupta (1932 a) déclaraient aussi qu'ils avaient isolé de l'eau du fleuve Hooghly un phage « W », capable de lyser nombre de souches pseudo-cholériques. Bien que celles-ci se fussent montrées résistantes à l'action des cholérages A  $\rightarrow$  C, les cultures secondaires apparues après l'action du phage W se montrèrent lysables par les cholérages.

Pasricha et ses collègues (1932 b) rapportèrent ensuite l'isolement de 8 (ou plutôt de 9 si l'on en croit leurs protocoles) souches de *vibriophages*,

actifs sur les souches pseudo-cholériques que ne lysaient pas les choléraphages. Après des passages répétés sur leurs vibrions respectifs, 5 de ces phages acquirent la propriété de lyser les vibrions cholériques. Cependant, comme le déclaraient les mêmes auteurs en 1936, ces vibriophages « bien qu'actifs sur les vibrions agglutinables (c'est-à-dire cholériques) ne donnaient pas le test croisé réciproque ».

Si l'on en juge par une brève remarque faite en 1934 par Russell (1935), on avait isolé dans l'Inde, à cette date, plus de 30 variétés différentes de vibriophages.

En étudiant l'incidence saisonnière des choléraphages à Calcutta, Pasricha et ses collègues (1931 a) constatent que :

« a) Dans la nature, les choléraphages varient avec l'incidence de la maladie. Il est rare d'isoler des choléraphages des eaux pendant la saison où ne règne pas le choléra.

» b) Le taux de mortalité qui est élevé au début de la saison du choléra, tombe rapidement lorsque les choléraphages sont largement disséminés dans la nature. Selon toute apparence, la poussée des bactériophages joue un rôle très important dans l'abaissement de la mortalité et dans l'extinction d'une épidémie.

» c) Les choléraphages sont, dans la nature, du type à action rapide A, et les témoignages produits suggèrent que les types B et C meurent dans les conditions naturelles.» [Trad.]

Ces conclusions s'accordent avec les hypothèses de d'Hérelle et ses collaborateurs auxquelles nous nous référerons plus loin dans ce chapitre. Elles s'opposent, cependant, curieusement à l'opinion contraire de Morison (1935), pour qui les choléraphages A, à la différence des autres types de phages et bien qu'on les rencontre fréquemment chez les malades, « pourraient n'avoir que peu d'action sur le pouvoir pathogène ou la virulence » de *V. cholerae*.

#### *Fixation et inhibition des choléraphages*

White (1936 b) a fait remarquer que les observations de plusieurs chercheurs sur des espèces bactériennes autres que les vibrions avaient démontré que les extraits spécifiques isolés des microbes en question avaient le pouvoir de fixer et d'inactiver les bactériophages individuels. Il pratiqua donc les tests correspondants avec les substances extraites des vibrions et avec les choléraphages des types A à J. White put ainsi montrer que :

1) le phage du type A était inactivé sélectivement par le polyside spécifique S des vibrions cholériques et El Tor;

2) les polysides dérivés des vibrions pseudo-cholériques aussi bien que ceux des variétés R et  $\rho$  de *V. cholerae* n'exerçaient pas d'action inhibitrice sur le choléraphage du type A;

3) les constituants « lipoides » des vibrions cholériques, obtenus par extraction alcoolique, tout en ne contrariant pas, dans des tests pratiqués d'une manière convenable, l'action du choléraphage A (pas plus que celle du type D), inhibaient spécifiquement les phages des types C, E, G et H, tandis que ces substances n'inhibaient pas toujours le phage du type B.

White conclut de ces observations que, sans égard à la nature de l'inhibiteur spécifique des phages, polyside ou lipide, « dans les deux cas la résistance de la culture secondaire est probablement due à la perte d'une substance sensible plutôt qu'à quelque modification positive ou à l'immunité ».

Pandit, Maitra & Datta Roy (1936), qui ont fait aussi une des premières études du problème que nous passons présentement en revue, ont employé la technique suivante pour préparer des extraits du vibrion cholérique et d'autres vibrions :

« On cultive les microbes en boîtes de Roux pendant 48 heures. On lave la culture de chaque boîte et on la met en suspension dans 10 cc d'eau distillée. Les suspensions sont placées au bain-marie à 55°C pendant 72 heures. On les dilue alors par addition de deux volumes d'eau distillée, et on les fait passer sur filtre Seitz. » [Trad.]

Pandit et ses collaborateurs ont testé par cette technique les inhibitions produites sur les cholérages A → K par les extraits de 17 souches de vibrions cholériques, El Tor et pseudo-cholériques. Ils ont trouvé que les phages des types C et G n'étaient inhibés par aucun extrait, et que d'autre part, les extraits de deux souches de vibrions pseudo-cholériques, aussi bien que celui de la seule souche El Tor à leur disposition, ne supprimaient l'action d'aucun des bactériophages précités.

Il ne parut pas qu'il existât de corrélation nette entre l'inhibition des types de phages et la résistance des souches aux phages en question; mais on constata que la résistance à plusieurs types s'accompagnait d'une diminution dans le nombre des types inhibés. On nota un parallélisme entre les types de phages inhibés par les extraits des souches et le contenu polysidique des microbes en question, en accord avec la classification de Linton et ses collaborateurs que nous avons mentionnée précédemment.

Maitra (1939) poursuit le travail décrit ci-dessus en combinant les tests d'inhibition des phages (types A → L) et les réactions des précipitines, pratiquées avec les antisérums de souches appartenant à différents groupes, suivant le type du phage inhibé et la composition en polyside des vibrions. Il trouva que, d'après les résultats fournis par ces tests combinés, on pouvait diviser ces microbes en deux groupes : l'un comprenant des vibrions cholériques lisses typiques et des vibrions El Tor *sensu stricto*, l'autre, hétérogène, renfermant des vibrions cholériques atypiques, notamment des souches rugueuses, et des vibrions pseudo-cholériques. S'opposant aux déclarations de Pandit et ses collègues, Maitra conclut :

« L'inhibition et la réaction des précipitines semblent dépendre l'une et l'autre d'un facteur commun qui s'apparente à l'antigène complexe polysidique du vibrion cholérique, mais n'a pas de rapport direct avec le type ou la qualité du polyside chimiquement défini par Linton. » [Trad.]

