Zeitschrift: Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles
Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles
Band: 69 (1965-1967)
Heft: 323

Artikel: Les mycobactériophages dans la nature : étude expérimentale
Autor: Farrohi-Mohammadzadeh Kiai, Fakhri
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-275814

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 05.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Les mycobactériophages dans la nature

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

PAR

FAKHRI FARROHI-MOHAMMADZADEH KIAI

L'isolement de plus en plus fréquent dans les produits pathologiques humains de mycobactéries acido-alcoolo-résistantes très proches de *Mycobacterium tuberculosis*, mais qui s'en distinguent par plus d'un caractère, a posé depuis quelques années le problème difficile des mycobactéries dites atypiques ou anonymes. Ce qui rend cependant le problème délicat, ce n'est pas tant l'abondance des nouveaux types de mycobactéries que la difficulté de leur identification, soit la mise en évidence de caractères permettant de les distinguer, en faisant appel à des investigations qui relèvent de disciplines très différentes : bactériologie, biochimie, enzymologie, histopathologie, lysotypie, etc. Malgré de nombreux travaux consacrés aux mycobactéries, la position taxonomique de ces germes est encore très imprécise ; la méthode des amides et l'étude sérologique qui en est un précieux complément permettent actuellement de poser dans quelques cas le diagnostic de l'espèce. Donnons comme exemple l'espèce *Mycobacterium kansasii* qu'HAUDUROY et ses collaborateurs (1966) ont déterminée ainsi. C'est par la même technique que ces mêmes auteurs ont démontré que *Mycobacterium scrofulaceum* n'était pas une espèce homogène.

Les procédés de typage au moyen de bactériophages (FROMAN *et al.* 1961) et différents autres auteurs (TOKUNAGA *et al.* 1962, VANDRA 1962, WARD et REDMOND 1962, MUROHASHI *et al.* 1963, MANION et BRADLEY 1964) nous donnent la possibilité de proposer une classification des différentes espèces de mycobactéries autres que le bacille tuberculeux. Certains auteurs ont pensé que ce procédé permettrait de répondre aux exigences de la systématisation taxonomique. Notre travail porte essentiellement sur la recherche des mycobactériophages dans les milieux naturels d'origine diverse tels que terre, eaux d'égout, eaux de rivière, fumier.

ISOLEMENT DES BACTÉRIOPHAGES

Nombreuses sont les techniques d'isolement. Nous avons employé la technique dite d'enrichissement, couramment utilisée comme méthode de choix pour l'isolement des mycobactériophages, bien étudiée par FROMAN (1961).

Technique de Froman

Les souches que FROMAN utilise pour pratiquer cet enrichissement sont généralement au nombre de 13. Ce sont des mycobactéries saprophytes à croissance rapide. Elles sont ensemencées sur milieu de LÖWENSTEIN-JENSEN puis incubées à 37° pendant quelques jours. Une fois bien développées elles sont raclées et ensemencées dans du bouillon (Heart Infusion Broth Difco : HIB) réparti dans des bouteilles à raison de 50 ml par bouteille. L'incubation à 37° se fait en position inclinée de façon qu'une grande partie du bouillon soit en contact avec l'air. Après 7 à 10 jours, on récolte ces cultures, on les centrifuge à 2000 t/mn pendant 20 à 30 minutes, on les lave deux fois, on reprend ce culot par 10 à 20 ml d'eau distillée de façon à obtenir une suspension presque pâteuse, qui est versée sur les échantillons de terre à enrichir.

Cet enrichissement se pratique deux fois par semaine pendant trois semaines.

Quatre jours après le dernier enrichissement (à ce moment-là on a ajouté aux 100 grammes de terre environ 100 ml de suspension de mycobactéries), on prend 10 à 15 ml du liquide d'enrichissement que l'on centrifuge pendant 30 minutes à 2000 t/mn, ceci pour éliminer les parcelles de terre et dans une certaine mesure les bactéries. Le liquide surnageant est filtré sur bougie Chamberland 5 L3.

Pour déceler la présence de bactériophages dans ce liquide, on procède de la manière suivante : dans des tubes contenant environ 4 ml de gélose semi-solide de BORDET-GENGOU (SSA) fondue et refroidie à environ 50°C on ajoute 0,2 ml de culture de chacune des souches de mycobactéries utilisées pour les enrichissements (culture en milieu de DUBOS-FROMAN).

