le pouvoir antibiotique in vitro d'un agent tensioactif : le TP 7136

Autor(en): **Piguet, Jean-Daniel**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **68 (1962-1964)**

Heft 306

PDF erstellt am: **23.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-275422

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Le pouvoir antibiotique *in vitro* d'un agent tensioactif : le TP 7136 *

PAR

JEAN-DANIEL PIGUET

Institut de bactériologie, de parasitologie et d'hygiène, Lausanne

INTRODUCTION

Au cours de recherches effectuées à l'Institut d'hygiène de Lausanne, et consacrées à l'étude de l'action exercée par divers agents tensioactifs sur la lyse des Mycobactéries par le bactériophage, nous avons constaté que l'un d'entre eux, le TP 7136, possède un net pouvoir bactériostatique sur les germes appartenant à ce genre.

Les propriétés antibiotiques de plusieurs mouillants sont connues et ont déjà été décrites ; elles ne sont, semble-t-il, pas liées aux propriétés physiques de ces composés.

Les agents tensioactifs abaissent la tension superficielle des liquides dans lesquels ils sont dissous ; cette propriété est due à la présence, dans leurs molécules, de groupements hydrophiles et lipophiles, la partie active du mouillant étant constituée par une longue chaîne hydrocarbonée. On sait que les agents tensioactifs se divisent en trois catégories, selon leur structure chimique. Les uns sont non ioniques ; les autres sont ioniques, et parmi eux on distingue les mouillants anioniques, dont la partie active de la molécule est chargée négativement en solution aqueuse, et les mouillants cationiques, dont la partie active se charge positivement.

On admet généralement que les mouillants cationiques possèdent un net pouvoir bactéricide (1, 2, 3). Ce pouvoir existe également, bien qu'à un moindre degré, chez les mouillants anioniques (4), alors qu'il semble être totalement absent chez les mouillants non ioniques (5), qui peuvent même, dans certains cas, se comporter comme des facteurs de croissance pour les moisissures (2).

* Le TP 7136 utilisé au cours de ces recherches a été aimablement fourni par Shell Switzerland, Zurich. D'autre part, la Shell International Chemical Company Limited, Londres EC3, a bien voulu prendre à sa charge les frais d'impression de cette note.

Or le TP 7136 appartient à la classe des mouillants non ioniques ; il semble donc faire exception à cette dernière règle. L'étude des propriétés antibiotiques *in vitro* de ce composé a permis d'obtenir un certain nombre de résultats, qui sont donnés dans les pages qui suivent.

Le TP 7136

Comme tous les agents tensioactifs non ioniques, le TP 7136, appelé également « Nonidet P 40 », est un composé très stable, aussi bien dans les solutions neutres que dans les acides et dans les bases. Il ne forme pas de précipité quand on le mélange avec des matières protéiques. Enfin, il ne modifie pas le pH des milieux de culture auxquels il est ajouté.

Au point de vue chimique (6), c'est un condensé d'oxyde d'éthylène et d'alkyl-phénol.

Il se présente sous la forme d'un liquide visqueux jaune pâle, de densité 1,06. Il est miscible en toutes proportions avec l'eau, et donne une solution neutre. Il est également soluble dans d'autres liquides, et en particulier dans l'alcool, l'éther, l'acétone et le benzène.

Il possède, comme d'ailleurs tous les mouillants de ce type, la propriété de donner des solutions troubles dans l'eau à partir d'une certaine température, appelée le « cloud-point ». Par exemple, une solution à 0,1 % se trouble à 46°. Le « cloud-point » varie avec la présence de sels dissociés électrolytiquement, et il s'élève quand la concentration en mouillant s'élève.

Si on laisse refroidir la solution ainsi troublée, il se forme deux couches liquides distinctes, le TP 7136 allant au fond du récipient, à cause de son poids spécifique plus élevé que celui de l'eau.

Mais on obtient à nouveau un mélange homogène par simple agitation. On doit prendre garde à ce phénomène lorsqu'on stérilise à chaud des solutions de TP 7136, et il faut avoir soin d'agiter le produit avant de l'employer.

Le TP 7136 résiste au chauffage en milieu aqueux, ce qui permet de le stériliser à l'autoclave à 120° sans pour cela changer ses propriétés.

Le TP 7136 est employé comme détergent, comme mouillant et comme émulsifiant. C'est ainsi qu'on en fait un large emploi dans l'industrie textile. On peut également le mélanger avec des bases quaternaires pour obtenir un détergent doué de propriétés antiseptiques. Enfin, on l'utilise dans l'industrie des cosmétiques pour émulsionner les corps gras.

Spectre d'action

La détermination du spectre d'action, dont le but est de distinguer les souches sensibles des souches résistantes, est simple en principe. Il se pose néanmoins un problème : il s'agit de fixer la limite existant entre

ces deux catégories de souches. Les bactéries dont la croissance est arrêtée ou ralentie par l'antibiotique seront déclarées sensibles, tandis que les autres seront considérées comme résistantes. Mais il importe de savoir à quelle concentration d'antibiotique les essais doivent être faits. Il se peut en effet qu'une souche résistant à une certaine dose de la substance soit en fait sensible à une concentration plus élevée. Dire qu'une souche est résistante à un antibiotique n'a aucun sens si l'on ne précise pas la concentration utilisée. Cette concentration limite séparant bactéries sensibles et bactéries résistantes doit être choisie de façon arbitraire.

