

Rapport par E. MALVOZ, Professeur de Bactériologie à l'Université de Liège.

LES
ASSOCIATIONS MICROBIENNES
EN DEHORS DE L'ORGANISME

La pathologie s'est enrichie, dans ces dernières années, d'innombrables données sur les associations microbiennes découvertes au sein des organismes infectés.

Ces notions ont éclairé puissamment la compréhension des processus morbides si divers et si variés qui s'observent au cours des maladies microbiennes. Mais le clinicien et l'expérimentateur ne peuvent se contenter de la simple constatation des associations bactériennes. Ce qui leur importe surtout, c'est l'explication des actions réciproques qui s'établissent entre les microbes en présence, les directions différentes imprimées à leur activité par le fait de leur association, la nature des produits élaborés dans ces conditions nouvelles. La réponse aux questions multiples ainsi soulevées devait être demandée d'abord aux expériences *in vitro*. Certes, il ne peut s'agir d'assimiler ce qui se passe dans un bouillon de culture ensemençé avec deux ou plusieurs espèces microbiennes, et ce qui s'observe quand ces dernières évoluent côte à côte dans l'organisme malade. Mais, de même que l'étude scientifique des maladies infectieuses n'a pu être abordée qu'après la mise en lumière des caractères des cultures artificielles et des produits qui s'y rencontrent, de même la grande question des associations microbiennes doit être éclairée d'abord par les notions tirées de l'expérimentation *in vitro*.

C'est ce que tous les pathologistes ont compris, et la littérature fourmille véritablement de travaux entrepris dans cette direction.

Comme pour la plupart des questions bactériologiques, c'est le nom de Pasteur que l'on retrouve à l'origine de ces recherches. La première observation d'associations microbiennes lui est due. Dès 1863, il avait déjà compris la haute importance des phénomènes de symbiose : dans les liquides en putréfaction, les bacilles aérobies

évoluent d'abord, déblayant le terrain des dernières traces d'oxygène ; celui-ci disparu, les germes anaérobies se mettent à proliférer à leur tour.

Ce fut encore Pasteur qui fit connaître le premier exemple des actions réciproques que l'on observe en mettant en présence deux microbes pathogènes. En 1877, en collaboration avec Joubert, Pasteur montra l'arrêt de développement du bacille du charbon dans les milieux de culture additionnés d'autres bactéries. Son génie perspicace avait parfaitement saisi toute l'importance de cette constatation pour la thérapeutique : il y avait là, en germe, la *bactériothérapie*, c'est-à-dire la possibilité de la guérison d'une maladie infectieuse par un microbe différent de l'agent pathogène en cause.

Plus tard, en 1880, Pasteur apportait un autre fait du même genre à l'appui de ce qu'il appelait les *antagonismes microbiens* : le bacille du charbon se développe à peine dans un milieu nutritif où a proliféré déjà le microbe du choléra des poules.

Mais ces observations restaient isolées.

Ce ne fut que plusieurs années après que Koch signala un nouvel exemple de concurrences microbiennes : les microbes de la putréfaction, affirmait-il, détruisent rapidement le vibrion cholérique.

C'est à partir de 1887 seulement que l'on saisit nettement le rôle général des associations microbiennes en pathologie ; les études expérimentales ont fait, depuis cette époque, l'objet de travaux extrêmement nombreux.

Il serait même impossible de les citer tous, d'autant plus qu'ils concernent non seulement le rôle des associations en pathologie, mais qu'un bon nombre de ces recherches intéressent directement l'hygiène et même l'agronomie. Les grands phénomènes de la destruction de la matière organique et de sa minéralisation, la nitrification du sol, l'épuration des eaux courantes, etc., sont dus à des associations d'infiniment petits se prêtant un mutuel appui.

Il ne sera question ici que des faits pouvant intéresser le médecin.

Il y a plusieurs façons d'étudier *in vitro* les associations microbiennes. On peut ensemençer dans un milieu nutritif vierge deux ou plusieurs espèces bactériennes. On peut prendre une culture au sein de laquelle a déjà proliféré un microbe, et observer le sort d'une espèce nouvelle que l'on y ensemenç. Au lieu de la culture elle-même contenant encore des microbes vivants, on peut étudier l'influence de ses produits de désassimilation obtenus par filtration.

Il est inutile d'insister sur les grandes différences qui seront notées

dans les résultats des essais, suivant que l'on adoptera telle ou telle méthode.