Il faut bien agiter les tubes pour disperser l'ensemencement, puis verser rapidement ce mélange dans des boîtes de Pétri où l'on aura coulé préalablement une couche de gélose de base de Bordet-Gengou (BGB). Lorsque la couche de Bordet-Gengou semi-solide est bien solidifiée, on y dépose plusieurs gouttes de chacun des filtrats obtenus, préparés comme il a été dit plus haut. Ces boîtes sont déposées à l'étude à 37° et examinées soigneusement chaque jour jusqu'à l'apparition des cultures. Les « plages » plus ou moins claires que l'on peut observer alors apparaissent comme des taches vierges, le reste de la boîte étant couvert d'une culture ; elles indiquent la présence d'un bactériophage.

Etude critique de cette technique

Nous avons tout d'abord procédé à une étude critique systématique de cette technique.

1. *Etude du temps d'enrichissement.* De nombreux essais ont été pratiqués en appliquant un temps d'enrichissement moins long. Il en est résulté que le temps de trois semaines est le meilleur et favorise au maximum le développement et les possibilités d'isolement des phages.

2. *Essai de concentration des particules virales.* L'emploi de résine échangeuse d'ions pour concentrer des particules virales, notamment dans les eaux, ayant donné des résultats satisfaisants (KELLY 1953) représente actuellement un procédé de concentration de plus en plus utilisé. Nous avons appliqué cette méthode pour la recherche des mycobactériophages dans la terre, mais elle ne nous a pas donné de résultats plus favorables que la méthode de FROMAN.

3. *Filtration simple.* Il est important de dire ici que parallèlement à chaque essai nous avons tenté un isolement de mycobactériophages par simple filtration sans aucun enrichissement préalable. Nous n'avons pas réussi à isoler de mycobactériophage par ce procédé, alors qu'HAUDUROY et ROSSET (1948) ont isolé un mycobactériophage dans un simple filtrat de terre sans aucun enrichissement préalable.

4. *Survie des mycobactéries ajoutées à la terre comme enrichissement.* Nous nous sommes proposé de rechercher le temps de survie des mycobactéries ajoutées aux échantillons de terre comme enrichissement. En effet, la recharge de ces terres se faisant deux fois par semaine et le laps de temps ayant été fixé empiriquement, il nous a paru intéressant de déterminer s'il correspondait à une perte notable de la vitalité des bactéries ajoutées. Les premiers essais effectués par simple ensemencement sur milieu de LÖWENSTEIN n'ont pas donné naissance à des isolements de mycobactéries.

Nous avons alors employé la méthode de GORDON (1937) (modification MESSERLI 1943) qui nous a permis d'isoler seulement deux ou trois des treize souches ensemencées et ceci trois jours après chaque enrichissement. Ceci nous permet de conclure que les souches employées ont une survie très courte dans la terre et d'expliquer ainsi l'obligation de sa recharge fréquente.

5. *Recherche de souches lysogènes.* Nous nous sommes demandé si les bactériophages isolés par la méthode d'enrichissement ne seraient pas apportés par les bactéries ayant servi à l'enrichissement des terres. Cette question est d'autant plus pertinente que des souches lysogènes de mycobactéries ont été mises en évidence par les travaux de très nombreux auteurs (RUSSEL *et al.* 1958, BOWMAN et REDMOND, 1959, SEGAWA *et al.* 1960, EUSTATZIOU 1961 et 1962). Aucune des souches employées pour l'enrichissement de la terre ne s'est montrée lysogène ; on peut donc en conclure que les bactériophages isolés sont réellement de provenance tellurique.

En conclusion, la méthode de FROMAN s'avère la plus efficace, tout au moins en ce qui concerne l'isolement de ces virus à partir de la terre. Par contre, l'isolement de phages à partir d'autres milieux naturels, en particulier des eaux d'égout, demande des modifications.