Dans le cas du TP 7136, nous l'avons fixée à 2 mg/cc, en déclarant sensibles les souches dont la croissance est arrêtée par une telle concentration du produit, et résistantes celles qui peuvent se développer malgré la présence de l'antibiotique. On verra par la suite que des souches qui résistent à 2 mg/cc résistent en réalité à des concentrations beaucoup plus élevées.

Nos essais ont porté sur un certain nombre de souches du Centre international de collections de cultures de Lausanne (CICC) *.

Chaque souche a été ensemencée dans deux tubes, l'un contenant du TP 7136 en solution à 0,2 % dans du bouillon, et l'autre contenant du bouillon seul, à titre de témoin. Les essais portant sur les bacilles tuberculeux ont été faits selon le même principe dans du milieu de Dubos.

Les résultats sont les suivants :

SOUCHES SENSIBLES

CICC N°	Nom
—	*Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (deux souches provenant du Service des analyses de l'Institut d'hygiène)
908	*Mycobacterium friburgensis*
909	*Mycobacterium smegmatis*
99	*Staphylococcus citreus*
163, 164	*Streptococcus pyogenes*
250, 251, 253, 254	*Bacillus anthracis*
267, 268, 927, 928	*Bacillus subtilis*
199	*Bacillus brevis*
261	*Bacterium mycoides* var. *citreus*
491, 751	*Corynebacterium diphteriae*
20	*Corynebacterium pseudodiphtericum*
263	*Corynebacterium cutis commune*

* Ce centre a pris récemment le nom de « Centre international de distribution de souches et d'informations sur les types microbiens ».

SOUCHES RÉSISTANTES

CICC N°	Nom
312	*Salmonella typhi*
300, 361	*Salmonella typhi murium*
332, 377	*Salmonella paratyphi A*
341, 353	*Salmonella paratyphi B*
275, 301	*Salmonella paratyphi C*
370	*Shigella dysenteriae*
665	*Shigella paradysenteriae*
358, 376, 393	*Shigella flexneri*
355, 356	*Shigella sonnei*
517, 518	*Shigella boydii*
414, 438, 516	*Pseudomonas aeruginosa*
452, 453	*Proteus vulgaris*
337, 457	*Proteus morganii*
398, 409	*Escherichia coli*
444, 445	*Klebsiella pneumoniae*
228	*Brucella abortus Bang*
118, 128	*Staphylococcus albus*
107, 114, 654, 655	*Staphylococcus aureus*
209, 210, 211, 212	*Diplococcus pneumoniae*
168	*Streptococcus viridans*
387	*Micrococcus flavus*
492, 756	*Corynebacterium diphteriae*

L'action du TP 7136 est donc assez limitée, puisque toutes les bactéries gram négatives examinées sont résistantes, de même que plusieurs souches de bactéries gram positives. Seuls parmi les germes étudiés, ceux qui appartiennent aux genres *Mycobacterium* et *Bacillus* ne se trouvent pas dans la liste des souches résistantes.

Selon toute probabilité, les bactéries résistantes n'ont jamais été en contact avec le TP 7136. Leur résistance n'est donc pas le résultat d'une adaptation ou d'une sélection, comme c'est le cas pour certaines bactéries qu'on arrive à rendre résistantes en les mettant en contact avec des doses croissantes de l'antibiotique auquel elles sont initialement sensibles.

TITRAGE EN MILIEU LIQUIDE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DU TP 7136 SUR LES BACTÉRIES SENSIBLES

La détermination de la dose minimum d'antibiotique capable d'arrêter la croissance d'une souche donnée peut se faire facilement au moyen d'une méthode maintenant classique. On ensemence les bactéries dans une série de tubes contenant des doses croissantes d'antibiotique, dissous dans un milieu de culture convenable.

Le choix des différentes concentrations est arbitraire; la concentration maximum est généralement celle qui a été utilisée dans les essais d'orientation (détermination du spectre d'action). Un tube sans antibiotique sert de témoin ; enfin, le nombre de tubes utilisés est choisi en fonction de la précision qu'on désire obtenir.

De rapides mesures nous ont montré que toutes les souches reconnues comme sensibles à une concentration de 2 mg/cc étaient en réalité sensibles à des doses beaucoup plus faibles ; c'est pourquoi nous avons pu choisir comme limite supérieure la concentration de 250 µg/cc.

Les milieux de culture différant selon la nature des bactéries, nous décrirons séparément l'étude des Mycobactéries et celle des autres germes. Cependant, dans les deux cas, le principe est resté le même, et les concentrations suivantes de TP 7136 ont été utilisées : 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 150 et 250 µg/cc. Chaque essai est donc fait au moyen de 10 tubes contenant l'antibiotique et d'un onzième n'en contenant pas et servant de témoin. La préparation des tubes comprend trois phases :

1. Répartition du milieu de culture à raison de 4,5 cc par tube, puis stérilisation (dans le cas du milieu de Dubos, utilisé pour les bacilles tuberculeux, la stérilisation a lieu avant la mise en tubes, qui doit alors s'effectuer stérilement).

