

## TRAVAUX ORIGINAUX.

### Techniques sélectives pour la recherche systématique dans la nature, de microorganismes doués, soit de propriétés antibiotiques, soit de propriétés antibactériophages, soit de propriétés antagonistes des antibiotiques,

par André GRATIA.

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

Lorsqu'il y a une vingtaine d'années, nous avons voulu, avec S. DATH, rechercher systématiquement dans la nature, des microorganismes doués de propriétés bactériolytiques, nous avons, à cet effet, réalisé une technique sélective fort simple : nous exposions à des contaminations les plus diverses (poussières de l'air, eaux de toutes origines, vases des étangs, terres, fumiers, etc...) des boîtes de Pétri stériles contenant comme milieu de culture, de l'eau gélosée dans laquelle était incorporée, de façon homogène, une émulsion plus ou moins épaisse de l'un ou l'autre microbe mort ou vivant (staphylocoque, vibrion cholérique, bacille coli, etc...). Seuls, un nombre restreint de microorganismes étaient capables de se développer sur un tel milieu, en y faisant des colonies plus ou moins grandes, s'entourant d'une zone de clarification d'autant plus nette et d'autant plus étendue que les propriétés bactériolytiques de la colonie étaient plus intenses. Nous avons pu isoler ainsi de nombreux germes bactériolytiques, à savoir des bacilles et des cocci gram-positif et gram-négatif ; mais ce sont surtout les actinomyces blancs que nous appelions encore streptothrix, qui retinrent notre attention par leurs propriétés bactériolytiques particulièrement intenses et firent l'objet de nos études ultérieures [1]. C'est d'ailleurs une technique identique qui a permis plus récemment à WAKSMAN d'isoler les actinomyces dont il a pu extraire diverses substances antibiotiques [2].

Lorsqu'on doit sélectionner dans la nature des microorganismes doués de propriétés, non plus bactériolytiques, mais bactériostatiques et bactéricides, le problème est beaucoup moins simple. Cette fois, en effet, les germes actifs interviennent non plus sur des cultures déjà développées pour les dissoudre, mais doivent, au contraire, empêcher le développement des cultures sensibles ; il faut donc que les colonies de microbes actifs aient poussé d'abord sur le milieu de culture, afin d'avoir eu le temps de répandre autour d'elles leurs substances inhibitrices, avant que l'on ensemente ensuite le milieu avec le microbe sensible. Et c'est en cela que consiste la difficulté sans qu'il soit nécessaire d'insister.

Sans doute, peut-on parfois réaliser ce que, dans une note antérieure [3] nous avons appelé la technique de l'*antagonisme simultané*, qui consiste à faire l'isolement des germes actifs sur un milieu qu'on vient d'ensemencer uniformément du microbe à attaquer. Mais ce champ d'investigation est limité à deux éventualités : la première est réalisée lorsque les germes actifs produisent très rapidement un agent antibiotique très diffusible ; dans ce cas, ils ont la chance de ne pas être noyés dans la masse des microbes sensibles, mais de se développer sous forme de petites colonies isolées au milieu d'une petite zone d'inhibition qui les signale à notre attention ; c'est le cas notamment pour les microbes comme le *Coli V* que nous avons découvert autrefois [4]. L'autre éventualité est réalisée lorsque le microbe sensible est d'un développement lent par rapport à celui des microbes actifs. C'est le cas notamment dans la recherche de germes actifs contre le bacille tuberculeux.

Mais, dans la grande majorité des cas, il importe de recourir à des techniques d'*antagonisme différé*.