Isolement à partir des eaux d'égout

Les eaux d'égout constituent une source très importante de bactériophages en raison de la diversité de leur provenance. En effet, dans la plupart des villes ces eaux reçoivent la totalité des matières fécales et des urines. Si l'on sait que dans tous les milieux naturels où se trouvent des bactéries on trouve des phages actifs sur les espèces présentes, on en déduira forcément que des mycobactériophages peuvent se trouver dans les eaux d'égout et dans les eaux des rivières dans lesquelles ces égouts se déversent. Les échantillons d'eau destinés à la recherche de mycobactériophages ont été prélevés selon la technique de MOORE (1948).

Ce procédé produit un enrichissement efficace. Mis au point pour les bactéries, il convient parfaitement à l'isolement des virus et a pratiquement remplacé les autres modes de prélèvement. Il consiste à maintenir dans le courant durant un temps assez long (parfois plusieurs jours) des tampons de gaze à travers lesquels le courant d'eau va passer pendant toute la durée de l'exposition (FARROHI 1966). Cette méthode nous a donné des résultats supérieurs à ceux que nous avions obtenus par le prélèvement de simples échantillons.

Les prélèvements une fois effectués par la méthode de MOORE, il s'agit encore d'enrichir ces eaux. Nous avons appliqué la méthode de FROMAN pour la terre à l'enrichissement de ces eaux polluées, ce qui nous a toujours donné des résultats favorables, alors qu'un essai de concentration des virus par les résines échangeuses d'ions n'a donné aucun résultat positif.

Précisons les points essentiels de cette technique personnelle. Pour simplifier les manipulations, nous utilisons l'eau dans laquelle nous recherchons les phages comme diluant du milieu.

Préparer un bouillon HIB concentré 10 fois.
Distribuer à raison de 5 ml par bouteille.
Ramener ce bouillon à sa concentration normale par adjonction d'eau d'égout filtrée.
Ensemencer dans le bouillon ainsi préparé les souches de mycobactéries à croissance rapide.
Placer à 37° pendant une semaine.
Centrifuger la culture et filtrer le liquide surnageant.
Rechercher dans le filtrat la présence de mycobactériophages en l'ensemençant sur une gélose à double couche contenant des mycobactéries.

Cette technique s'est révélée rapide et efficace. Nous l'avons employée aussi pour tenter d'isoler dans les eaux d'égout de sanatorium des phages actifs sur le bacille de Koch en enrichissant ces eaux au moyen de dix souches de bacilles tuberculeux humains fraîchement isolés. L'enrichissement a été pratiqué pendant six semaines, 3 % de glycérine ont été ajoutés au milieu. Une activité lytique sur le bacille tuberculeux

a été mise en évidence : un filtrat a lysé la souche *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv et 19 sur trente souches de *Mycobacterium tuberculosis* fraîchement isolées de produits pathologiques, De plus, ce filtrat a lysé une souche de *Mycobacterium* type Battey, une souche de *Mycobacterium kansasii*, plusieurs souches de *Mycobacterium smegmatis* et *fortuitum*.

Isolement à partir de fumier

En employant la technique d'enrichissement, des mycobactériophages ont été isolés dans des fumiers mis en culture. Par contre, les essais effectués sur des selles humaines de sujets sains et de sujets tuberculeux ont tous été négatifs.

Exposé des résultats

Il nous a paru utile de rendre compte tout d'abord du nombre de produits à partir desquels il a été possible d'isoler des germes. Si l'exposé de ces résultats quantitatifs précède celui de la détermination de l'espèce, c'est qu'il apparaît d'abord dans une culture un effet lytique et que la qualité de ce phage ne peut être déterminée que par la suite en effectuant des cultures supplémentaires.

Résultats quantitatifs

Produits examinés	Nombre de prélèvements	Nombre d'échantillons positifs	Pourcentage de résultats positifs
Terre	118	61	51,7
Eau d'égout	48	22	45,8
Eau de rivière	48	18	37,5
Fumier d'animal	12	9	75
Selles humaines	12	0	0
Total	238	110	46,2