Doorenbos & Cossery (1950) ont exposé dans une note préliminaire qu'un sérum de lapin anti-cholérage B possédait, outre des propriétés

agglutinantes faibles (titre 1/300), un pouvoir inhibiteur sur l'activité de ce phage à des dilutions de 1/1000, après une incubation de 4 heures.

#### *Action des cholérages sur les vibrions El Tor*

Bien que nous ayons mentionné à plusieurs reprises, au cours de cette étude, le comportement des vibrions El Tor sous l'action des cholérages, il nous paraît nécessaire de traiter séparément les observations faites par Jadin (1936) sur ce sujet.

En pratiquant des tests comparatifs avec un bactériophage cholérique, Jadin constata que ce principe lytique était plus actif sur les vibrions cholériques classiques que sur les vibrions El Tor: les premiers microbes subissaient une lyse totale lorsqu'il employait le phage à une dilution de  $10^{-8}$ , et même à la dilution de  $10^{-10}$  après des cultures mixtes répétées pendant plusieurs mois; les vibrions El Tor, bien que partiellement lysés aux dilutions de bactériophage de  $10^{-5}$ , ne l'étaient totalement qu'aux dilutions de  $10^{-8}$ . Le repiquage du phage sur les vibrions cholériques n'augmentait pas son pouvoir lytique pour *V. El Tor*; la subculture du phage sur ce dernier microbe ne diminuait pas sa puissance vis-à-vis de *V. cholerae*.

Le chauffage des dilutions du bactériophage pendant une demi-heure à  $64^{\circ}\text{C}$  ne détruisait par leur action lytique pour les vibrions cholériques mais ces dilutions ainsi chauffées ne produisaient plus aucune lyse des vibrions El Tor. On pouvait, toutefois, rendre à ces dilutions du phage leur activité pour *V. El Tor* en les exposant plusieurs fois à la température de  $75^{\circ}\text{C}$ .

Un immunsérum d'un bactériophage actif sur les vibrions cholériques mais inactif sur *V. El Tor* se montrait inhibiteur de l'action des bactériophages non chauffés sur ces derniers microbes, mais diminuait seulement l'action lytique sur *V. cholerae*. Ce sérum inhibait totalement l'action des cholérages chauffés à  $65^{\circ}\text{C}$ .

On établit, par la suite, que des repiquages répétés d'une souche El Tor contaminée par du bactériophage dilué à  $10^{-8}$  rendait ce dernier capable de lyser les vibrions El Tor, apparemment parce qu'il s'était produit, au cours de ces subcultures, une multiplication des phages.

Jadin tira, de ces observations, la conclusion que le comportement différent des cholérages vis-à-vis du vibron cholérique et du vibron El Tor, respectivement, résultait des différences dans la lyso-sensibilité de ces deux microbes, et non de la présence distincte dans le phage d'un facteur anticholérique et d'un facteur anti-El Tor.

#### *Variations du vibron sous l'influence du bactériophage*

En rapportant les études qu'ils avaient faites dans l'Inde, d'Hérelle, Malone & Lahiri (1930; voir aussi d'Hérelle, 1930) ont déclaré que les vibrions subissaient, sous l'influence du bactériophage, des variations

profondes: ils pouvaient perdre éventuellement leur mobilité; leur morphologie changeait avec l'apparition de formes bacillaires et finalement coccoïdes; les réactions produites par les vibrions dans les milieux contenant des glucides se modifiaient, et on enregistrerait une perte de la propriété de réduction des nitrates. Plus important encore, l'action du bactériophage se traduisait par un défaut d'agglutinabilité spécifique par les immunsérums cholériques et aussi une perte de virulence.

En commentant leurs constatations faites à ce sujet avec les fèces des cholériques, d'Hérelle et ses collègues exposaient qu'il devait être « hors de discussion » que ces variations dans les propriétés des microbes, qu'on avait observées également sous l'action du bactériophage *in vitro*, « constituent des mutations réelles du vibron cholérique typique ». Ils soutenaient, à ce sujet, que:

« Quand la perte ou la modification d'un caractère *est le résultat d'une mutation*, ce caractère ne saurait apparemment être récupéré. La mutation semble être définitive, et le retour à la forme originale impossible, contrairement à ce qui se produit lorsque la perte du caractère est simplement le résultat d'une 'désuétude' ».

» En un mot, si on met un bactériophage puissant en contact avec des vibrions cholériques, ceux-ci sont parasités puis détruits rapidement et définitivement. Si le bactériophage qui les attaque est moins puissant, un certain nombre de vibrions résistent mais *contractent une maladie chronique*, transmissible à leur descendance, qui a pour effet de modifier, plus ou moins, leurs caractères. » [Trad.]

Les conclusions à longue portée que d'Hérelle et ses collègues ont tirées des observations précitées et d'autres connexes retiendront notre attention plus loin; nous nous attacherons, dans le présent chapitre, aux relations d'autres chercheurs:

Finkelstein (1931) a signalé des observations inédites d'après lesquelles les cultures lyso-résistantes, qui apparaissent après l'action du choléra-phage, se répartissent en deux types quant à leur agglutinabilité: l'un montrant une agglutination granulaire, l'autre une agglutination en gros flocons. Cette dissociation, qui semble être stable, s'accompagne d'une perte de la mobilité des microbes.

En testant deux souches cholériques par un phage choléra-dysenterie, Chen (1932) nota l'apparition successive de variants de trois types cultureux; deux d'entre eux montraient des signes indiquant la rugosité (R): production d'une culture granulaire par repiquage en bouillon, et auto-agglutination en suspension en eau physiologique. Il constata que la mobilité avait disparu chez un de ces variants et aussi chez le troisième qui paraissait lisse. Ces variants revinrent tous trois au type original après des repiquages plus ou moins prolongés, ou plus rapidement par passage sur l'animal. Bien qu'ils ne présentassent pas de changements nets dans leur agglutination, leur virulence pour les hamsters paraissait être inférieure à celle de la souche mère.