Les expérimentateurs qui ont étudié ces questions se sont malheureusement placés dans des conditions très différentes : c'est au point qu'il existe bien peu de travaux comparables, et on peut dire qu'il n'est pas un chapitre plus difficile à éclaircir que celui des associations microbiennes *in vitro*.

Ce qui est certain, c'est que les microbes ou leurs produits réagissent fortement les uns sur les autres. Mais la nature des modifications observées est des plus variées. Tantôt l'association de deux microbes est fatale pour l'un d'eux : le développement de ce dernier est paralysé, parfois même le microbe le plus faible est détruit. Tantôt, sans que les facultés de prolifération soient modifiées, en apparence au moins, la virulence de l'un des microbes est plus ou moins diminuée ou complètement perdue. Le contraire peut s'observer, c'est-à-dire que l'on constate des exaltations de virulence par symbiose microbienne.

Il est d'autres cas où l'on note, soit par l'association de deux microbes, soit par l'addition à une culture bactérienne des produits d'une autre, de profonds changements dans l'activité chimique normale des infiniment petits : fonctions zymogène, toxicogène, chromogène, etc., sont complètement déviées.

Quelques exemples montreront l'infinie variété de ces phénomènes.

D'après Garré (1887), un milieu de culture dans lequel a proliféré le *Bacillus fluorescens putidus* est devenu complètement impropre au développement du bacille typhique, du pneumocoque de Friedländer, du *Staphylococcus pyogenes aureus*.

MM. Chantemesse et Widal ont montré (avril 1887) que si l'on sème du bacille typhique à la surface d'un tube de gélatine et que si, au bout de quelques jours, on enlève avec un couteau de platine, la culture qui s'est développée, un nouvel ensemencement du bacille typhique ne donne lieu à aucun développement sur la surface ainsi détergée, qui est comme vaccinée contre lui. M. Würtz (décembre 1891) a montré que, si le milieu était réfractaire envers le bacille typhique, il ne l'était pas envers d'autres microbes, tels que le colibacille, et a tiré de ce fait un procédé de différenciation des deux microbes.

Freudenreich (1889) affirme que les bouillons du *Bacillus pyocyaneus*, du microbe du lait bleu, du *Bacillus prodigiosus*, du *Bacillus phosphorescens* et du vibrion cholérique, s'opposent au développement d'un grand nombre d'autres microbes, tandis que l'on voit la plupart des microorganismes proliférer facilement dans les

bouillons typhique, charbonneux, etc. Mais il existe, de plus, quelques bactéries dont la culture est inféconde seulement pour une espèce déterminée : c'est un antagonisme spécifique. Freudenreich cite l'exemple du bacillus pyogenes fetidus, antagoniste du vibron cholérique.

Dochle (1889), contrairement à Emmerich (1887), signale le coccus de l'érysipèle comme antagoniste du bacillus anthracis.

Pawlowsky, Beco (1895), d'autres encore, ont étudié l'influence sur le charbon d'autres microorganismes, tels que le micrococcus prodigiosus, la levure de bière, le phylococcus pyogenes, etc., et décrit les modifications prononcées que l'on observe ainsi dans le développement du bacillus anthracis.

Des recherches particulièrement intéressantes sont celles de Kitasato (1889) et Gruber (1887). Contrairement à l'opinion de Koch, ces savants affirmèrent que le bacille virgule du choléra contrarie le développement d'un grand nombre d'autres microbes, notamment de beaucoup d'espèces saprophytiques; il n'y avait guère que le bacillus pyocyanus et le bacille lactique (et encore en culture sur lait seulement) qui se montraient capables de s'opposer à la prolifération du coma-bacille.

On sait l'admirable parti que Metschnikoff (1894) a tiré des constatations qu'il a faites *in vitro* sur les antagonismes microbiens, pour l'explication de la sensibilité ou de l'état réfractaire au choléra. Metschnikoff a retiré de l'intestin de certains animaux des microbes qui paralysent la multiplication du bacille virgule de Koch.

Mais tous ces faits concernent l'arrêt de développement d'un microbe par un autre.

On possède d'assez nombreux exemples de prolifération microbienne favorisée par la présence d'un autre micro-organisme.

D'après Sirotinin (1888), le charbon se développe mieux que dans les conditions normales si l'on ensemence ce microbe sur un milieu où a poussé le proteus, mais la virulence n'est pas modifiée.

Le bacille diphtérique se développe mieux dans le bouillon streptococcique (Bernheim).

Metschnikoff (1894) attribue à certains microbes du tube digestif, notamment à une levure et à une sarcine, le pouvoir d'activer la prolifération du vibron cholérique.