Dans ces résultats, la nature du produit n'entre pas seule en ligne de compte. Il semble que le nombre de particules virales varie en fonction du moment du prélèvement. En effet, au cours d'un cycle de travaux concernant les mycobactériophages effectués à l'Institut d'hygiène de l'Université de Lausanne au printemps 1962 (travaux non publiés) un très grand nombre de ces virus ont pu être isolés à partir d'échantillons de terre alors que des expérimentateurs entraînés travaillant à la même place et usant des mêmes techniques n'ont pas réussi à en isoler pendant l'été de la même année. Mettant en parallèle cette constatation et les travaux faisant état de la fréquence de l'isolement des

entérovirus à partir des eaux en fonction des saisons (KELLY 1963, KELLY *et al.* 1957), nous avons établi un programme d'expériences systématiques et mensuelles d'isolement des mycobactériophages à partir de la terre, de l'eau d'égout et de l'eau de rivière, et ceci pendant une année. Nous avons effectué chaque mois dix prélèvements à partir de la terre, quatre à partir de l'eau d'égout et quatre dans l'eau de rivière rigoureusement aux mêmes endroits.

Les prélèvements de terre ont été exécutés à une profondeur de 5 à 10 cm environ et transportés immédiatement au laboratoire dans des sacs de polyéthylène préalablement stérilisés. Des eaux ont été prélevées dans la Vuachère, le Flon, la Paudèze, la Venoge et la Chamberonne. Tous les prélèvements ont été effectués à l'aide d'un tampon de gaze selon la méthode de MOORE. Pour établir des courbes qui pourraient nous renseigner sur une éventuelle prédominance saisonnière, nous avons chiffré nos résultats de la manière suivante :

Nombre d'échantillons contenant des mycobactériophages, polyvalence de ces filtrats ; cet index est obtenu en divisant le nombre de souches lysées par le nombre de filtrats lysants.

Le graphique des valeurs de l'index en fonction des mois met en évidence le fait suivant : le nombre des échantillons contenant des phages est plus grand au printemps et maximum en avril. De plus, les filtrats de cette saison ont une polyvalence plus grande, c'est-à-dire un index d'activité plus élevé. On peut penser que ces filtrats contiennent chacun un plus grand nombre d'espèces de phages puisque ces filtrats lysent un grand nombre d'espèces de mycobactéries différentes. Les facteurs de cette périodicité n'étant pas connus, nous ne pouvons conclure avec certitude à une influence saisonnière, mais nous jugeons important de signaler ces différences numériques significatives.

Résultats qualitatifs, détermination de l'espèce phagique

Ces mêmes bactériophages semblent attaquer spécifiquement les mycobactéries. En étudiant leur spectre d'action, nous avons constaté qu'ils ne lysaient aucun microbe soumis à leur action et appartenant aux genres suivants : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

Lysotypie. L'action spécifique d'un bactériophage donné sur une espèce microbienne, une souche ou un type microbien est à la base d'une méthode de diagnostic bactériologique qui caractérise les types bactériens par leur lyse bactériophagique spécifique.

Nous avons effectué une lysotypie au moyen de plusieurs phages isolés par nous-même. Certains de ces phages, isolés puis portés à un titre élevé grâce à une souche donnée, ont été adaptés aux autres souches

appartenant à l'espèce pour laquelle ils sont devenus spécifiques. Par exemple, nous avons isolé à plusieurs reprises des phages actifs sur trois souches de *Mycobacterium smegmatis*. Puis, nous avons réussi à adapter la plupart de ces phages à d'autres souches de *Mycobacterium smegmatis* pour lesquelles ils n'étaient pas lytiques au départ. C'est également le cas de phages ayant une activité lytique envers une ou deux souches parmi les quatre souches de *Mycobacterium fortuitum* que nous avons eues à disposition. Il a été nécessaire d'isoler préalablement les phages à partir des filtrats obtenus. En effet, la plupart de ces filtrats contenaient un mélange de deux ou plusieurs phages. Ces isolements ont été pratiqués par des passages successifs sur des cultures pures de mycobactéries ensemencées en double couche. Comme d'autre part la concentration en phages lytiques influence particulièrement la réponse de la souche bactérienne mise à l'épreuve, il était important de déterminer la dilution critique de la suspension, c'est-à-dire la dilution la plus élevée qui donne encore une lyse confluente complète sur la souche ayant servi à entretenir le phage. Nous avons donc travaillé avec des phages à dilution critique pour toutes nos expériences de lysotypie à une exception près : celle d'un filtrat lysant *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium* type Battey, aucune lyse n'ayant été obtenue en employant la dilution critique. Nous avons soumis soixante souches de mycobactéries appartenant aussi bien aux espèces des mycobactéries à croissance rapide qu'à celles qui ont une croissance lente, à un jeu de vingt-trois mycobactériophages choisis pour leurs propriétés lytiques, leur pouvoir d'adaptation et leur spécificité.