Ces observations furent complétées par les observations importantes que Chen (1933) fit sur 195 échantillons de selles émises par 21 cholériques; 18 de ces malades furent étudiés au cours de leur convalescence. Chen trouva que les colonies des vibrions cholériques ainsi isolés

« pouvaient se diviser en 3 types distincts d'après leur réaction ' lisse ' et ' rugueuse ', leur sensibilité au cholérage, et leur agglutinabilité par un sérum de titre élevé. Le type lisse, colonies lyso-sensibles et agglutination au taux limite, fut toujours isolé, en abondance, pendant la phase aiguë du début de la maladie, avant que le cholérage ne se manifeste...

» Dès l'apparition du cholérage dans les selles et l'entrée du malade en convalescence, on assistait à la raréfaction ou à la disparition des colonies du type lisse qui faisaient place à des variants résistants, intermédiaires et rugueux, relativement moins agglutinables (1/160-1/640)... La mobilité des variants rugueux était parfois diminuée, et on isola dans 4 cas des colonies de vibrions cholériques R immobiles. Il fut cependant possible de leur rendre leur mobilité par des repiquages ultérieurs sur les milieux usuels. » [Trad.]

Dans cinq cas, parmi les 18 malades précités, on isola des vibrions pseudo-cholériques absolument « non-agglutinables » dont la rugosité fut prouvée par les tests du réactif de Millon et qui étaient résistants au cholérage. Toutefois, les épreuves d'agglutination croisée et les tests de saturation des sérums préparés respectivement avec a) des vibrions cholériques lisses, b) des variants rugueux faiblement agglutinables, et c) quatre des vibrions pseudo-cholériques, ne montrèrent aucune relation sérologique entre ces derniers microbes, et non seulement avec les vibrions cholériques lisses, mais encore avec leurs variants rugueux. On constata, en accord avec ces observations, que des repiquages quotidiens pendant trois mois en eau peptonée alcalinisée, et aussi des passages sur l'animal, qui tendaient à améliorer l'agglutinabilité des variants rugueux par le sérum anticholérique, ne donnaient pourtant aucun résultat dans le cas des souches pseudo-cholériques.

Pandit & Rao (1932) ont précisé comme suit les résultats d'une intéressante étude qu'ils avaient faite sur les caractères antigéniques de trois types de cultures secondaires obtenus respectivement avec les cholérages A, B et C:

« Les principales variations concernent l'antigène somatique. Cet antigène diminue considérablement dans le cas des colonies secondaires A, mais il persiste en quantités variables dans les cultures secondaires B et C. On a noté aussi la même dégradation dans l'antigène flagellaire. On a constaté que le pouvoir de formation des agglutinines normales était proportionnel à la quantité d'antigène somatique présent. » [Trad.]

On doit noter que les variants rugueux de *V. cholerae* produits sans l'intervention du bactériophage « présentaient une structure antigénique plus ou moins semblable à celle trouvée dans les cultures secondaires à l'action du phage du type A ». On ne pouvait considérer les variants produits sous l'influence des cholérages B ou C comme ayant un caractère

rugueux réel parce que, ainsi que nous l'avons noté ci-dessus, ils contenaient toujours une certaine quantité d'antigène somatique lisse.

Comme nous l'avons déjà mentionné au chapitre 4, Morison déclarait en 1932 qu'il avait pu rendre les vibrions cholériques inagglutinables par le sérum spécifique en les cultivant en présence de bactériophages; il ajoutait que, en travaillant dans des conditions excluant toute contamination, lui et ses collègues avaient également été dans l'impossibilité de transformer les vibrions cholériques authentiques en vibrions pseudo-cholériques par n'importe quel autre moyen.

Ces observations ont été confirmées par Vardon (1940), qui a montré que les cultures secondaires développées après l'action individuelle, sur une souche de *V. cholerae* typique, des 11 types de cholérages connus en 1935, étaient agglutinées à 50% du titre par un immunsérum H+O de la souche mère. Les réactions de fermentation des sucres de ces cultures secondaires étaient aussi identiques à celles que montrait la souche originelle.

Pendant, Morison a signalé en 1935 qu'en utilisant des combinaisons de cholérages, au lieu des types pris isolément, il avait pu, avec ses collaborateurs, effectuer

« des variations dans la morphologie, l'aspect des colonies sur gélose, la culture en bouillon, la stabilité en solutions salées, l'agglutinabilité et le pouvoir fermentatif des sucres, variations qui différaient suivant les combinaisons des types des bactériophages et la durée de leur action. Ces changements, parfois légers, pouvaient être si marqués que les bactéries qui en résultaient n'avaient plus rien qui pût les faire reconnaître pour des vibrions. » [Trad.]

Vardon (1940) a fourni certains détails sur ces observations, et d'autres analogues, faites dans les années suivantes au moyen de sérums anticholériques agglutinants O et des souches variantes produites par le phage. Bien qu'il ait constaté *in vitro* quelques variations dans le comportement sérologique de ces variants, il faut noter que, d'après une déclaration d'Anderson (1937), dans les conditions naturelles la présence ou l'absence des phages contaminant les vibrions ne paraissait pas influencer leur agglutinabilité.

Des études minutieuses ont été faites par Bernard & Liang (1933) et par Bernard, Raynal & Liang (1933) sur les variations que pouvaient subir 16 souches cholériques indochinoises typiques, non hémolytiques et plus ou moins lyso-sensibles, sous l'influence du bactériophage cholérique. D'après Bernard & Liang, les cultures secondaires provenant de ces 16 souches après l'action d'un cholérage de l'Assam, ont montré les propriétés suivantes:

a) bien que l'on n'ait observé aucune variation de l'agglutinabilité dans quatre cas, six des souches variantes accusèrent une diminution et six une perte totale de leur agglutination par les trois immunsérums cholériques utilisés;

b) les propriétés protéolytiques des souches variantes restèrent inchangées dans six cas, tandis que les autres liquéfiaient la gélatine et le sérum coagulé avec un certain retard et à un degré inférieur, ou étaient même incapables de liquéfier ces milieux.