2. Préparation de solutions de TP 7136 dans de l'eau distillée, contenant respectivement 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800, 1200, 1500 et 2500 µg/cc. Ces solutions sont stérilisées à l'autoclave.

3. Au moment de l'emploi, on ajoute à un tube de bouillon 0,5 cc de solution stérile d'antibiotique.

Chaque série de tubes est ensemencée avec une souche. Le tout est maintenu à l'étuve jusqu'à ce que le témoin ait poussé abondamment.

a) *Bactéries non acido-alcoolo-résistantes*

Les résultats sont donnés dans le tableau 1 (voir page suivante).

Si, dans la plupart des cas, les résultats sont faciles à lire, il arrive cependant que la limite ne soit pas nette. Nous citerons la souche 250 *(Bac. anthracis)* à titre d'exemple. Pour que la culture soit totalement empêchée, il faut, comme on peut le voir dans le tableau ci-dessous, une concentration de 80 µg/cc. Mais l'action de l'antibiotique se fait déjà sentir à des doses plus faibles ; dans le tube contenant 10 µg/cc, la croissance est ralentie, dans une faible mesure, il est vrai ; l'aspect de la culture est du reste différent de celui que présente le témoin. Dans le bouillon pur, les bacilles forment un voile épais, tandis qu'en présence du TP 7136, ils ne poussent qu'en profondeur, parce que la tension superficielle du milieu de culture est abaissée.

TABLEAU 1

CICC N°	Nom	Pousse à (µg/cc)	Ne pousse pas à (µg/cc)
267	*Bac. subtilis*	150	250
268	*Bac. subtilis*	80	120
927	*Bac. subtilis*	80	120
928	*Bac. subtilis*	80	120
250	*Bac. anthracis*	60	80
251	*Bac. anthracis*	120	150
253	*Bac. anthracis*	30	40
254	*Bac. anthracis*	40	60
199	*Bac. brevis*	20	30
261	*Bact. mycoides* v. *citr.*	40	60
99	*Staphyl. citreus*	40	60
163	*Strept. pyogenes*	20	30
164	*Strept. pyogenes*	20	30
20	*Coryn. pseudodipht.*	40	60
263	*Coryn. cutis commune*	40	60
491	*Coryn. diphteriae*	20	30
751	*Coryn. dipht.* « Jebb »	10	15

Ce même phénomène peut du reste s'observer avec toutes les souches ayant tendance à former un voile en milieu liquide, comme par exemple les Mycobactéries.

b) *Mycobactéries autres que les bacilles tuberculeux*

Les essais préliminaires ayant montré que deux souches de bactéries appartenant à cette catégorie sont sensibles au TP 7136, nous avons titré leur sensibilité selon le principe énoncé plus haut ; en outre, 22 autres souches ont également été examinées.

On sait que la plupart de ces Mycobactéries, appelées parfois bacilles paratuberculeux, poussent dans les milieux de culture ordinaires ; par conséquent, le titrage de leur sensibilité peut se faire en bouillon. Cependant, comme souvent ces souches poussent lentement, il peut être avantageux de choisir un milieu plus favorable.

Il existe un moyen commode de favoriser la croissance des bacilles paratuberculeux. Cette méthode a été décrite par HAUDUROY en 1932. Elle consiste (7) en l'adjonction, à un milieu de culture ordinaire, d'une certaine quantité de mannite. La proportion la plus favorable semble être 5 %. Les cultures faites selon ce procédé sont abondantes, alors que des cultures parallèles, mais sans mannite, le sont beaucoup moins. Le temps nécessaire à la croissance n'est par contre pas diminué.

L'emploi d'un milieu de culture mannité pour le titrage de la sensibilité des bacilles paratuberculeux aurait donc l'avantage de donner des cultures plus abondantes, et par conséquent de faciliter la lecture des résultats. Malheureusement, le TP 7136, une série d'essais nous l'a montré, est insoluble à 37° dans les milieux contenant 5 % de mannite. Il semble que l'adjonction de mannite abaisse le « cloud-point » dans une mesure importante.

Nous avons dû par conséquent renoncer à l'emploi de la mannite, et les essais ont été faits en bouillon ordinaire, comme ceux qui ont déjà été décrits.

Les résultats sont donnés dans le tableau 2 (voir page suivante).

A trois exceptions près, les sensibilités mesurées sont toutes du même ordre de grandeur, ce qui est remarquable, car les origines des souches sont très variées.

Le cas de la souche 948 (*Mycob. abcessens*) mérite d'être mentionné à part. Cette souche, en effet, bien que plus résistante que les autres, est cependant sensible à l'action du TP 7136. Or, vis-à-vis des antibiotiques utilisés habituellement contre les Mycobactéries, elle fait preuve d'une très grande résistance, puisque sa croissance n'est arrêtée ni par le Rimifon à une concentration de 500 µg/cc, ni par la streptomycine à 1000 µg/cc, et ni par l'acide para-amino-salicylique (PAS) à 1000 µg/cc.

