

sont sans influence destructrice sur une Colicine produite par un *B. Coli* très actif contre le *B. Paratyphique B.* mais inactif contre le *Coli*  $\phi$ .  
C'est sur l'ensemble des critères passés en revue ci-dessus que se base l'identification des divers types de *B. Coli* producteurs de Colicines.

(Institut de Bactériologie de l'Université et de la Province de Liège).

#### BIBLIOGRAPHIE.

1. GRATIA (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 1040 ; *Ann. Pasteur*, 1932, 48, 413.
2. GRATIA (A.) et FREDERICQ (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge 24 nov. 1945.
3. FREDERICQ (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge 24 nov. 1945, 22 déc. 1945, 29 juin 1946 ; 5<sup>e</sup> Assemblée Soc. Suisse Microbiol., Bâle, juin 1946.
4. DEMELENNE-JAMINON (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1940, 133, 440.
5. FREDERICQ (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge 28 avril 1945.

### Les agents antibiotiques des microbes du genre *Bacillus*,

par A. GRATIA et J. THIBAUT.

(Mémoire présenté à la séance du 4 octobre 1946, Liège).

Au cours d'une recherche systématique de microorganismes éventuellement doués de propriétés antibiotiques contre le bacille de Loeffler dans les sécrétions pharyngées de personnes atteintes ou convalescentes de diphtérie, nous avons isolé un certain nombre de bacilles actifs, appartenant tous au genre *Bacillus*. A ceux-ci sont venues s'ajouter d'autres souches actives semblables, isolées de l'air, de l'eau ou du sol. Tous ces bacilles gram-positifs, sporulés, souvent fort voisins, avaient les caractères du groupe *subtilis-mesentericus* dont les propriétés antimicrobiennes découvertes par NICOLLE en 1907 [1] ont fait, surtout récemment, l'objet de nombreux travaux.

Déjà, antérieurement [2], nous avons montré avec P. FREDERICQ que le champ d'action de ces divers bacilles, à part leur action commune sur le bacille de Loeffler, était très variable d'un bacille à l'autre bien que souvent ils ne se distinguent entre eux par aucun autre caractère ; telle souche active sur le bacille diphtérique ne l'est pas sur un bacille dysentérique ou sur un staphylocoque, tandis que d'autres, apparemment identiques et également actives sur le bacille de Loeffler, sont actives, l'une sur le staphylocoque et l'autre sur le bacille dysentérique ; d'autres encore inhibent le bacille typhique.

Ainsi donc la « subtiline » des auteurs, n'est pas une substance hypothétique unique, mais un mélange de substances d'affinités diverses : il y a des « subtilines » ou des « mesentericines ».

Ces faits ont été confirmés par l'étude des courbes de diffusion obtenues en ensemençant les souches actives, chacune respectivement sur une boîte de Pétri différente, sous la forme d'une strie tracée verticalement tandis qu'on ensemece ensuite, perpendiculairement, une strie horizontale de bacille diphtérique, chaque jour, l'une à la suite de l'autre. En diffusant dans le milieu, les substances bactériostatiques, partant de la strie verticale, étendent leur inhibition chaque jour davantage, et si l'on réunit les points extrêmes atteints par celle-ci sur les stries successives de bacille diphtérique, on obtient une courbe constante pour chacune des souches actives et nettement différente d'une souche à l'autre.

On peut distinguer trois formes principales de courbes. La première est une courbe concave s'écartant de plus en plus, d'une façon régulière, de la strie verticale active. La seconde, après avoir débuté comme la première, s'arrête dans sa progression, à partir du 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour, pour descendre parallèlement à la strie active comme si le produit ne diffusait plus. La troisième, enfin, après avoir aussi progressé régulièrement, s'infléchit ensuite en une courbe rentrante ce qui laisse supposer que dans ce cas l'agent antibiotique perd progressivement son activité ; il est instable. Chacun de ces types de courbe offre, d'une souche à l'autre, des

variantes dont chacune est parfaitement caractéristique de la souche considérée.