Dans le cas d'une de ces souches, on constata que le repiquage quotidien des variants produits par le phage conduisait à une restauration progressive des propriétés de la souche mère, qui fut totale après le septième passage. Si l'on contaminait à nouveau par le bactériophage une souche « purifiée », le cycle des modifications recommençait encore une fois. A ce sujet, Bernard & Liang soutiennent que

« l'isolement sur les sept premiers tubes en gélose-gélatine de colonies ayant conservé une forme absolument normale montre qu'il existe dans la même culture des colonies pures et des colonies modifiées. Au cours des passages successifs, les colonies pures se développent plus rapidement que les colonies souillées et reconstituent après un minimum de sept passages la culture primitive. Il n'est pas douteux que la nature de la souche pure d'origine et l'activité du bactériophage doivent produire des écarts très sensibles dans le nombre des passages nécessaire pour reconstituer la culture pure de départ. »

Bernard, Raynal & Liang (1953) ont ajouté à ces observations que la réaction du choléra-roth, positive chez la totalité des 16 souches initiales, était plus prononcée dans le cas de six cultures secondaires résultant de l'action du bactériophage, et inférieure à la normale en quatre occasions. Nous noterons plus loin dans ce chapitre les constatations de ces auteurs sur le comportement de leurs souches dans les milieux au sang.

Pour déterminer les altérations des propriétés des vibrions cholériques sous l'influence du bactériophage, Damboviceanu, Combiesco & Soru (1934) employèrent six souches: deux d'entre elles étaient lisses, deux rugueuses et les deux autres présentaient soit un stade intermédiaire, soit un mélange d'éléments S et R. L'action du bactériophage ne produisit pas de dégradation de l'agglutinabilité spécifique de ces souches, pas plus qu'elle n'affecta les propriétés physico-chimiques des deux souches rugueuses. Cependant, les variants et les souches intermédiaires montrèrent quelques variations de leur agglutinabilité par la trypaflavine et de leurs zones d'agglutination acide, aussi bien que de la vitesse de leur cataphorèse, en présentant, à cet égard, contrairement aux cultures initiales, les réactions caractéristiques des souches R.

Damboviceanu & Soru (1934) ont constaté, en étudiant la teneur en antigène résiduel de six souches cholériques (trois lisses, deux intermédiaires et une rugueuse), que

a) il n'y avait plus d'antigène résiduel dans les cultures qui venaient d'acquérir, sous l'action du bactériophage, les propriétés rugueuses, bien que cet antigène fût abondant dans les extraits de la souche mère lisse;

b) cependant, les souches qui présentaient déjà les caractères rugueux avant l'action du bactériophage fournissaient, tant après qu'avant cette action, des extraits aussi riches en antigène résiduel que les souches lisses, ou même en contenaient une teneur plus élevée.

Une étude de la variation R de *V. cholerae* en rapport avec la résistance au cholérage A, faite par Young & White (1934), les conduisit aux con-

clusions suivantes, qui ne sont pas sans importance pour le sujet que nous passons en revue :

« a) Selon l'état de la culture 'ultrapure' de *V. cholerae* exposée au cholérophage du type A, la culture résistante est, sérologiquement, essentiellement lisse, intermédiaire ou rugueuse.

» b) Les variants extrêmement rugueux isolés des cultures ultrapures sans l'aide du cholérophage A sont identiques à ceux que l'on obtient en s'en servant, et semblent être toujours résistants à cet agent.

» c) Les essais d'isolement à partir de cultures ultrapures, par la simple méthode de la sélection, de variants résistants au phage A n'ont abouti que dans un seul cas, mais avec un succès significatif. En somme, nous inclinons à penser que la résistance au phage du type A n'est pas une modification induite par l'action du phage, mais que les éléments résistants préexistent dans la culture pure et survivent à la lyse. » [Trad.]

Selon White (1937 a) l'action du cholérophage LL résultait

« d'une tendance à la rugosité, très variable et habituellement insignifiante, de la culture survivante, qui peut la conduire à se comporter comme un antigène mixte SR, à une certaine réaction avec les agglutinines R, et même, dans certains cas, à une sensibilité accrue à l'action précipitante de NaCl ». [Trad.]

Les observations faites, sur le sujet présentement en revue, par Doorenbos (1932) et Scholtens (1935), aussi bien qu'une partie de celles de Bernard, Raynal & Liang (1933), méritent une mention particulière, parce que ces travailleurs ont prêté une attention spéciale aux modifications produites par l'action des choléraphages sur le comportement des vibrions dans les milieux contenant du sang.

Doorenbos (1932) a rapporté à ce propos qu'il avait travaillé avec 70 souches cholériques, lyso-sensibles à l'origine et incapables de lyser les hématies de chèvre. Après contamination artificielle par le bactériophage, 14 de ces souches devinrent fortement hémolytiques. Bien que ces variants hémolytiques fussent instables, leur repiquage produisant des colonies non hémolytiques aussi bien qu'hémolytiques, Doorenbos se crut, néanmoins, autorisé à annoncer la transformation du vibron cholérique en vibron El Tor.

Comme cet auteur put le constater, l'action du bactériophage amena d'autres modifications des propriétés des souches mères: alors que les colonies de celles-ci étaient toujours dotées d'un pouvoir hémodigestif prononcé, cette propriété devint moins marquée ou disparut même complètement. En outre, la croissance en eau peptonée des souches contaminées par le phage était moins abondante et la culture prit parfois un aspect granulaire. La réaction du cholera-roth, bien que d'intensité variable, fut en général plus fortement positive dans le cas des souches infectées par le phage que dans celui des souches originelles. Les variations du degré de la liquéfaction de la gélatine produite par les souches contaminées furent plus prononcées que celles données par les souches mères; quelquefois même les souches infectées par le phage n'étaient plus gélatinolytiques.

En éprouvant 35 de ces souches par deux immunsérums cholériques différents, Doorenbos constata que dans le cas des souches mères l'agglutination se manifestait à la fois en flocons et en grains. Par contre, plusieurs des cultures lysogènes montraient uniquement une agglutination granulaire qui parfois était à peine visible à l'œil nu. Dans certains cas, un des deux sérums, de titre peu élevé, ne produisit même aucune agglutination des souches lysogènes.

