

3. GRATIA (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, Séance belge du 15 décembre 1945.
4. GRATIA (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 138.  
*Anr. 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 diverses *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]).

La même résistance spécifique de certains individus de *Coli*  $\phi$  s'observe à l'égard de chacun des autres types de *Coli* actifs, de sorte que telle colonie résistante à l'action de la Colicine qui l'a sélectionnée, reste sensible à l'action d'une autre Colicine et réciproquement. Une étude plus approfondie de cette résistance sélective a été spécialement poursuivie par l'un de nous et lui a grandement servi à faire le groupement des *B. Coli* actifs dans l'une ou l'autre des catégories fondamentales. Elle lui a aussi révélé l'existence de complexes de Colicine ; certaines colonies étaient résistantes à l'action de plusieurs types de *B. Coli* actifs tandis que d'autres, placées à la périphérie des plages d'inhibition, n'étaient résistantes qu'à un type de *B. Coli* tout en restant sensibles à un autre (P. FREDERICQ [3]). Il y a lieu de faire à cet égard la discrimination entre des influences qualitatives déterminées par la variété de la Colicine en jeu et d'autre part d'influences quantitatives déterminées, pour chaque Colicine, par sa concentration relative. L'un de nous a, en effet, montré jadis que des individus de *Coli*  $\phi$  résistants à une dilution donnée de « principe V » restaient sensibles à une concentration dix fois plus forte de ce principe (A. GRATIA [1]).

Rappelons en passant qu'en 1939, M<sup>me</sup> DEMELENNE-JAMINON [4] a distingué parmi les résistants de *Coli*  $\phi$  au principe V, deux types de colonies, les premières ne se distinguant en rien des colonies normales si ce n'est par leur résistance, les secondes pouvant passer inaperçues tant elles sont minuscules et restant, chose curieuse, héréditairement naines malgré de très nombreux repiquages.

3. *Diffusion des Colicines dans la gélose.* — Si, comme l'un de nous l'avait déjà fait pour l'action antibiotique du *B. Pyocyanique* (P. FREDERICQ [5]), on ensemence une strie de *Coli* actif d'un côté d'une boîte de PETRI contenant de la gélose nutritive puis que, perpendiculairement à cette strie active, on ensemence une strie de *Coli*  $\phi$  sensible chaque jour pendant une semaine, on observe que la distance sur laquelle les stries successives de *Coli*  $\phi$  sont inhibées, augmente régulièrement. En joignant par une ligne les points extrêmes de cette inhibition croissante, on obtient une courbe tout à fait constante, caractéristique de la diffusion de la Colicine produite par le *Coli* actif considéré et spécifiquement différente pour chacun des types de *Coli* actifs. Cette courbe qui peut donc contribuer à identifier un germe actif pourra en outre servir au calcul de la grandeur moléculaire des Colicines.

4. *Concentration des Colicines en milieu liquide.* — Ensemencé en bouillon ordinaire, le *Coli* V y produit au cours de son développement des quantités importantes de « principe V » dont l'activité peut se manifester jusqu'à la dilution de  $10^{-3}$  et parfois plus. Ces quantités, bien entendu, varient selon la richesse du milieu de culture, selon la vitalité des germes ensemencés, selon l'âge de la culture, etc... (A. GRATIA [1]). Si l'on ensemence en bouillon les différents types de *Coli* actifs dans des conditions optimales identiques, on constate que le titre d'activité maximum atteint après 48 heures dans le liquide ambiant, varie d'un type à l'autre entre plus ou moins  $10^{-2}$  pour les uns et plus ou moins  $10^{-3}$  pour les autres. Chose curieuse, ce n'est pas nécessairement le type dont la Colicine diffuse le plus loin en donnant sur gélose la zone d'inhibition la plus étendue qui produit, en bouillon, la concentration la plus élevée. Ceci pourrait s'expliquer par des différences dans la grosseur moléculaire des diverses Colicines, bien que ce ne soit pas nécessairement la seule cause possible.

5. *Thermorésistance des Colicines.* — Le « principe V » est thermostable et résiste à  $100^{\circ}$  (A. GRATIA [1]). C'est une caractéristique des Colicines produites par les *Coli* actifs du groupe I auquel appartient le *Coli* V, ainsi que des groupes II et VI. Par contre, les Colicines des autres groupes sont moins thermorésistantes et peuvent être altérées, voir même détruites par un chauffage à  $70^{\circ}$  pendant une 1/2 heure.

6. *Destruction des Colicines par des germes antagonistes.* — Exactement comme la pénicilline est détruite par la pénicillinase sécrétée par certains microbes, les Colicines sont détruites par des microbes antagonistes. Ceux-ci appartiennent à des espèces protéolytiques comme les *B. Proteus*, les *B. Subtilis* ou *Mesentericus*. Jusqu'à présent nous n'avons pas trouvé de bacilles antagonistes qui détruisent spécifiquement une Colicine anti-*Coli*  $\phi$  sans attaquer les autres. Il semble donc qu'à cet égard les diverses Colicines aient une constitution commune également vulnérable aux protéases microbiennes. Toutefois, ces mêmes bacilles antagonistes des Colicines anti-*Coli*  $\phi$

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 ensemence 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