SUR LA NATURE DE L'ACTION INHIBITRICE "IN VITRO" DE L'ANTIVIRUS DIPHTERIQUE

par

C. DIAZ ROMERO
(Montévidéo)

La nature de l'action inhibitrice "in vitro" (A. I.) de divers antivirus, et spécialement celle des antivirus Sthaphilococcique et Streptococcique, n'a pas encore été exactement établie. La plupart des investigateurs atribuent l'A. I. á la formation lente et progressive de quelque substance dans le milieu de culture, produit de la destruction lente des corps microbiens, ou produit de déchet du métabolisme des germes, qui formerait un milieu contraire au développement des mêmes. Et aussi pour quelque germe, le bacille de Welch - Fraenkel, un auteur chinois, Murao, a isolé cette substance inhibitrice.

Pour d'autres auteurs, il n'y aurait pas formation de substances qu'inhibiraient le développement des germes, sinon que l'inhibition du développement se devrait á l'épuisement du milieu en substances nutritives necessaires pour la vie et le développement microbiens. C'est la vieille théorie de Pasteur de ses milieux vaccinés qui s'est aussi étendue á l'explication de la vaccination in vivo.

Le débat n'est pas fermé, et nous, en continuant l'étude de l'antivirus diphtérique, apportons des observations et des expériences sur le thème.

Comme nous l'avons déjà établi dans un travail antérieur l'antivirus diphtérique possède une A. I. très puissante, facilement apreciable, spécifique pour le bacille diphtérique, indépendante du Ph. du milieu, que l'on distingue

bien d'une action bactériophagique; deux autres caractéristiques importantes sont: sa thermostabilité (il résiste toutes les fois que l'on désire, une température de 110 degrés á l'autoclave) et sa durée ou persistance car il se maintient parfaitement dans un antivirus qui a été pendant 5 ans dans la glacière.

D'abord nous traiterons d'établir si l'A. I. de l'A. D. se doit á l'apparition en lui, de quelque substance ou modification du milieu qui empêche ou difficulte le développement du bacille diphtérique. Nous avons réalisé les expériences suivantes:

Première: On ensemence avec des bacilles diphtériques plusieurs tubes de bouillon Martin additionnés préalablement avec des quantités variables d'antivirus (1, 2, 3, 5, volumes). On ensemence aussi une autre série de tubes de bouillon Martin additionnés avec des volumes 1, 2, 3, et 5 de sérum physiologique. Nous observons que le troisième jour le développement des germes diminue dans les deux séries de tubes lorsque les volumes de sérum ou d'antivirus additionnés augmentent. On observe en plus que le développement dans les tubes avec l'antivirus est plus marqué que dans ceux de la série contenant du sérum. De façon que l'antivirus n'empêche pas le développement des germes, et même que, en le comparant avec le sérum physiologique, il résulte plus favorable comme milieu nutritif et il agit de même que le sérum en diluant le bouillon Martin.

Deuxième: On met dans l'étuve deux tubes avec des volumes égaux d'antivirus et nous les y laissons jusqu'á obtenir l'évaporation complète qui se produit au bout de 15 jours. Ces tubes qui contiennent dans le fond un dépot sec des substances que l'antivirus avait en solution, sont additionnés, l'un d'eux avec de l'eau distillée stérilisée et l'autre avec du bouillon Martin nouveau jusqu'á atteindre le volume primitif de l'antivirus. Nous ensemençons les 2 tubes avec des bacilles diphtériques et 48 heures après nous observons que le tube additionné avec du bouillon donne un développement pareil á celuil d'un tube témoin de bouillon Martin nouveau tandis que l'autre tube, additionné avec de l'ean distillée stérilisée ne donne aucun développement. On obtient le même résultat si au lieu

de restituer le volume primitif de l'antivirus, on ajoute seulement une partie (la moitié ou le quart). Cette expérience nous montre aussi que dans l'antivirus il n'y a rien qui empêche le développement du bacille diphtérique.