Nous pensons pouvoir classer nos souches de mycobactéries en sept groupes, dont chacun comprend des souches qui se sont comportées de façon identique ou comparable à l'égard des phages étudiés.

Groupe I : *Mycobacterium smegmatis :* 59, 78, 170, 521, 690, 798, 909, 1114, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619.

Groupe II : *Mycobacterium phlei :* 61, 602, 726, 1794.

Groupe III : *Mycobacterium fortuitum :* 1024, 1782, 1783, 1785, 1791.

Groupe IV : *Nocardia rubropertincta* 153.

Groupe V : Sp. souche PELLEGRINO : 81, 1784.

Groupe VI : *Mycobacterium kansasii* 226, *Mycobacterium* H37RV 1653, type Battey 1760 et 19 souches de *Mycobacterium tub.* var. *hominis* isolées fraîchement de malades.

Groupe VII : Souches inclassables, résistant à tous les phages isolés. Il s'agit des souches *Mycobacterium* sp. 1787, 1789, 1798, *Mycobacterium smegmatis* 1620, 1790, *Mycobacterium phlei* 188, *Mycobacterium balnei* 915, *Mycobacterium tuberculosis* BCG 1124, *Mycobacterium tuberculosis* variété *avium* 1578.

La classification des mycobactéries par la lysotypie est-elle assurée d'un bon avenir ? De nombreuses difficultés restent à résoudre ; le problème principal est celui de l'isolement des bactériophages spécifiques et adaptables. A notre avis, les études doivent être poursuivies pour améliorer le procédé, soit par sélection de phages supplémentaires, soit surtout par préparation de mycobactériophages adaptés, selon le principe utilisé pour la lysotypie de *Salmonella typhi* (CRAIGIE et FELIX, 1947). Pour que le typage conserve une valeur dans le diagnostic de l'espèce, il est indispensable d'avoir des laboratoires spécialisés qui préparent, contrôlent l'activité et le titre, et enfin distribuent les phages. Il convient en particulier de standardiser les techniques dans leur détail, car des variations dans la quantité de l'inoculum, l'âge de la culture, le titre du phage, le milieu et la durée de culture entraînent des variations importantes dans les résultats. Des centres de collection chargés de réunir et de tester les phages récemment isolés et les bactéries hôtes, de déterminer les similitudes et les différences avec les phages déjà isolés, devraient être créés pour assurer à la lysotypie la place qu'elle mérite dans le diagnostic d'espèce des bactéries du genre *Mycobacterium*.

Sérologie. Etude antigénique de vingt-cinq phages actifs sur *Mycobacterium smegmatis* souche 521.

Parmi les nombreux phages que nous avons isolés à partir des produits naturels, il s'en est trouvé plusieurs qui étaient actifs sur la même souche : *Mycobacterium smegmatis* souche 521. Cette large répartition de phages dans la nature nous a amenée à poser les questions suivantes :

Les phages actifs sur la même souche appartiennent-ils à un type antigénique homologue ? S'ils représentent une structure antigénique similaire, quels sont les facteurs favorisant leur grande diffusion dans la nature ? Si, au contraire, ces phages ne possèdent pas de propriétés antigéniques analogues, est-ce la souche bactérienne qui est dotée de plusieurs types récepteurs lipoprotéiniques réagissant avec des bactériophages de nature antigéniquement différents ?

Pour prouver la parenté antigénique de ces phages, nous avons préparé un antisérum de référence avec un bactériophage actif sur *Mycobacterium smegmatis* souche 521, pris au hasard, et examiné le pouvoir neutralisant de cet antisérum sur l'activité lytique des autres bactériophages actifs sur la même souche. Le pouvoir neutralisant de sérum antiphage a été testé sur 25 phages actifs sur *Mycobacterium smegmatis* souche 521. Les résultats étant en majorité positifs, nous avons cru devoir nous assurer de la spécificité de l'antisérum utilisé. Pour ce faire, nous avons examiné l'activité neutralisante de cet immunosérum sur 14 lignées de bactériophage lysant différentes souches de

mycobactéries autres que *Mycobacterium smegmatis* souche 521. Dans un seul cas une neutralisation partielle a été constatée.