Déjà, dans la note antérieure signalée plus haut [3], nous avons rapporté deux de ces techniques. La première consiste à recouvrir la boîte de gélose nutritive d'une feuille de cellophane que l'on soumet aux contaminations les plus diverses. Lorsque, après 48 heures, celles-ci ont donné des colonies bien développées, on retire la feuille de cellophane et l'on ensemence la gélose sous-jacente avec le microbe sensible. Celui-ci pousse partout sauf, éventuellement au milieu de cercles qui restent vierges et qui trahissent l'endroit où des substances antibiotiques ont traversé la cellophane à partir de colonies actives ayant poussé à la surface de celle-ci. Comme on a conservé le disque de cellophane, on peut y repérer la ou les colonies actives. Dans la seconde technique, la cellophane est remplacée par un disque de papier filtre stérile que l'on recouvre d'une couche de gélose de 1 à 2 mm. d'épaisseur, qu'après solidification, on soumet aux contaminations. On procède ensuite de la même façon. Dans ce cas, on peut isoler des colonies dont l'agent actif serait constitué de molécules trop grosses pour traverser la cellophane. A l'usage, ces deux techniques ayant présenté certains inconvénients mineurs qui en limitaient cependant l'efficacité, nous avons réalisé un autre procédé dont les résultats sont parfaits et remarquablement fructueux comme nous le montrerons plus tard.

Voici le principe de cette technique : on soumet une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive à des contaminations diverses, de façon que des microorganismes s'y trouvent en nombre assez restreint pour être convenablement isolés. On coule ensuite par dessus une dizaine de cm<sup>3</sup> de gélose nutritive qui, en se solidifiant, recouvrira donc l'ensemencement d'une couche protectrice de 2 à 3 mm. d'épaisseur. Enfouis sous celle-ci, les microbes isolés vont se développer sous forme de petites colonies situées assez profondément pour ne pas affleurer à la surface de la couche protectrice de gélose qui reste vierge. On pourra donc ensuite ensemencer uniformément celle-ci avec le microbe sensible qui se développera partout, sauf au niveau de cercles vierges, trahissant la présence sous la couche protectrice d'une colonie active que l'on peut alors aisément repiquer à l'aide d'une pipette effilée stérile. Après quelques tâtonnements, et grâce à certaines précautions qu'enseigne l'usage, on obtient des résultats remarquables. Nous réservons pour un mémoire détaillé la description de ces précautions ainsi que des légères variantes qu'il y a lieu d'apporter à cette technique pour l'adapter à toutes les circonstances de la recherche.

Disons encore que cette technique, comme d'ailleurs les précédentes, se prêtent également à la recherche de microorganismes destructeurs, au contraire, des substances antibiotiques produites par d'autres germes. Il suffit dans ce cas d'introduire la substance antibiotique considérée (pénicilline, streptomycine, colicine, etc...) soit dans la gélose nutritive du fond, pour la technique à la cellophane ou au papier filtre gélosé, soit dans la gélose de la couche protectrice pour la troisième technique. On doit alors obtenir, après ensemencement du microbe sensible à l'antibiotique, une image diamétralement opposée à celle observée dans les recherches précédentes, car, cette fois, le microbe sensible étant inhibé par la présence de l'antibiotique ne doit se développer nulle part, sauf là où un microbe antagoniste de cet antibiotique a poussé.

Semblablement, il suffira d'introduire dans la gélose nutritive, au lieu d'un antibiotique, l'un ou l'autre bactériophage, pour avoir des chances de découvrir des germes capables de détruire celui-ci. Mais, dans ce cas, il y a lieu d'être circonspect avant de considérer un germe antagoniste de l'action d'un bactériophage comme réellement destructeur de celui-ci, car d'autres phénomènes peuvent interférer sur lesquels nous ne pouvons nous étendre ici, nous réservant d'y insister ailleurs.

Ces techniques qui nous ont été inspirées par les nécessités de la recherche systématique dans la nature de germes doués de propriétés antibiotiques ou antibactériophages ou antagonistes des antibiotiques, sont apparentées, ainsi que nous l'avons constaté dans la suite, à des techniques analogues réalisées antérieurement à des fins quelque peu différentes par EJKMAN [5] et par Mc LEOD et GOVENLOCK [6].

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

#### BIBLIOGRAPHIE.

1. GRATIA (A.) et DATH (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, 1442.
2. WAKSMAN (S. A.) et WOODRUFF (H. B.). — *Journ. Bacter.*, 1940, 40, 581-600.