L'on est surpris de voir, dans les cas de courbes du premier type, la distance qu'atteint l'inhibition et qui, au bout de sept jours, peut être de 60 mm. On devrait donc légitimement s'attendre à trouver dans les cultures d'un tel germe, un agent particulièrement actif, ce qui, nous le verrons, n'est pas le cas. Aussi, pouvait-on se demander s'il ne s'agissait pas de substances s'étendant seulement sur la surface de la gélose en une couche monomoléculaire sans pénétration dans l'épaisseur du milieu. Mais il n'en n'est rien, car si l'on ensemence une strie de ce bacille actif à la surface d'une feuille de cellophane étalée sur un bloc épais de gélose coulé non plus dans une boîte de Pétri mais dans un cristalliseur puis, qu'après deux jours, on enlève la culture développée sur la cellophane et qu'enfin après huit jours, on coupe le bloc de gélose en deux, perpendiculairement à la strie, on constate que le principe actif a non seulement traversé la cellophane, mais a pénétré aussi loin dans la profondeur de la gélose qu'elle s'est étendue à la surface de celle-ci ; la culture de bacille diphtérique ensemencée sur la tranche du bloc de gélose coupé en deux est, en effet, inhibée aussi loin sur cette tranche que sur la surface du bloc.

Les substances antibiotiques de ces bacilles sont donc remarquablement diffusibles. Elles sont aussi très thermostables ; en effet, de la gélose dans laquelle elles ont abondamment diffusé conserve intact tout son pouvoir antibiotique, après avoir été fondue à 100°. La démonstration est simple : deux boîtes de Pétri identiques contiennent la même quantité de gélose sous une épaisseur de 1 cm. L'une d'elles, est recouverte d'une feuille de cellophane qu'on ensemence uniformément à l'aide d'un bacille actif. Après 5 jours, quand les substances antibiotiques ont diffusé abondamment à travers la gélose sous-jacente, on prélève des cylindres de celle-ci à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm. de diamètre. Avec le même emporte-pièce on enlève des cylindres identiques dans la boîte de gélose vierge et l'on comble les cavités ainsi creusées dans celle-ci par les cylindres de gélose active provenant de la boîte ensemencée, les uns tels quels, les autres seulement après avoir été fondus à 100°. Le lendemain quand le principe actif contenu dans les cylindres actifs, chauffés ou non chauffés, a suffisamment diffusé dans la gélose vierge où ils ont été introduits, l'on ensemence la surface de celle-ci avec du bacille diphtérique et l'on observe dans la suite des cercles d'inhibition identiques d'environ 25 mm. de diamètre, qu'il s'agisse des cylindres fondus à 100° ou des cylindres non chauffés.

Étant donné l'extension considérable à travers la gélose du pouvoir inhibiteur des agents actifs, on aurait pu s'attendre à trouver celui-ci en abondance dans les cultures des bacilles. Or, quoi que nous ayons tenté jusqu'à présent, les quantités mises en évidence restent faibles. Les cultures en bouillon, même fortement aérées, et de tout âge, ne dépassent jamais le titre de 1/128° ; ce taux maximum est obtenu lorsque les cultures en bouillon âgées de 5 à 10 jours sont stérilisées à 100° ou même à l'autoclave à 120°. Filtrées sur bougie Chamberland ou Berkefeld ou sur disque Seitz, elles perdent toute activité ; filtrées sur filtre de verre d'Iéna G5 auf 3, elles ne dépassent pas le titre de 1/8° et dialysées à travers la cellophane, celui de 1/32°. Enfin, si de la gélose où les principes actifs ont diffusé abondamment est broyée puis soumise à la macération dans un égal volume d'eau distillée stérile, on obtient après centrifugation un liquide surnageant actif jusqu'à 1/64°.

L'opposition entre la faible concentration des principes actifs dans les cultures et l'extension pourtant considérable de son action sur gélose, laisse supposer qu'ils doivent être constitués de très petites molécules. Il est curieux de constater d'autre part que si elles traversent la cellophane, elles sont cependant retenues par les bougies filtrantes.

(Institut de Bactériologie de l'Université et de la Province de Liège).

#### BIBLIOGRAPHIE.

1. *Ann. Inst. Past.*, 1907, 21, 613.
2. *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge du 24 novembre 1945.