La conclusion générale, tirée par Doorenbos de ces observations, fut que

« il est possible (et ceci par l'intermédiaire du bactériophage de d'Hérelle) de transformer *in vitro* le vibron agglutinable en un vibron non agglutinable, un vibron non hémolytique en un vibron hémolytique, un vibron donnant une réaction d'indol faible en un vibron donnant une réaction d'indol forte: d'isoler, de la même souche, des vibrions agglutinables et non agglutinables, hémolytiques et non hémolytiques ».

Si l'on peut accepter la plupart des affirmations de Doorenbos parce qu'elles s'accordent avec les observations correspondantes d'autres chercheurs, on doit faire une exception lorsqu'il déclare avoir réussi à transformer le vibron cholérique en vibron El Tor. Tout ce qu'il a pu faire, dans ce sens, fut de produire des variétés hémolytiques de *V. cholerae* tout à fait instables, alors que, en vérité — nous l'avons montré dans le troisième chapitre — les réactions données, respectivement, par le vibron cholérique et le vibron El Tor dans des tests de l'hémolyse convenablement pratiqués se caractérisent par une grande stabilité. Il n'est pas douteux, cependant, que, comme l'avait déjà montré Van Loghem (1926) et comme l'ont confirmé les observations précitées de Doorenbos et aussi les constatations Bernard, Raynal & Liang (1933) et de Scholtens (1935) rapportées ci-dessous, l'action des cholérages peut exercer une influence activante sur les propriétés hémolytiques latentes de *V. cholerae*.

On peut donner, à cet égard, le tableau suivant des expériences de Bernard et ses collaborateurs (1933) sur 16 souches cholériques:

Réactions	Souches mères	Cultures secondaires obtenues après l'action du bactériophage	
		pendant 6 heures	pendant 24 heures
Hémagglutination (hématies de mouton)	uniformément positive	identique 10 fois plus forte 5 fois plus faible 1 fois	identique 11 fois plus forte 5 fois plus faible 1 fois
Hémodigestion (géllose-sang de lapin)	uniformément positive	identique 9 fois plus faible 7 fois	identique 7 fois plus faible 9 fois
Hémolyse (suspension d'hématies de mouton en eau physiologique)	totalement négative même après 24 heures	} 4 fois positive après 24 heures 9 résultats inconstants	

Préoccupés de la possibilité d'erreurs de diagnostic, que l'on pourrait faire en rencontrant dans la pratique des variétés hémolytiques de *V. cholerae*, Bernard et ses collègues recommandèrent de recourir à la culture en série de manière à obtenir de nouveau des colonies de caractère typique.

Scholtens (1935) ensemença 15 tubes de bouillon, contenant des suspensions à 0,5% d'hématies de mouton, avec des colonies isolées des cultures de *V. cholerae* secondaires à l'action du phage. Il put noter une hémolyse légère mais nette dans les tubes où se manifestait une culture en flocons, provenant sans aucun doute d'une variation R, alors que l'hémolyse était

presque négligeable dans les tubes montrant la culture diffuse et homogène caractéristique des microbes lisses. Les variants nettement hémolytiques s'avéraient résistants au phage mais non lysogènes.

Cette démonstration de l'existence d'un parallélisme étroit entre la transition S-R et les réactions hémolytiques aberrantes des vibrions en question, est d'un intérêt considérable.

Si plusieurs des observateurs mentionnés ci-dessus, dont Doorenbos, ont constaté que l'agglutinabilité spécifique de *V. cholerae* était diminuée ou même abolie sous l'influence des bactériophages, nous devons mentionner maintenant les affirmations d'un petit nombre de travailleurs, pour qui les souches de ce micro-organisme qui n'étaient plus justifiables de l'action du sérum anticholérique, après exposition aux phages, pouvaient récupérer leur agglutinabilité initiale; d'après ces auteurs, des vibrions pseudo-cholériques, jusqu'alors « inagglutinables », pouvaient même, après l'action du bactériophage, montrer des réactions sérologiques identiques à celle des vibrions cholériques authentiques.

Ainsi que nous l'avons indiqué au chapitre 4, en les discutant partiellement, des affirmations de cette nature ont été faites par Pasricha, De Monte & Gupta (1931 b, 1932 b, 1933).

Dans leur article de 1931, ces travailleurs rapportaient que la sensibilité aux cholérages de 355 souches de vibrions pseudo-cholériques de diverses origines, était la suivante :

	Nombre de souches testées	Type A	Type B	Type C	Type B et C	Pourcentage lysé
Rivières et réservoirs d'eau . . . . .	88	—	2	26	18	52,0
Selles de sujets sains . . . . .	82	—	—	—	13	16,0
Selles de convalescents de choléra . . . . .	126	—	8	12	4	19,0
Totaux . . . . .	296	—	10	38	35	23,0

*Note* : Aucun exemple de lyse n'a été observé dans 59 échantillons de selles de sujets souffrant de choléra; les vibrions qui en provenaient se sont fréquemment montrés contaminés par le cholérage du type A.

Comme nous l'avons exposé au chapitre 4, Pasricha et ses collaborateurs avaient trouvé que certaines colonies secondaires, lyso-résistantes, qui s'étaient développées après l'action des cholérages B, C, ou B et C sur ces souches pseudo-cholériques, étaient agglutinables par un sérum anticholérique de haut titre, saturaient totalement les agglutinines de ce sérum, et pouvaient produire des antisérums qui agglutinaient les vibrions cholériques à un taux élevé. On a noté aussi que Pasricha et ses collègues, tout en constatant que cette agglutinabilité acquise se maintenait difficilement, attribuaient à leurs observations une signification importante: ils étaient persuadés qu'une grande proportion de vibrions « non-agglutinables » présents dans les localités où règne le choléra étaient des mutants de *V. cho-*

*lerae*, qui pouvaient jouer un rôle considérable dans l'étiologie de la maladie. Cependant, en discutant l'origine des vibrions lyso-résistants et spécifiquement agglutinables, obtenus après action du bactériophage sur les vibrions pseudo-cholériques, ces chercheurs admettaient qu'il était difficile de réfuter la critique basée sur la préexistence, en « très petite proportion » dans les cultures originelles, de ces microbes apparemment transformés. L'auteur de ces lignes ne saurait douter, quant à lui, que cette interprétation de leurs découvertes, et de quelques résultats analogues rapportés ultérieurement par Vardoj (1940), soit de beaucoup la plus vraisemblable.