3. GRATIA (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge du 15 décembre 1945.  
 4. GRATIA (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 138.  
*Ann. Pasteur*, 1932, 48, 413.  
 5. EIJKMAN (C.). — *Cent. Bakt.*, I, 1904, 37, 436.  
 6. Mc LEOD (J. W.) et GOVENLOCK (P.). — *Lancet*, 1921, 200, 900.

## Pluralité et complexité des colicines,

par A. GRATIA et P. FREDERICQ.

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

En 1925, l'un de nous a observé et étudié l'antagonisme qu'un certain *Coli V* exerçait à l'égard d'une autre souche de *B. Coli*, dit *Coli*  $\phi$ , par ailleurs fort sensible à divers bactériophages (A. GRATIA [1]). Dans une note antérieure (A. GRATIA et P. FREDERICQ [2]), nous avons montré que le phénomène n'était pas un cas fortuit mais avait une portée générale puisque, déjà, une recherche relativement superficielle sur plusieurs centaines de selles ou urines pathologiques avait permis de trouver des *B. Coli* actifs dans environ 1/5 d'entre elles: Il est dès à présent certain que cette proportion augmentera notablement à la suite d'une recherche systématique approfondie actuellement en cours sur les selles normales ou pathologiques de provenances humaines ou animales les plus diverses. Semblablement, la souche de *Coli*  $\phi$ , encore qu'elle soit exceptionnellement sensible et qu'elle constitue ainsi le meilleur des réactifs, n'est pas seule à subir l'action antibiotique des *Coli* actifs: d'autres *B. Coli* sensibles, en effet, ont été isolés dans environ la moitié des selles examinées.

Il résulte, en outre, de ces recherches que tous les *Colis* actifs n'ont pas les mêmes potentialités: leur champ d'action sur les *Coli* sensibles est très variable d'une souche active à l'autre, et, mieux encore, telle souche active peut être elle-même sensible à telle autre. Il y a donc lieu de considérer dans ce phénomène d'antagonisme non pas seulement un seul antibiotique, l'ancien « principe V » (A. GRATIA; [1]), mais bien diverses variétés de substances antibiotiques analogues auxquelles nous avons donné le nom général de « Colicines » (A. GRATIA et P. FREDERICQ [2]). L'un de nous a plus particulièrement tenté une classification des souches actives d'après leurs propriétés biochimiques et leurs activités antibiotiques (P. FREDERICQ [3]). Il en résulte que, jusqu'à présent, il a pu grouper plusieurs centaines de souches actives sur le *Coli*  $\phi$  en huit catégories se caractérisant par des champs d'action spécifiquement distincts sur divers *Coli* sensibles. Cette pluralité des Colicines se trouve être actuellement établie sur un ensemble de critères que nous allons passer successivement en revue.

1. *Etendue du champ d'action des Colicines.* — Les divers types de *B. Coli* actifs primitivement différenciés grâce à leur activité spécifique sur les divers *Coli* sensibles, — chaque type ayant un champ d'action caractéristique, — peuvent l'être aussi par l'étude de leur activité sur les *Shigella* et les *Salmonella*. Sans entrer dans les détails de cette recherche qui est systématiquement poursuivie, contentons-nous de dire que, par exemple, trois des catégories de *Coli* actifs (I, II et VI) ont un champ d'action extrêmement étendu leur permettant d'agir sur divers *Shigella*, sur le Paratyphique B et sur un grand nombre de *Salmonella* de provenance animale, tandis que les cinq autres catégories n'ont qu'un champ d'action très réduit.

2. *Sélection spécifique, par les Colicines, des individus résistants.* — Déjà, autrefois, l'un de nous avait montré que soumis à l'action du principe V, une culture de *Coli*  $\phi$  était totalement inhibée à l'exception de quelques rares individus donnant des colonies isolées résistantes à cet antibiotique tout en restant sensibles à un certain bactériophage actif sur le même *Coli*  $\phi$ ; et, réciproquement, les colonies résistantes à ce bactériophage restaient sensibles au principe V (A. GRATIA [1]).