Nous en avons conclu que presque tous les phages actifs sur *Mycobacterium smegmatis* souche 521 appartiennent à un groupe antigénique ou au moins à des groupes extrêmement voisins les uns des autres.

La fréquence de l'isolement des phages d'un même sérotype nous porte à penser qu'il est très répandu dans la nature. Quelle est la raison de sa grande répartition dans les milieux naturels ? Deux réponses sont possibles :

a) pour que le phage soit aussi largement diffusé dans les milieux extérieurs, il faut que la souche « lysosensible » le soit aussi, qui en permet la pérennité et la reproduction. Pour s'assurer de la validité de cette hypothèse, il faudrait isoler les mycobactéries sensibles des mêmes milieux naturels desquels ces phages ont été extraits et prouver que les mycobactéries saprophytes lysables par le bactériophage le plus répandu sont aussi, par rapport à l'ensemble des mycobactéries du sol, les germes les plus répandus. Or, l'isolement des mycobactéries à partir du sol nécessite un grand nombre de manipulations, ce qui aurait largement dépassé le cadre de ce travail. Il n'est donc pas possible de vérifier cette hypothèse ici.

b) L'abondance d'un microorganisme dans le milieu extérieur peut être la conséquence directe de sa grande résistance aux agents physiques et chimiques. C'est ce qui nous a poussée à étudier la durée de survie du phage lysant *Mycobacterium smegmatis* souche 521 dans la terre, le fumier de cobaye, l'eau d'égout et enfin l'eau de rivière, afin de vérifier dans quelle mesure ces milieux non seulement ne le tuent pas, mais assurent sa protection. Les études relatives à la survie du bactériophage lysant *Mycobacterium smegmatis* souche 521 dans l'eau d'égout, l'eau de rivière, la terre, ont donné les résultats suivants : la faculté de survie est d'au moins 90 jours pour l'eau d'égout, 70 jours pour l'eau de rivière et le fumier de cobaye et 50 jours pour la terre.

Bien que l'expérience ne reproduise pas absolument les conditions naturelles, il faut reconnaître que ces études en laboratoire appuient la thèse de la très grande résistance de ces bactériophages. Ceci pourrait être une des raisons de leur grande dissémination dans la nature.

Discussion des résultats et conclusion

En recherchant les mycobactériophages dans les produits naturels par la méthode de Froman et ses modifications, il nous a été possible d'isoler un très grand nombre de ces virus (110 filtrats lytiques provenant de 238 examens environ, passages, purification, recherches diverses, au total environ 10 000 analyses).

Il est à noter que si nous avons constaté une prédominance printanière, ces isolements ont été malgré tout extraordinairement réguliers. On peut donc conclure qu'il est relativement facile d'isoler régulièrement des mycobactériophages et d'obtenir ainsi un matériel lytique nouveau chaque fois qu'on le désire.

Il est évident que l'essor donné par les chercheurs à ces travaux provient du désir de typer les mycobactéries et d'apporter ainsi un élément au diagnostic de l'espèce. Il n'est pas sûr que ces virus soient réellement spécifiques : un grand nombre sont polyvalents et parmi ceux qui sont monovalents on observe souvent une spécificité non pas d'espèce mais de souche. C'est ainsi que nous avons eu entre les mains plusieurs filtrats qui lysaient trois souches étiquetées *Mycobacterium smegmatis* pour certains et *Mycobacterium sp.* pour d'autres.

Comme ces trois souches se retrouvaient toujours liées dans nos expériences, nous en avons recherché l'origine ; il s'est avéré qu'elles provenaient en réalité toutes trois (par des voies différentes) de la même souche initiale qui, conservée à l'ATCC sous le numéro 607 serait pour certains la souche originale de Koch ; elle aurait été distribuée à différents moments dans différents laboratoires qui nous l'ont renvoyée par la suite. Dans ce cas, la lysotypie nous a permis de retrouver cette origine commune.