Dans leur article de 1932, Pasricha, De Monte et Gupta font mention d'une souche « non-agglutinable » isolée des fèces d'un malade présentant les signes cliniques du choléra, et exposent que *a*) les vibrions en question étaient lysables par un bactériophage d'origine hydrique, *b*) les cultures secondaires à l'action de ce « vibriophage » étaient lysables par les choléraphages B, C et D, et *c*) ces cultures secondaires étaient agglutinables au titre limite par un sérum cholérique très puissant. Pasricha et ses collègues ajoutent, sans donner de détails, que des variations similaires ont été provoquées par la culture des vibriophages sur trois autres souches de vibrions pseudo-cholériques.

Comme nous l'avons déjà exposé au chapitre 4, Pasricha et ses collègues (1933) avaient déclaré que, sur 56 souches de vibrions « non-agglutinables », 11 étaient devenues, après action des choléraphages, agglutinables par un immunsérum cholérique, tandis qu'ils avaient obtenu le même résultat en 13 cas sous l'influence des vibriophages. En discutant ces résultats, Pasricha et ses collaborateurs déclaraient :

« ... Nous n'avons pas fait d'étude suffisamment poussée des vibrions et des phages dans les régions non endémiques, pas plus que nous n'avons fait de recherches sur les variations saisonnières des vibriophages en rapport avec l'épidémicité du choléra, qui puissent nous permettre de tirer des conclusions définitives sur le rôle joué par les vibriophages dans l'épidémiologie du choléra, mais, au laboratoire, sous l'influence d'une maladie à virus (choléraphore) le vibron cholérique typique devient un microbe saprophyte inoffensif qui, lorsqu'il est parasité une fois de plus par un autre virus (vibriophage), revêt des caractères qui le rendent indiscernable du type virulent classique... Nous ne sommes pas en mesure de juger si les vibrions récupèrent leur virulence ou non. La conclusion qui s'impose à nous est que les vibriophages prennent une part importante à l'épidémiologie du choléra, et qu'ils sont un des facteurs essentiels qui déterminent une régénération des vibrions cholériques dégénérés. » [Trad.]

Anderson (1940) a relaté que les travailleurs du King Edward VII Memorial Pasteur Institute de Shillong, pensant que les vibrions pseudo-cholériques des eaux de surface pourraient être des germes du choléra ayant perdu leur agglutinabilité spécifique, s'étaient efforcés à produire une réversion des microbes à leur état originel par culture des vibrions des eaux dans des dilutions de sérum antiphage. Les résultats de ces essais furent, cependant, entièrement négatifs.

Par contre, Doorenbos & Cossery ont affirmé, dans une note publiée en 1950, qu'ils avaient transformé un variant rugueux de *V. cholerae* en une forme lisse, au moyen d'un sérum antiphage de lapin produit par des injections intraveineuses répétées de choléraphages du type B.

Ces deux chercheurs ont exposé qu'ils avaient employé à cet effet des dilutions de 1/100 et 1/500 du sérum antiphage dans du bouillon, dans lesquelles ils cultivaient les vibrions rugueux deux fois de suite pendant 48 heures. Après un repiquage en bouillon pendant 72 heures, ils firent des étalements sur plaques de gélose. Ces plaques de gélose furent laissées 5 jours à la température du laboratoire. Les vibrions cultivés deux fois en présence du sérum antiphage témoignaient — contrairement à ceux qui avaient été cultivés dans les mêmes conditions en présence de sérum normal de lapin dilué à 1/100 — d'une réversion au type S. Ils obtinrent un aspect nettement S par des repiquages sur gélose inclinée: ces formes étaient stables en eau physiologique et agglutinables par les sérums spécifiques au même titre que les cultures lisses initiales de *V. cholerae* Korein (le microbe responsable de l'épidémie cholérique égyptienne de 1947).

Tout en soutenant que l'action du sérum antiphage était la cause de la mutation des vibrions rugueux en formes lisses, Doorenbos & Cossery ont admis la possibilité d'« une transformation R → S spontanée des vibrions R lorsqu'ils sont cultivés en différents milieux ». Ils se proposaient de confirmer la validité de leurs constatations préliminaires par de nouvelles recherches, mais — à notre connaissance — aucune publication n'a apporté de confirmation à ce sujet. En outre, comme on l'a souligné dans le chapitre précédent, la preuve même définitive de telles transformations dans des conditions hautement artificielles ne saurait donner la certitude que des réversions analogues se produisent dans la nature — hypothèse que les données épidémiologiques rendent tout à fait invraisemblable.

D'autre part, le témoignage produit au début de cette étude rend indubitable que l'action du bactériophage peut produire une mutation des vibrions cholériques lisses typiques en une forme « inagglutinable », évidemment rugueuse.

#### *Emploi pour la vaccination des lysats produits par les choléraphages*

Pour éviter des redites, nous traiterons dans la dernière partie de ce volume de l'emploi qui a été fait des bactériophages dans le diagnostic bactériologique du choléra, aussi bien que dans la lutte massive contre cette maladie, mais nous nous attacherons dès à présent à quelques tentatives d'utilisation pour la vaccination des lysats produits par les choléraphages.

Maitra & Mallick (1931) ont précisé que d'Hérelle, Malone & Lahiri (1930) avaient suggéré que l'on pouvait produire une immunité solide et durable par l'administration d'une dose unique d'un millilitre de lysat de choléraphage. En commentant cette recommandation, Maitra & Mallick exposent qu'elle était

« probablement fondée sur la protection contre le 'barbone', provoquée chez les buffles par des injections de lysat de *B. bovissepticus* obtenu par l'action du phage. Le type de l'immunité produite par injection de vibrions cholériques lysés par le phage pourrait être

soit antitoxique, soit antibactérien, soit une combinaison des deux. Comme la masse des corps bactériens dans ce filtrat lytique subit une dissolution totale, on devrait naturellement s'attendre à y trouver plus de produits de désintégration (qu'on appelle dans ce cas les endotoxines du vibron) que de bactéries intactes, et en outre, les bactériophages qui cultivent aux dépens de ces microbes. Avant d'attribuer à de tels filtrats un pouvoir quelconque de production d'une immunité active, on doit prouver qu'ils contiennent des toxines puissantes, car des toxines faibles ne peuvent jamais se comporter en antigènes satisfaisants. » [Trad.]