On est donc en présence d'un cas intéressant, celui d'une souche qui résiste aux antibiotiques usuels, mais qui est sensible à l'action du TP 7136. Ce fait est d'autant plus important que la souche en question est pathogène, bien que ses caractères culturaux la fassent ranger dans le groupe des bacilles paratuberculeux, qui sont appelés parfois Mycobactéries saprophytes.

c) *Bacilles tuberculeux*

Lors de la détermination du spectre d'action, les deux souches de bacilles tuberculeux humains examinées avaient été reconnues sensibles. Ces deux souches, ainsi qu'un certain nombre d'autres, ont été titrées ;

TABLEAU 2

CICC N°	Nom	Pousse à (µg/cc)	Ne pousse pas à (µg/cc)
169	*Mycob. smegmatis*	30	40
170	*Mycob. smegmatis*	30	40
909	*Mycob. smegmatis*	30	40
1024	*Mycob. fortuitum*	80	120
1101	*Mycob. fortuitum*	80	120
171	*Mycob. phlei*	40	60
689	*Mycob. phlei*	40	60
60	*Mycob. graminis*	30	40
908	*Mycob. friburgensis*	30	40
948	*Mycob. abcessens*	80	120
75	*Mycob. sp.* (moustique)	40	60
800	*Mycob. sp.* (mouche)	40	60
801	*Mycob. sp.* (insecte)	40	60
904	*Mycob. sp.* (robinet)	30	40
824	*Mycob. sp.* (paille)	40	60
825	*Mycob. sp.* (sciure)	30	40
71	*Mycob. sp.* (terre)	20	30
70	*Mycob. sp.* (sable)	40	60
58	*Mycob. sp.* « Friedmann »	40	60
55/o	*Mycob. sp.* « Grassberger »	40	60
906	*Mycob. sp.* « Pellegrino »	30	40
907	*Mycob. sp.* « Rabinowitch »	30	40
970	*Mycob. sp.* « Schuster »	20	30
607	*Mycob. sp.*	30	40

en outre, des bacilles tuberculeux bovins et aviaires ont également fait l'objet de titrages. Les souches humaines ont été obtenues du Service des analyses de l'Institut d'hygiène ; les quatre souches aviaires et une souche bovine ont été reçues du CICC, deux autres souches bovines ont été aimablement mises à notre disposition par l'Institut Galli-Valerio, à Lausanne ; enfin, la souche de BCG a été obtenue par ensemencement du contenu d'une ampoule de vaccin pour scarifications de l'Institut Pasteur de Paris.

Pour le titrage des bacilles tuberculeux en milieu liquide, on a le choix entre le milieu de Sauton et celui de Dubos. Ce dernier a été préféré, parce que la croissance des bacilles y est relativement rapide ; il présente néanmoins un inconvénient sur lequel nous reviendrons : la présence de protéines neutralise partiellement l'action antibiotique du TP 7136. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Numéro	Nom	Pousse à (µg/cc)	Ne pousse pas à (µg/cc)
000125	*Mycob. tuberculosis* var. *hominis*	40	60
000159		40	60
000318		40	60
001102		40	60
001449		20	30
002354		40	60
004435		40	60
004442		40	60
004558		40	60
004749		40	60
004891		30	40
004897		40	60
005206		40	60
006140		40	60
006454		40	60
006455		40	60
006490		40	60
014514		40	60
096204-1 *		40	60
096204-2 *		40	60
—	BCG (Pasteur)	40	60
96688	*Mycob. tuberculosis* var. *bovis*	30	40
77505		30	40
613 (CICC)		30	40
9	*Mycob. tuberculosis* var. *avium*	60	80
603		120	150
604		40	60
609		150	250

* 096204-1 et 096204-2 sont deux filières nées de cellule unique et obtenues à partir de l'analyse 096204.

Discussion

Quand nous avons étudié le spectre d'action du TP 7136, nous avons signalé que les bactéries gram négatives examinées étaient toutes résistantes à 2000 µg/cc. Il est intéressant de savoir si ces germes sont sensibles à de plus fortes doses de cet antibiotique. Nos observations ont porté sur une souche de *Salmonella typhi murium* et sur une d'*Escherichia coli*. Ces bactéries ont été ensemencées dans du bouillon contenant 10 000 µg/cc et 100 000 µg/cc, c'est-à-dire dans des solutions à 1 % et à 10 % ; remarquons que de telles doses ne sont jamais utilisées avec les antibiotiques usuels. Les souches ont poussé malgré la présence de ces quantités considérables de TP 7136, et aussi abondamment que dans les témoins.

Si l'on se reporte aux tableaux 1, 2 et 3, on s'aperçoit que toutes les bactéries sensibles sont sensibles à une concentration de 250 µg/cc ou à moins, ce qui signifie que nous n'avons trouvé aucune souche qui pousse en présence de 250 µg/cc et dont la croissance soit arrêtée par une cencentration plus élevée. Or cette limite de 250 µg/cc correspond, au point de vue physique, à un point intéressant.

La propriété la plus importante des agents tensioactifs (c'est elle qui leur donne ce nom) est d'abaisser la tension superficielle du liquide servant de solvant. Cet abaissement dépend bien entendu de la nature du solvant ; il dépend également de la concentration du produit, mais il n'est pas proportionnel à cette concentration. Le tableau 4 donne, pour le TP 7136, quelques valeurs indiquées par le fabricant (6).