Un autre cas intéressant est celui de *Mycobacterium rubrum*, lysé par des filtrats qui ne sont jamais actifs sur d'autres souches, ce qui semblait distinguer cette mycobactérie. Notre point de vue est confirmé par les travaux d'autres auteurs qui tendent à faire de cette mycobactérie une *Nocardia (Nocardia rubropertincta)*.

Ces essais, intéressants, ne sont pas suffisants pour augurer de la prépondérance de la lysotypie dans la classification des mycobactéries. Nous pensons que le spectre bactériophagique doit rester un élément d'information qu'il faut compléter par des renseignements fournis par d'autres méthodes.

La recherche des mycobactériophages dans les milieux naturels nous semble très intéressante à un tout autre point de vue : celui de la connaissance des germes contenus dans ces produits naturels, de leur variation saisonnière en particulier. Ceci pourrait avoir une valeur épidémiologique. On sait que les bactériophages sont plus résistants aux agents physiques et chimiques que les bactéries correspondantes. Ils persistent donc plus longtemps dans les milieux naturels et sont ainsi la preuve du passage d'un germe dans ces milieux.

Ce problème est bien connu pour les *Salmonella* qui ont une survie très courte dans les eaux. Les recherches faites quinze à vingt jours après l'apparition des premiers cas de salmonellose (période d'incubation) ont lieu au moment où les germes ont déjà disparu, tandis que les

bactériophages, beaucoup plus résistants, persistent en quantité considérable, ainsi que l'a montré GUELIN (1950).

Des méthodes plus récentes encore, proposées par de nombreux auteurs (RUBASHKINA et KAZAKOVA 1959, GOLDFARB *et al.* 1960, TIMAKOV et GOLDFARB 1960) dépistent l'origine hydrique de certaines épidémies en se fondant sur l'augmentation du titre des bactériophages que l'on a alors introduits en quantité déterminée dans les échantillons à analyser. Une augmentation indique la présence dans ces échantillons de bactéries homologues.

La grande spécificité de cette méthode, sa rapidité et sa rigueur permettent d'en envisager l'application à des recherches épidémiologiques.

L'optique relativement nouvelle de la connaissance d'un milieu naturel et de sa teneur en bactéries par l'étude de l'augmentation du titre de phage qu'on y apporte pourrait être appliquée aussi à la question très importante de la détermination quantitative et qualitative de la teneur en mycobactéries d'un sol ou de tout autre milieu.

Quelles que soient les applications de la recherche des mycobactériophages dans les milieux naturels, la mise au point d'une technique qui donne des isolements réguliers, des titrages faciles et sûrs pour des germes relativement résistants aux agents physiques et chimiques et antigéniquement spécifiques, comme nous l'avons démontré par la fabrication de sérum expérimental, fournira un matériel biologique intéressant, facile à manipuler, sur lequel de nombreuses études pourront encore être faites.

BIBLIOGRAPHIE

BOWMAN, B. U., jr. et REDMOND, W. B., 1959. — A temperate bacteriophage from « Mycobacterium butyricum ». *Amer. Rev. respi. Dis.*, *80*, 232-239.

CRAIGIE, J. and FELIX, A., 1947. — Typing of thyphoid bacilli with Vi bacteriophage. Suggestions for its standardisation. *Lancet*, *252*, *I*, 823-827.

EUSTATZIOU, G., EUSTATZIOU, S. et *al.*, 1961. — Recherches sur les systèmes phago-bactériens chez les mycobactéries saprophytes et pathogènes. *Arch. Roum. Path. exper.*, *20*, 461-469.

— 1962. — Recherches sur les systèmes phago-bactériens chez les mycobactéries saprophytes et pathogènes. *Arch. Roum. Path.* exper. 1962, *21*, 255-260.

FARROHI KH., 1966. — De la recherche des virus dans les eaux. Etude expérimentale. Conséquences de ces études dans les problèmes d'hygiène générale. Thèse de doctorat ès sciences, Fac. des Sciences Univ. de Lausanne (Institut de Bactériologie, d'Hygiène et de Virologie.) (Résumé sous presse : 1967, *Rev. Immunol.*)

FROMAN, S., WILL, D. W. et BOGEN, E., 1954. — Bacteriophage active against virulent Mycobacterium tuberculosis. I. Isolation and activity. *Amer. J. publ. Hlth.*, *44*, 1326-1333.