En vue d'éprouver les propriétés toxiques des lysats de cholérages et d'explorer en même temps la valeur immunogène de ces préparations, Maitra & Mallik injectèrent à trois lapins des doses de 1-3 ml de lysat de *V. cholerae* produit avec un puissant cholérage. Une observation soignée de ces animaux pendant deux semaines ne montra aucune altération de leur santé. Cependant, lorsqu'ils reçurent dans les veines, au 15<sup>e</sup> jour, des quantités de vibrions cholériques tués, équivalentes à 1,5 fois la dose létale minimum calculée, ils présentèrent tout comme les lapins témoins, de la diarrhée, du collapsus, et moururent en 24 heures.

En estimant, cependant, que l'addition de lysats de cholérages aux vaccins cholériques standards pourrait rehausser la valeur immunogénique de ceux-ci, six lapins reçurent, par voie sous-cutanée, deux doses respectives de 0,5 et 1 ml de vaccin cholérique additionnées chaque fois de 1 ml de lysat de cholérages. Les tests bactéricides, pratiqués avec le sérum de ces animaux deux semaines après la seconde injection, donnèrent des résultats identiques à ceux obtenus chez les lapins témoins qui n'avaient reçu que l'injection du vaccin standard.

Autant qu'on s'estime en droit de juger sur ces expériences restreintes, l'addition des lysats produits par le phage aux vaccins cholériques standards ne rehausse pas le pouvoir bactéricide de ces derniers. Désormais, même si l'on a pu constater que les titres agglutinants des sérums des animaux injectés avec les lysats produits par le phage étaient dans l'ensemble plus élevés que ceux du groupe témoin, il est à présumer que l'addition des lysats de cholérage aux vaccins cholériques ne présente aucun avantage.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson, L. A. P. (1935) In: *Report. Twelfth Conference of Medical Research Workers, 1934*, Simla, p. 102 (Cité par Pasricha, De Monte & Gupta, 1936)
- Anderson, L. A. P. (1937) *Cholera*. In: King Edward VII Memorial Pasteur Institute and Medical Research Institute, *Twentieth annual report for year ending 31 December, 1936*, Shillong (Résumé dans *Trop. Dis. Bull.* 1938, 35, 739)
- Anderson, L. A. P. (1940) *Cholera enquiry under the Indian Research Fund Association*. In: King Edward VII Memorial Pasteur Institute and Medical Research Institute, *Twenty-third annual report for year ending 31st December, 1939*, Shillong (Résumé dans *Trop. Dis. Bull.* 1942, 39, 161)

- Asheshov, I. N. et al. (1930) Bacteriophage inquiry. Report on the work during the period from 1st January to 1st September 1929. *Indian J. med. Res.* **17**, 971
- Asheshov, I. N. et al. (1933 a) Studies on cholera bacteriophage. Part I. General technique. *Indian J. med. Res.* **20**, 1101
- Asheshov, I. N. et al. (1933 b) Studies on cholera bacteriophage. Part II. Classification of bacteriophage and its practical application. *Indian J. med. Res.* **20**, 1127
- Asheshov, I. N. et al. (1933 c) Studies on cholera bacteriophage. Part III. Virulence and development of bacteriophage. *Indian J. med. Res.* **20**, 1159
- Bernard, P. N. & Guillemin, J. (1933) Sur la lyse transmissible du vibron cholérique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **196**, 1339; **197**, 201
- Bernard, P. N. & Liang, W. (1933) Remarques sur quelques souches de vibrions cholériques isolés en Indochine et sur les variations de leurs caractères sous l'influence du bactériophage. *Bull. Soc. Path. exot.* **26**, 146
- Bernard, P. N., Raynal, J. & Liang, W. (1933) Remarques sur quelques souches de vibrions cholériques isolés en Indochine et sur les variations de leurs caractères sous l'influence du bactériophage (2<sup>e</sup> note). *Bull. Soc. Path. exot.* **26**, 896
- Chen, W. K. (1932) Dissociation of *V. cholerae* by bacteriophage. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **29**, 1160
- Chen, W. K. (1933) Rough forms of *Vibrio cholerae* from convalescents. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **30**, 887
- Ciucu, M. (1923) Présence du principe lytique pour le bacille de Shiga et le colibacille dans les selles des cholériques. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **88**, 143
- Damboviceanu, A., Combesco, C. & Soru, E. (1934) Action in vitro du bactériophage sur les propriétés du vibron cholérique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **115**, 1320
- Damboviceanu, A. & Soru, E. (1934) Action in vitro du bactériophage sur les propriétés des vibrions. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **117**, 295
- Doorenbos, W. (1932) Etude sur la symbiose du vibron cholérique avec le bactériophage. Reproduction expérimentale des variations des caractères biologiques des vibrions cholériques. *Ann. Inst. Pasteur*, **48**, 457
- Doorenbos, W. & Cossery, G. N. (1950) Preliminary note —R-S variation of *V. cholerae* Korein, in presence of anti-phage serum. *J. roy. Egypt. med. Ass.* **33**, 212
- Finkelstein, M. H. (1931) Problems in the bacteriology of cholera and cholera-like infections. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* **25**, 29
- Flu, P. C. (1923) Die Natur des Bakteriophagen und die Bildung von Bakteriophagen aus alten Bouillonkulturen pathogener Mikroorganismen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **90**, 362
- Flu, P. C. (1924), Over Cholera bacteriophagen. *T. vergelijk. Geneesk. (Leiden)*, **10**, 196 (Cité par Flu, 1925)
- Flu, P. C. (1925) Über Cholera bacteriophagen. *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.* **29**, Beiheft 1, 99 (Résumé dans *Trop. Dis. Bull.* 1926, **23**, 190)
- d'Hérelle, F. (1917) Sur un microbe antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **1265**, 373
- d'Hérelle, F. (1921) *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité*, Paris
- d'Hérelle, F. (1923) Sur un « principe bactériolytique » non bactériophage existant dans l'intestin des cholériques. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **88**, 723
- d'Hérelle, F. (1926) *Le bactériophage et son comportement*, Paris
- d'Hérelle, F. (1930) *The bacteriophage and its clinical applications*, Springfield, Ill.
- d'Hérelle, F. & Malone, R. H. (1927) A preliminary report of work carried out by the cholera bacteriophage enquiry. *Indian med. Gaz.* **62**, 614
- d'Hérelle, F., Malone, R. H. & Lahiri, M. N. (1930) Studies on Asiatic cholera. *Indian med. Res. Mem.* No. 14
- Jadin, J. (1936) Le bactériophage anti-cholérique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **123**, 297
- Jötten, K. W. (1922) Über das sogenannte d'Hérellesche Phänomen. *Klin. Wschr.* **1**, 2181
- Loghem, J. J. van (1926) Bacteriophage und hämolytisches Endotoxin des Cholera-Vibrio. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **100**, 19