TABLEAU 4

Concentration en TP 7136 (g/litre)	Tension superficielle (dynes/cm)
0 (eau pure)	73,5
0,05	36,8
0,10	31,9
0,25	30,3
0,50	30,4

Comme on le voit, la tension superficielle la plus basse correspond à 0,25 g/litre, c'est-à-dire à 250 µg/cc. Si on augmente la concentration, la tension superficielle ne s'abaisse plus.

On peut par conséquent se demander si le pouvoir antibiotique du TP 7136 est dû à ses propriétés tensioactives.

En effet, si les bactéries étaient sensibles à l'abaissement de la tension superficielle, certaines souches y étant plus sensibles que d'autres, il

serait facile d'expliquer pourquoi on ne trouve aucune souche résistant à 250 μg/cc et sensible à une dose plus forte.

Un raisonnement rapide prouve que cette hypothèse est erronée. En effet, si les propriétés antibiotiques du TP 7136 étaient dues à l'abaissement de la tension superficielle, tous les agents tensioactifs devraient être des antibiotiques. Or on sait que la majorité des mouillants non ioniques n'ont pas d'action sur la croissance des bactéries. Le Tween 80, par exemple, est sans effet sur la souche 909 (*Mycobacterium smegmatis*) à une concentration de 3000 μg/cc, concentration 30 fois supérieure à celle qui est employée dans le milieu de Dubos.

ENGLER (2), en employant une autre méthode, a pu également montrer que le pouvoir toxique de certains mouillants n'a pas de rapport avec leurs propriétés tensioactives.

Il semble donc bien que c'est par pure coïncidence que le point où la tension superficielle est la plus basse et le seuil de sensibilité des bactéries correspondent à la même concentration de TP 7136.

TITRAGE EN MILIEU SOLIDE

Le titrage en milieu liquide donnant des résultats satisfaisants avec le TP 7136, il peut sembler superflu de répéter les essais en milieu solide. Cependant, il est intéresssant de comparer les deux méthodes, et de voir si les résultats qu'elles donnent sont identiques.

Deux techniques sont employées couramment pour le titrage de la sensibilité des bactéries en milieu solide. Dans la première, on incorpore l'antibiotique au milieu de culture ; dans la seconde, l'antibiotique sert à imbiber un petit disque de papier buvard qui est placé ensuite sur le milieu de culture ensemencé au préalable avec la bactérie dont on veut mesurer la sensibilité. Ces deux méthodes ont été essayées avec le TP 7136, pour un nombre restreint de souches.

a) *Antibiotique incorporé au milieu de culture*

Les concentrations de TP 7136 utilisées ont été les mêmes que celles qui avaient été employées en milieu liquide. Les souches 267, 268, 927, 928 (*Bacillus subtilis*), 250, 251, 253 et 254 (*Bacillus anthracis*) ont été titrées selon cette méthode. Dans trois des cas, les résultats ont été les mêmes que ceux qui avaient été obtenus en milieu liquide ; dans les cinq autres, les bactéries se sont montrées plus sensibles qu'en milieu liquide, la différence étant du reste minime.

b) *Méthode des disques*

Cette méthode, employée couramment dans les laboratoires d'analyses, présente l'avantage d'être très commode ; il ne faut cependant pas s'attendre à une grande précision dans les résultats. Suivant l'impor-

tance de la zone d'inhibition autour du disque, on peut désigner la souche comme peu sensible, moyennement sensible, très sensible ou résistante. Ces indications suffisent dans la pratique courante.

Nos essais ont porté sur trois souches : 253 (*Bacillus anthracis*) titrée sur gélose ordinaire, 55/o (*Mycobacterium sp.*), titrée sur milieu de Löwenstein, et 163 (*Streptococcus pyogenes*), titrée sur gélose au sang. Les disques sont trempés dans une solution stérile d'antibiotique ; ils sont ensuite employés soit tels quels, pendant qu'ils sont encore humides, soit après avoir été séchés à l'étuve. Quatre concentrations différentes de TP 7136 ont été employées. Les résultats sont donnés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

(Les chiffres indiquent les diamètres d'inhibition en mm)

Souche	Disque	Solution servant à imbiber les disques			
		500 µg/cc	1000 µg/cc	2000 µg/cc	100 000 µg/cc
253	sec	0	0	0	7
253	humide	0	6	8	10
55/o	sec	0	0	0	9
55/o	humide	0	0	0	9
163	sec	0	0	0	20
163	humide	0	0	0	23

Discussion

L'incorporation de TP 7136 à un milieu de culture solide permet le titrage des souches bactériennes avec la même précision que celle qui est obtenue en milieu liquide. Il semble toutefois que le titrage en milieu liquide soit plus commode à effectuer.

Par contre, la méthode des disques ne donne pas les résultats attendus, tout d'abord parce qu'elle est très peu précise, et ensuite parce qu'il faut des doses énormes d'antibiotique pour avoir une zone d'inhibition visible. Enfin, on remarquera que la souche la plus sensible (163) n'est pas inhibée par les disques imbibés au moyen d'une solution à 2000 µg/cc, tandis que la souche 253, qui est moins sensible, est inhibée à la même concentration. Ces irrégularités proviennent sans doute de la nature du milieu de culture employé, qui est différent pour chaque souche. Elles doivent faire renoncer à l'emploi de cette méthode.