FROMAN, S., SCAMMON, L., HANSON, D., BLACK, J.P.M. et WILL, D. W., 1961. — Une étude de mycobactéries d'origine étendue : sensibilité aux bactériophages. *Excerpta Medica*, *Int. Congr. Ser.* No. 41, XVIth. *Int. Tuberc. Conf. 1.* Toronto 1961.

GORDON R., 1937. — *Amer. Rev. of Tuberc.* 1937, 450.

GOLDFARB, D. M., KUZNETSOVA, V. N. et OSTROVSKAYA, Z. S., 1960. — Methodical instructions for the application of phage titre rise reaction to determine dysentery and thyphoid bacilli. *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, *3*, 36-40.

GUELIN, A., 1950. — La survie du bacille typhique Vi et de son bactériophage dans l'eau. *Ann. Inst. Pasteur*, *78*, 78-82.

HAUDUROY, P. et BEL, F., 1966. — Etude des propriétés amidasiques de souches de mycobactéries isolées chez l'homme, d'adénites non tuberculeuses. *Ann. Inst. Pasteur*, *110*, 99-102.

— HOVANESSIAN, A. et BEL, F., 1966. — Agglutinabilité, par un sérum spécifique de mycobactéries isolées d'adénites non tuberculeuses. *Ann. Inst. Pasteur*, *110*, 103-104.

— et ROSSET, W. 1948. — Un bactériophage lysant certaines mycobactéries. *C. R. Acad. Sci.*, *227*, 917-918.

KELLY, S. M., 1953 — Detection and occurrence of coxsackie viruses in sewage. *Amer. J. Publ. Hlth.*, *43*, 1532-1537.

— WINSSER, J. et WINKELSTEIN, W., 1957. — Poliomyelitis and other enteric viruses in sewage. *Amer. J. Publ. Hlth. 47*, 72-77.

MANION, R. E. et BRADLEY, S. G., 1964. — Derivation of new mycobacteriophage typing reagents by propagation on alternative hosts. *Amer. Rev. respi. Dis.*, *89*, 764-766.

MESSERLI, F., 1943. — Technique d'isolement des Mycobactéries dans la nature. *Schweiz. Z. Path.*, *6*, 358-362.

MOORE, B., 1948. — The detection of paratyphoïd carriers in towns by means of sewage examination. *Mth. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, *7*, 241-248.

MUROHASHI, T., TOKUNAGA, T., MIZUGUCHI, Y. et MARUYAMA, Y., 1963. — Phage typing of slow-growing Mycobacteria. *Amer. Rev. respir. Dis.*, *88*, 664-669.

RUBASHKINA, B. K. et KAZAKOVA, S. F., 1959. — A method of phage titre increase for investigating the objects of external environment. *J. Mikrobiol, Epidemiol. Immunobiol. 6*, 110-112.

RUSSEL, R. L., JANN, G. J. et FROMAN, S. 1958. — Lysogeny in the Mycobacteria. *Bact. Proc.* (abstract), 39.

SEGAWA, J., TAKEYA, K. et SASAKI, M. 1960. — Isolation of lysogenic acid — fast bacilli from the soil. *Amer. Rev. resp. Dis.*, *81*, 419-420.

TIMAKOV, V. D. et GOLDFARB, D. M., 1960. — Reaction of phage titre and identification of pathogenic bacteria. *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1960 *1*, 5-10.

TOKUNAGA, T., MARUYAMA, Y. et MUROHASHI, T., 1962. — Classification of mycobacteriophage. *Kekkaku*, *37*, 676.

VANDRA, E., 1962. — Studies on the phage — typing of Mycobacteria. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, *9*, 61-67.

WARD, D. M. et REDMOND. W. B., 1962. — Spotting method of phage typing Mycobacteria, Bacterial clearing due to non specific action. *Amer. Rev. respir. Dis. 85*, 883-889.

Résumé de la thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences.

Institut d'Hygiène de l'Université de Lausanne
Directeur : Professeur Dr PAUL HAUDUROY.

Manuscrit reçu le 30 novembre 1966.