Troisième: Nous réalisons avec l'antivirus diphtérique une expérience de Renaux faite en 1928 par cet auteur, par laquelle il établi que dans l'antivirus Staphilococcique il n'existent pas des substances empêchant le développement du Staphilocoque. (Cette expérience a été répétée par Chaillot en 1930, avec un résultat tout a fait différent, en concluant donc, en opposition avec Renaux. Mais cet auteur l'a postérieurement ratifiée.) Renaux ensemence avec du staphilocoque trois tubes: l'un d'eux avec un volume d'antivirus, l'autre avec un volume égal d'antivirus et un autre volume de bouillon, et le troisième avec un volume de bouillon aussi égal a celui de l'antivirus. 24 heures après, le premier tube n'a donné aucun développement, le second donne un léger trouble du milieu et le troisième présente un trouble très marqué. On ajoute alors au premier tube un volume de bouillon et au troisième un volume d'antivirus, de façon que maintenant les 3 tubes ont la même composition. On les place de nouveau dans l'étuve et au bout de 24 heures on voit que tous les trois présentent le même développement. D'où, l'auteur conclu que les différences de développement dans la première partie de l'expérience sont dues a la differente composition des tubes et que la seconde partie montre qu'il n'existent pas dans l'antivirus staphilococcique des propriétés empêchantes, et que son action est due á l'appauvrissement du milieu en matières nutritives. L'expérience de Renaux faite pour nous avec l'antivirus diphtérique, nous a donné le même résultat qu'á cet auteur.

Quatrième: Goldie en 1931 établit que l'A. I. des divers antivirus (staphilococcique et colibacillaire) peut être détruite par oxidation avec l'eau oxigenée ou par l'action de l'acide chlorhidrique, et de plus elle est facilement absorbée par le contact avec la gélose, le blanc d'oeuf coagulée et la macération de foi. Le kaolin par contre ne l'absorbe pas. L'auteur arrive donc á la conclusion que l'action in-

hibitrice se doit á la formation lente dans le milieu de culture de substances qui empêchent le développement des germes correspondantes, et qu'étant donné ses caractères il croît que ces substances ne sont pas de nature proteique, mais des produits aminés de désintégration.

L'antivirus diphtérique, traité pour nous, tel que l'a fait Goldie avec d'autres antivirus, nous révèle que son A. I. ne disparaît pas par l'action de l'eau oxigenée ni par celle de l'acide chlorhidrique, et que le contact de l'A. D. avec la gélose pure (dans un tube de gélose inclinée) ne lui fait pas non plus perdre son A. I. Par contre, l'additon de la macération de foi á l'A. D. de même que l'additon de blanc d'oeuf coagulé fait perdré á l'antivirus l'A. I., et le bacille diphtérique s'y développe comme dans le bouillon Martin nouveau. De manière que (en opposition avec les faits établis par Goldie pour d'autres antivirus) l'A. D. n'est pas destructible par l'eau oxigenée ni par l'acide chlorhidrique, et n'est pas absorbé par la gélose. Quant á la façon de se conduire de l'A. D. en présence de la macération de foie ou de blanc d'oeuf, nous verrons plus en avant qu'il ne s'agit pas dans ces cas d'une absortion de substances inhibitrices (comme il arrive avec d'autres antivirus, d'après Goldie) sinon que ces faits ont une autre explication.

Toutes ces expériences établissent donc que *dans l'antivirus diphtérique il n'est pas possible mettre en évidence des substances inhibitrices sous aucun rapport.*

Voyons maintenant si l'A. I. peut s'expliquer par l'épuisement du milieu en substances nutritives. A ce sujet nous trouvons:

Premièrement: Que l'action inhibitrice disparait dans l'A. D. toutes les fois qu'il est additionné de substances nutritives qui se trouvent dans les milieux courants a savoir: La peptone, la macération de viande, le bouillon simple, le bouillon Martin et le bouillon Martin sec.

La perte de l'A. I. parait quand nous ajoutons le bouillon Martin dans une proportion du 25 au 30 % du volume de l'antivirus, et le développement des germes est total lorsque la proportion du bouillon Martin atteint le 50 %. L'addition de macération de foie ou de blanc d'oeuf pro-

voquent aussi le développement du bacille diphtérique dans l'antivirus en l'enrichissant en substances nutritives car la macération de foie ou de blanc d'oeuf additionné au sérum physiologique lui confèrent aussi la propriété de développer le bacille diphtérique.

En second terme, l'expérience de Renaux citée précédemment nous démontre que le développement des germes est le même dans les trois tubes quand leur richesse nutritive est aussi la même.