Acquisition de la résistance au TP 7136

On sait que certaines bactéries, primitivement sensibles à un antibiotique, peuvent devenir résistantes. Cette acquisition de la résistance peut être spontanée ou provoquée artificiellement. Ainsi, un grand nombre de souches de Staphylocoques, autrefois très sensibles à la pénicilline, sont maintenant résistantes à cet antibiotique. L'existence de souches de bacilles tuberculeux résistant au Rimifon est également un fait connu. Mais il est aussi possible de provoquer en laboratoire l'apparition de la résistance chez des souches sensibles. Le succès de l'opération dépend à la fois de l'antibiotique et du germe. Dans le cas des bacilles tuberculeux, on est arrivé (8) à cultiver en présence de 100 µg/cc de Rimifon une souche initialement sensible à 1 µg/cc.

Nous avons fait quelques essais en vue de déterminer si des souches sensibles au TP 7136 pouvaient être rendues résistantes.

Trois germes différents ont été utilisés : le BCG de l'Institut Pasteur, sensible, comme on l'a vu, à 60 µg/cc ; la souche 55/o (*Mycob. sp.*), sensible à 60 µg/cc ; enfin, la souche 163 (*Strept. pyogenes*), sensible à 30 µg/cc.

La technique employée est très simple. Il suffit d'ensemencer le germe dans un milieu favorable contenant une dose d'antibiotique inférieure à la dose bactériostatique, puis, au cours de repiquages successifs, d'augmenter peu à peu la dose, en ayant soin d'attendre que la culture soit abondante avant d'effectuer le repiquage suivant. Si, au cours de l'opération, on constate que la culture se fait moins facilement, on utilise à nouveau une dose d'antibiotique un peu plus faible, avant de l'augmenter une fois encore.

Résultats

a) *BCG*

La souche, sensible initialement à 60 µg/cc, ne pousse que très lentement en présence de 30 µg/cc. Il faut en effet 10 jours pour obtenir une culture aussi abondante que celle poussant en 5 jours dans le milieu de Dubos pur. Malgré un grand nombre de repiquages, il est impossible d'augmenter cette vitesse de croissance. Si cette culture est ensemencée dans un milieu contenant 40 µg/cc, la nouvelle culture est non seulement lente, mais elle n'est jamais aussi abondante que le témoin, et ceci en dépit de nombreux repiquages. Enfin, si cette dernière culture est repiquée en présence de 60 µg/cc, dose à laquelle la souche est initialement sensible, on n'obtient pas de culture. Là encore, le résultat ne change pas même si l'on fait de nombreux repiquages.

b) *Souche 55/o*

Les résultats obtenus avec cette souche ne sont pas différents de ceux donnés par le BCG. S'il est facile d'obtenir, en faisant plusieurs repiquages, une culture abondante de la souche 55/o en présence de 30 µg/cc, la culture en présence de 40 µg/cc est moins bonne, et, avec des doses supérieures, il n'y a pratiquement plus de culture.

c) *Souche 163*

Le cas de cette souche est assez remarquable ; lors du titrage, en effet, on remarque que la souche 163 se comporte différemment des autres. L'action du TP 7136 est brusque : la culture est abondante à 20 µg/cc, alors qu'elle est nulle à 30 µg/cc. Quand on titre d'autres souches, on voit que la limite est beaucoup moins nette.

En employant la technique décrite plus haut, on peut, en faisant un certain nombre de repiquages, obtenir une culture abondante en présence de 40 µg/cc. Il s'agit donc d'une adaptation, puisque la souche originale ne pousse pas en présence de 30 µg/cc. Au-dessus de cette limite de 40 µg/cc, le phénomène change d'aspect. En effet, si on repique la culture résistant à 40 µg/cc dans un milieu contenant 60 µg/cc, on obtient une culture, abondante elle aussi ; mais si on fait un second repiquage dans un milieu contenant la même concentration de TP 7136, on n'obtient pas de culture. Il ne s'agit pas d'une erreur de technique, car si l'on reprend l'opération dès le début, on arrive à nouveau facilement à 60 µg/cc, mais le deuxième repiquage ne pousse pas.

Si le contenu du deuxième tube à 60 µg/cc est repiqué en bouillon pur, rien ne pousse, ce qui signifie que les bactéries sont mortes. Dans ce cas, le TP 7136 fait donc preuve d'un pouvoir *bactéricide* et non plus seulement *bactériostatique*. Il est dès lors impossible d'augmenter davantage la résistance de la souche.

On peut se demander pourquoi les bactéries ne sont tuées qu'au deuxième repiquage à 60 µg/cc. Il est facile d'en trouver la raison. Si, au lieu de repiquer la culture à 40 µg/cc au bout de 24 heures, on ne le fait qu'au bout de trois jours, il est impossible d'obtenir une culture en présence de 60 µg/cc.

Pouvoir bactériostatique et pouvoir bactéricide

Nous venons de signaler le double aspect de l'action du TP 7136 : pouvoir bactériostatique et pouvoir bactéricide. Ce dernier peut être mesuré facilement. Nous l'avons mesuré sur deux souches : 163 (*Streptococcus pyogenes*) et 55/o (*Mycobacterium sp.*).

Le titrage du pouvoir bactéricide se fait de la même façon que la mesure du pouvoir antibiotique, à la différence que le contenu de chaque

tube est ensemencé dans du bouillon pur afin de contrôler la vitalité de la culture.