- Maitra, N. M. (1939) On inhibition of individual types of cholera-bacteriophages by vibrio extracts. *Indian J. med. Res.* **27**, 41
- Maitra, G. C. & Mallick, S. M. K. (1931) Experimental observations on cholera 'phage lysate as a component of prophylactic cholera vaccine. *Indian J. med. Res.* **19**, 701
- Meissner, G. (1924) Über Bakteriophagen gegen Cholera-vibrionen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **91**, 149
- Morison, J. (1932) *Bacteriophage in the treatment and prevention of cholera*, London
- Morison, J. (1933) In: *Report. Tenth Conference of Medical Research Workers, 1932*, Simla, p. 145 (Cité par Pasricha, De Monte & Gupta, 1936)
- Morison, J. (1935) Bacteriophage in cholera. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* **28**, 563
- Morison, J. & Vardon, A. C. (1929) A cholera and dysentery bacteriophage. *Indian J. med. Res.* **17**, 48
- Nobechi, K. (1926 a) Sur la préparation du bactériophage pour le vibron cholérique et la classification de ces vibrions au point de vue du phénomène de bactériophagie. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **95**, 1250
- Nobechi, K. (1926 b) Sur la signification du bactériophage pour le vibron cholérique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **95**, 1252
- Pandit, C. G., Maitra, M. N. & Datta Roy, B. K. (1936) On inhibition of individual types of cholera bacteriophage by vibrio extracts. *Indian J. med. Res.* **24**, 13
- Pandit, C. G. & Rao, R. S. (1932) A note on the antigenic structure of secondary cultures obtained with the three types of cholera 'phages and a strain of cholera vibrio. *Indian J. med. Res.* **19**, 1023
- Pasricha, C. L. (1933) In: *Annual report of Calcutta School of Tropical Medicine, 1932*, Calcutta, p. 109 (Cité par Pasricha, Lahiri & De Monte, 1941)
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1931 a) Seasonal variations of cholera bacteriophages in natural waters and in man, in Calcutta during the year 1930. *Indian med. Gaz.* **66**, 542
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1931 b) Cholera-like vibrions under the action of bacteriophage. (Lysability of cholera-like vibrions by pure-line races of cholera bacteriophage and changes induced in the serological reactions of cholera-like vibrions under the influence of bacteriophage.) *Indian med. Gaz.* **66**, 610
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1932 a) A preliminary note on new types of cholera 'phage—types D and E. *Indian med. Gaz.* **67**, 262
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1932 b) Cholera and cholera-like vibriophages. *Indian med. Gaz.* **67**, 487
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1933) A schematic representation of the variants of cholera vibrio produced under the influence of bacteriophage. *Indian med. Gaz.* **68**, 448
- Pasricha, C. L., De Monte, A. J. & Gupta, S. K. (1936) A new type of cholera phage—type M. *Indian med. Gaz.* **71**, 194
- Pasricha, C. L., Lahiri, M. N. & De Monte, A. J. H. (1941) A further type of cholera phage—type N. *Indian med. Gaz.* **76**, 218
- Petrovanu, G. (1924 a) Recherches sur l'existence du principe lytique dans la péritonite cholérique expérimentale. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **91**, 735
- Petrovanu, G. (1924 b) Recherches sur la présence du principe lytique vis-à-vis du vibron cholérique dans la paroi de l'intestin grêle. *C. S. Roc. Biol. (Paris)*, **91**, 754
- Rao, R. S. (1932) The influence of H ion concentration on cholera bacteriophagy. *Indian J. med. Res.* **20**, 377
- Russell, A. J. H. (1935) *Cholera in India*. In: *Transactions of the Ninth Congress of the Far Eastern Association of Tropical Medicine . . . 1934*, Nanking, vol. 1, p. 389
- Scholtens, R. T. (1935) Sur l'hémolyse du vibron cholérique sous l'influence du bactériophage. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **119**, 1023
- Twort, F. W. (1915) Investigations on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet*, **2**, 1241

- Vardon, A. C. (1940) *Vibrio cholerae* and other vibrios. (Observations on "water vibrios" with special reference to their variation during storage in culture medium and possible relationship to *Vibrio cholerae*). *Indian med. Gaz.* **75**, 722
- White, P. B. (1936 a) Observations on the polysaccharide complex and variants of *Vibrio cholerae*. *Brit. J. exp. Path.* **17**, 229
- White, P. B. (1936 b) Differential fixation of cholera phages by extracts of *V. cholerae*. *J. Path. Bact.* **43**, 591
- White, P. B. (1937) Lysogenic strains of *V. cholerae* and the influence of lysozyme on cholera phage activity. *J. Path. Bact.* **44**, 276
- Yang, Y. N. & White, P. B. (1934) Rough variation in *V. cholerae* and its relation to resistance to cholera phage (Type A). *J. Path. Bact.* **38**, 187
-