Penzo (1891), reprenant les anciennes observations de Pasteur, a signalé ce fait très intéressant que l'on peut arriver à obtenir, en présence de l'oxygène de l'air, la multiplication du bacille de l'œdème

malin, microbe très anaérobie, à condition de l'ensemencer concurremment avec des aérobies puissants comme le bacillus prodigiosus, le proteus vulgaris.

Un certain nombre d'expériences démontrent l'action profonde des associations microbiennes, non plus sur la prolifération des germes pathogènes, mais sur leur virulence.

Charrin et Guignard (1889) ont prouvé que le bacille pyocyanique atténué considérablement la virulence du charbon. Si, dans des cultures charbonneuses, on ensemence le bacille du pus bleu, on voit la virulence du charbon s'atténuer de plus en plus et même se perdre complètement.

Zagari (1887) avait déjà signalé la perte de la virulence du charbon dans les cultures stérilisées du choléra; d'après Kostjurin (1891), la virulence du bacille de Davaine se perdrait dans les bouillons additionnés d'extraits de substances en putréfaction.

Mais l'exaltation de la virulence peut être la conséquence des associations bactériennes.

Roncali (1893) a découvert, dans cet ordre de recherches, des faits vraiment curieux. Si l'on sème sur des milieux de culture additionnés de toxine tétanique, certains microbes pathogènes, mais doués d'une très faible virulence, on voit celle-ci augmenter dans de fortes proportions. C'est ainsi que le bacillus canaliculicida qui, ordinairement, n'est pas pathogène pour les cobayes, devient capable dans ces conditions de les faire mourir par véritable septicémie. Il y a plus: des microbes non pathogènes, tels que le bacillus prodigiosus, le bacillus cyanogenus, le bacillus fluorescens, gagnent une certaine virulence quand on les ensemence sur des substrata additionnés de toxine du tétanos.

Klein (1893) a vu la virulence du streptocoque s'exalter considérablement par des ensemencements sur des milieux tuberculins. D'après Bernheim (1894), le bacille diphtérique acquiert une virulence extraordinaire à la suite de cultures en filtrats de streptocoques.

Pisenti et Bianchi-Moretti (1894) ont vu la virulence du colibacille s'accroître en présence des produits du bacillus typhosus, et Mosny (1895) a fait la même constatation pour le pneumocoque cultivé dans des bouillons staphylococciques.

Enfin, Metschnikoff, ayant pris des bacilles cholériques très atténués, leur a rendu une forte virulence au moyen de cultures additionnées de ses microbes dits favorisants.

Il faut maintenant dire un mot d'une autre série de recherches,

dont les résultats relativement importants doivent frapper, non seulement ceux qui s'occupent de chimie biologique, mais aussi les pathologistes. Ce sont des expériences sur les associations microbiennes en culture, montrant l'activité chimique de deux ou plusieurs microbes complètement transformée et déviée même, du fait de leur coexistence dans le substratum nutritif. Les plus beaux travaux de cet ordre sont dus à Nencki (1892).

Ce savant a découvert deux bactéries capables de sécréter en abondance, quand elles sont associées, un produit chimique *nouveau* qu'aucune des deux n'élabore quand elle est seule. Il s'agit de cultures mixtes du microbe du charbon symptomatique et d'un anaérobie facultatif. Le microbe du charbon symptomatique, à lui seul, transforme le sucre de raisin en acide butyrique normal, acide acétique, acide lactique optiquement inactif, avec formation d'acide carbonique et d'eau. L'anaérobie facultatif transforme le glycose en acide paralactique. Quand on associe ces deux microbes en culture glycosée, on obtient, outre tous ces produits, un corps nouveau et très abondant, l'alcool butylique.

Une observation comparable appartient à Burri et Stutzer (1894) : ils ont étudié le développement du coli-bacille et d'un microbe isolé des fèces du cheval, sur des milieux contenant des nitrates. Aucun de ces deux microbes, à lui seul, n'attaque les nitrates, mais associées, les deux bactéries les décomposent complètement.

Winogradsky a signalé des faits de même ordre très importants pour l'épuration du sol. Mais on a vu des résultats tout différents. Nencki a décrit deux microbes très particuliers : chacun d'eux a le pouvoir de décomposer fortement l'albumine ; associés, ils perdent complètement cette propriété.