Deux séries d'expériences ont été faites. Dans la première, l'antibiotique se trouvait dans le milieu de culture dès l'ensemencement, tandis que dans la seconde, l'antibiotique n'a été ajouté que lorsque le témoin avait poussé abondamment. Les repiquages de contrôle ont été faits, dans le premier cas, au bout de 24 heures pour la souche 163, et au bout de trois jours pour la souche 55/o; dans le second cas, les repiquages ont été faits respectivement 24 heures et trois jours après l'adjonction de l'antibiotique.

Il faut prendre garde qu'en effectuant les repiquages de contrôle, on n'introduise pas dans le bouillon pur une quantité de TP 7136 supérieure à la dose bactériostatique, sans quoi les résultats peuvent être complètement faussés. Il faut donc repiquer un très petit volume de culture.

Résultats

Pour la souche 163, le TP 7136 tue les bactéries lorsqu'il a une concentration de 60 μg/cc, et qu'il est ajouté à une culture en plein développement. Quand l'antibiotique est ajouté dès le début, il suffit de 40 μg/cc, ce qui confirme les résultats obtenus dans l'expérience précédente.

La souche 55/o se comporte différemment. Il faut en effet une concentration de 1000 μg/cc pour tuer la souche, quel que soit le moment où l'on ajoute l'antibiotique.

Il est intéressant de noter le rapport, pour chacune de ces deux souches, entre la dose bactériostatique et la dose bactéricide. Pour la souche 163, ce rapport est égal à 0,75 ; pour la souche 55/o, il ne vaut que 0,06. Cela signifie que la souche 163 est tuée par une dose d'antibiotique supérieure de 33 % seulement à la dose bactériostatique, tandis que la souche 55/o supporte une concentration plus de 10 fois plus forte que la dose bactériostatique.

Influence du milieu de culture sur les résultats des titrages

Nous venons de donner, dans les pages précédentes, les résultats d'un certain nombre de titrages effectués avec des souches sensibles au TP 7136.

Les milieux de culture employés pour ces titrages ne sont pas tous les mêmes, parce que, dans chaque cas, on choisit un milieu favorable à la croissance du germe. Or il est évident que si l'on veut comparer valablement des résultats, il faut que les conditions aient varié le moins possible au cours des essais. Comme les bacilles tuberculeux nécessitent l'emploi d'un milieu particulièrement riche, il aurait été évidemment

possible d'utiliser ce même milieu pour tous les germes. Cette solution n'a pas été retenue, à cause du coût élevé du milieu de Dubos.

Il est cependant possible de savoir si la composition du milieu de culture a réellement une influence sur les résultats. Il suffit pour cela d'utiliser, avec une souche choisie, un milieu de culture assez simple, auquel on ajoute des substances dont on pense qu'elles peuvent avoir une influence sur le titrage.

En 1955, LHOEST, BOLLE et MIRIMANOFF (3) avaient déjà montré que les substances protéiques ont une influence sur l'action de certains antiseptiques tensioactifs.

Nos essais ont porté sur la souche 55/o (*Mycobacterium sp.*). Le milieu de culture employé était le milieu de Sauton, dans lequel les Mycobactéries peuvent pousser. La souche 55/o a été titrée dans ce milieu, selon la technique déjà décrite. En outre, elle a été titrée en présence des substances suivantes, ajoutées à chaque tube à raison de 10 % (ces substances entrent dans la composition de très nombreux milieux de culture) :

sérum de bœuf
sérum de cheval
plasma humain
liquide d'ascite
fraction 5 de sérum bovin (solution à 5 %)
gélatine (solution à 10 %)
peptone (solution à 10 %)

Dans le milieu de Sauton, la culture se fait plus lentement qu'en bouillon ; on ne peut lire le résultat qu'au bout de 5 jours. L'adjonction de ces substances a du reste une influence sur la croissance ; on l'observe particulièrement bien dans les témoins. L'ascite est très favorable, de même que le sérum de bœuf, le sérum de cheval, le plasma humain et la fraction 5 de sérum bovin ; l'action de la gélatine est moins nette, tandis que celle de la peptone semble nulle. Les résultats des titrages sont donnés dans le tableau 6. Rappelons que la souche 55/o, titrée en bouillon, est sensible à 60 µg/cc de TP 7136.

On voit, d'après le tableau ci-après, qu'il n'est pas indifférent de faire un titrage dans un milieu de culture ou dans un autre. La présence de matières protéiques peut en effet modifier les résultats dans une importante mesure. C'est le sérum de bœuf qui possède, à ce point de vue, la plus grande influence, puisque, en présence de cette substance, il faut quatre fois plus de TP 7136 pour obtenir l'arrêt de la culture que lorsque l'essai est fait dans le milieu de Sauton seul. L'influence de la fraction 5 de sérum bovin, du sérum de cheval, du plasma humain et de l'ascite est également importante, tandis que celle de la gélatine

TABLEAU 6

Milieu	T	10	15	20	30	40	60	80	120	150	250
S. B.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Fr. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
S.Ch.	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
P.H.	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Asc.	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Gél.	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Pept.	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Saut.	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0

(Les concentrations sont données en µg/cc)

Abréviations: T = témoin ; S.B. = sérum de bœuf ; Fr. 5 = fraction 5 de sérum bovin ; S. Ch. = sérum de cheval ; P. H. = plasma humain ; Asc. = ascite ; Gél. = gélatine ; Pept. = peptone ; Saut. = milieu de Sauton seul.

l'est moins. Enfin, l'adjonction de peptone au milieu de culture ne change pas le résultat.

Ce phénomène peut avoir des conséquences importantes. En effet, nous avons utilisé le milieu de Dubos pour le titrage des bacilles tuberculeux. Or ce milieu contient précisément de la fraction 5 de sérum bovin, dont on vient de voir l'action sur le TP 7136.

Cependant, quand un titrage est effectué dans le milieu de Dubos, le TP 7136 n'est pas le seul mouillant qui intervient. Il y a encore le Tween 80 ; ce produit doit également réagir avec les protéines. Pour connaître l'influence conjuguée de la fraction 5 et du Tween 80, nous avons titré la souche 55/o dans le milieu de Dubos. En outre, en vue de déterminer si l'influence de la fraction 5 est proportionnelle à sa concentration, nous avons encore titré cette même souche dans le milieu de Sauton, en présence de fraction 5 à différentes concentrations. Nous espérions trouver une dose de fraction 5 insuffisante pour modifier l'action de l'antibiotique, mais suffisante pour favoriser la croissance des bacilles, qui poussent mal dans ce milieu où les protéines font défaut. Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 7.

On remarque que l'influence de la fraction 5 de sérum bovin est moins importante dans le milieu de Dubos que dans le milieu de Sauton. Il faut en conclure que, dans le milieu de Dubos, les protéines exercent leur action aussi bien sur le Tween 80 que sur le TP 7136. Cette action sur le TP 7136 est encore importante, puisqu'il faut deux fois plus d'antibiotique pour arrêter la croissance de la souche 55/o dans le milieu de Dubos qu'il n'en faut pour obtenir le même résultat dans le

TABLEAU 7 *

Milieu	T	10	15	20	30	40	60	80	120	150	250
F. 5 5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Dubos	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
F. 5 2 %	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
F. 5 1 %	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
F. 5 0,5 %	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
F. 5 0,1 %	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Sauton	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0

milieu de Sauton ou dans du bouillon ordinaire. La sensibilité la plus grande des bacilles tuberculeux au TP 7136 n'est donc pas celle qu'on obtient en effectuant les mesures dans le milieu de Dubos ; il est probable qu'on pourrait arrêter la croissance de ces germes avec des doses d'antibiotique plus faibles, à condition d'employer des milieux de culture sans protéines ; malheureusement, les bacilles tuberculeux poussent mal et très lentement dans de tels milieux, comme le bouillon glycériné ou le milieu de Sauton. D'autre part, si, dans le milieu de Dubos, on réduit la quantité de fraction 5 jusqu'à ce que les titrages donnent les mêmes résultats que dans un milieu sans protéines, la vitesse de croissance des bacilles est considérablement réduite.

CONCLUSION

Le pouvoir antibiotique du TP 7136 s'exerce *in vitro* sur un certain nombre de bactéries gram positives, mais c'est son action sur les Mycobactéries, et surtout sur les Mycobactéries pathogènes, qui est la plus intéressante. On peut alors se demander si le TP 7136 possède le même pouvoir *in vivo*, et tout d'abord chez les animaux. Si tel était le cas, des essais de thérapeutique pourraient être envisagés, mais il faudrait : 1° que le produit ne soit pas toxique ; 2° qu'il ne s'élimine pas trop rapidement de l'organisme ; 3° que son action ne soit pas entravée par les protéines du sang ; 4° que les Mycobactéries ne deviennent pas résistantes.

* Les solutions de fraction 5 étant ajoutées au milieu de culture dans une proportion de 10 %, les concentrations finales sont respectivement 0,5 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % et 0,01 %. Rappelons que dans le milieu de Dubos la concentration finale est 0,5 %.

Il est en outre évident qu'il ne faut jamais généraliser de l'animal d'expérience à l'homme, car les actions et réactions peuvent être totalement différentes.

Seule une expérimentation très large, et dont les résultats devront être interprétés avec la plus grande prudence, pourra donner une réponse à la question que nous venons de poser.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERTHET, R. 1949. — Etude du pouvoir antiseptique des savons et mouillants. Thèse Univ. Genève (Nyon, 1949).

2. ENGLER, V. 1950. — Influence des substances tensioactives sur la cellule végétale. Thèse Univ. Genève (Genève, 1950).

3. LHOEST, M.-T., BOLLE, A. et MIRIMANOFF, M. A. 1955. — *Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux 94*, 113.

4. LUZZATI, D. 1952. — *Ann. Inst. Pasteur 82*, 744.

5. DUBOS, R. J. et DAVIES, B. D. 1946. — *J. exp. Med. 83*, 409.

6. Non-ionic surface active agents. Technical Information Sheet No. 320 (Shell).

7. HAUDUROY, P. 1932. — *C. R. Soc. Biol. 110*, 559.

8. HAUDUROY, P. et WACHSMUTH, C. 1957. — *Ann. Inst. Pasteur 93*, 276.

Manuscrit reçu le 16 juillet 1961.