D'après Cacace (1893), le bacille cholérique perd la propriété de fabriquer de l'indol si on le cultive pendant quelque temps sur des milieux où a proliféré le coli-bacille. Malvoz (1895) a décrit des coli-bacilles presque complètement éberthisés qu'il avait retirés de l'intestin des cholériques de l'épidémie de Liège : les propriétés zymogènes du bactérium-coli étaient supprimées, par sa présence dans les sécrétions du coma-bacille.

Il faut encore citer, à titre d'exemple d'associations microbiennes où l'activité chimique normale est complètement modifiée, les expériences de Mühsam et Schimmelbusch (1893). Ces savants ont réussi à supprimer ou à modifier la fonction chromogène du bacille du pus bleu, le microbe restant d'ailleurs parfaitement vivant, par l'addition aux cultures de certains microbes.

On comprendra toute l'importance de ces différentes constata-

tions si on les applique aux microbes pathogènes proprement dits. Ce sont d'ailleurs les travaux de Nencki qui ont inspiré son élève v. Schreider (1892), auquel on doit l'étude de la symbiose du bacille diphtérique et du streptocoque : cette association a pour effet de modifier les activités chimiques du bacille de Loeffler qui, dans ces conditions, sécrète une toxine beaucoup plus active.

Il y a là un vaste champ ouvert à l'activité des chercheurs, soit qu'il s'agisse d'obtenir des toxines très puissantes, dans un but d'immunisation et de séro-thérapie, soit qu'on veuille, au contraire, supprimer la fonction toxicogène de l'un ou l'autre microbe par une association bactérienne.

Ces quelques considérations suffiront pour montrer l'importance de l'étude des associations microbiennes *in vitro*.

Les faits acquis sont déjà très nombreux. Si l'on se demande quelles sont les causes des phénomènes observés, on se trouve très embarrassé.

Il y a d'abord plus d'une contradiction entre les divers expérimentateurs. Comment s'expliquer, par exemple, que Sirotinin ait constaté la poussée facile du charbon en gélatine cholérique, alors que Freudreich décrit un arrêt de développement. D'après Kitasato, ce sont les streptocoques qui succombent en présence du bacille cholérique ; Turro affirme le contraire ! Il est certain que les conditions d'expériences étaient très différentes d'un savant à l'autre. La virulence, l'activité prolifératrice, la sensibilité d'un même microbe, sont très variables, suivant son origine, son ancienneté, la température à laquelle il a été maintenu, etc., etc. De plus, tandis qu'un expérimentateur ensemait deux microbes en même temps dans un milieu vierge, un autre étudiait l'influence sur l'un des germes des produits déjà formés de l'autre.

On conçoit que les résultats de l'association soient tout différents dans des conditions pareilles. Le choix du milieu de culture est également très important : c'est ainsi qu'en bouillon, ensemencé de *Bacterium coli* et de vibron cholérique, c'est celui-ci qui l'emporte ; dans le lait, c'est tout le contraire, et cela parce que le *Coli-bacille* y sécrète, aux dépens du lactose, de l'acide lactique qui contrarie fortement le *Coma-bacille*.

Dans les expériences où l'on étudie l'influence des produits d'un microbe sur le développement d'un autre, le choix du procédé de stérilisation joue un rôle dont il n'a pas toujours été tenu

compte. Blagovetschensky a montré que le bouillon pyocyanique stérilisé par la chaleur modifie fortement le bacille du charbon; au contraire, le bouillon stérilisé par filtration ne présente pas cette action.

Avons-nous une idée des causes elles-mêmes de l'antagonisme ou de la symbiose? Certains résultats doivent être mis sur le compte des changements de réaction apportés au substratum nutritif: l'élaboration de produits acides ou alcalins par l'un des germes influence favorablement ou défavorablement l'autre microbe.

Mais il est des cas où ces modifications de la réaction n'expliquent rien: l'antagonisme, par exemple, peut encore être observé si on restitue la réaction primitive. On doit bien dès lors recourir à l'intervention de produits de sécrétion, bactéricides, gênant plus ou moins la prolifération de l'un des microbes en présence.

Quant à l'explication des phénomènes de symbiose proprement dite, où l'on voit, par exemple, comme dans les recherches de Nencki, deux microbes associés sécrétant un produit nouveau, avouons que nous n'en avons pour le moment aucune idée!

Si tous ces phénomènes observés *in vitro* sont loin d'être faciles à interpréter, quelles difficultés ne rencontre-t-on pas quand il s'agit de se rendre compte de ce qui se passe dans les associations microbiennes constatées dans l'organisme malade!