Et en dernier lieu nous avons vu que l'A. D. mis en contact avec la gélose pure (dans un tube de gélose inclinée) ne perd pas son A. I. Par contre l'A. D. mis en tubes de gélose nutritive inclinée ou de gélose - ascite perd son pouvoir d'inhiber le développement du bacille diphtérique et en donne une croissance assez remarquable. Le sérum physiologique mis en contact, de la même manière avec la gélose pure, la gélose nutritive et la gélose - ascite nous donne aussi le même résultat. On observe en plus que le développement dans les tubes d'antivirus atteint le même degré que dans les tubes de sérum. D'autre part si nous ensemmençons avec des bacilles diphtériques, les trois tubes de gélose pure, gélose nutritive et gélose - ascite qui ont été mis en contact avec l'antivirus diphtérique, et les trois tubes de gélose pure, gélose nutritive, et gélose - ascite qui ont été mis en contact avec le sérum physiologique on observe ce qui suit: dans le tube de gélose pure qui contenait l'antivirus il y a un développement faible et tardif de très petites colonies; le tube de gélose pure qui contenait du sérum n'a pas donné de développement. Les autres deux tubes de gélose nutritive et de gélose - ascite qui contenaient de l'antivirus donnent un développement plus marqué que les autres deux tubes qui avaient du sérum. En conséquence le sérum et l'antivirus ne souffrent pas de modifications quand ils sont mis en contact avec la gélose pure qui est un milieu dépourvu de substances nutritives; par contre tous deux s'enrichissent dans un même degré, en substances nutritives, quand ils sont mis en contact avec un milieu solide nutritif; et en plus l'A. D. ne confère aucune propriété inhibitrice aux milieux solides avec lesquels il est mis en contact.

L'A. D. se conduit donc dans tous les cas étudiés comme *un mileiu incomplet ou dépourvu de substances nutritives pour le bacille diphtérique* et que, additionné avec elles, il devient un milieu apte pour son développement. De cette manière nous nous expliquons aussi avec facilité sa thermo - stabilité et la persistance de son A. I. que nous avons déja signalé. Tout cela est d'accord avec de nombreuses études sur les exigences du bacille diphtérique en substances nutritives spécifiques indispensables pour son développement, surtout divers acides aminés, l'asparagine, cistine, le tryptophane, la b - alanine, l'acide nicotinique, etc. (ce dernier contenu en grande proportion dans la macération de foie). Ces exigences du bacille diphtérique en substances déterminées sont d'autre part bien différentes des facteurs de croissance microbien désignés par certains auteurs, facteurs *x*, *v*, *z*, etc., car en premier lieu ils agissent en petites quantités et en second terme ils ne sont pas facteurs spéficiques comme les antérieurs. Rappelons ici les conclusions d'Abt sur ce point: "L'énergie nécessaire a la vie des germes pathogènes peut être donnée par des éléments tertiaires non spécifiques, mais la synthèse microbienne parait exiger des substances nitrogénées hautement spécifiques".

Et finalement étant donné que l'A. D. est doué d'un grand pouvoir immunisant in - vivo, comme nous l'avons déja signalé dans un travail précédent, il ressort de ces faits l'indépendance complete entre cette action immunisante qui est sa propriété fondamentale, et son A. I. qui est une propriété secondaire (comme Besredka l'a établi pour les antivirus en général). Ces deux propriétés s'originent simultanéement, mais elles ne peuvent pas être attribuées á une même substance ou á une même cause. Il n'est pas non plus possible dans ce cas (comme l'a déjà établi Besredka) attribuer l'action immunisante in - vivo a l'action inhibitrice in - vitro, du moins exclusivement. Nos expériences sont aussi d'accord avec celles d'autres auteurs: Barg, qui a obtenu la dissociation entre l'action immunisante et l'A. I. des antivirus en les additionnant de sucres divers; et Schioppa qui a travaillé avec des antivirus doués d'un grand pouvoir curatif mais dépourvus d'A. I.

En résumé, nous croyons que l'A. I. de l'A. D. ne peut

pas s'attribuer á la présence de substances inhibitrices, mais a l'épuisement du milieu en substances nutritives spécifiques, nécéssaires pour le développement du bacille diphtérique.

Cette interprétation de nos expériences est tout a fait d'accord avec les autres propriétés de l'A. D. (thermostabilité, persistance de l'action) et nous montre l'indépendance de l'A. I. in - vitro et celle de l'action immunisante in - vivo.

Cette interprétation est aussi d'accord avec les expériences sur les exigences de croissance du bacille diphtérique et avec les recherches des divers auteurs sur les antivirus et la dissociation de ses propriétés.

Nous croyons finalement que dans l'étude des antivirus il n'est pas possible faire des généralisations simplistes étant donné, comme nous l'avons vu, que tous ne se comportent pas de la même manière quant a ses propriétés in - vitro.

Rue Cololó, 2836. Montévidéo.

BIBLIOGRAPHIE

1) BESREDKA. — Antivirusthéraphie.
2) BESREDKA. — Immunité locale et pansements spécifiques.
3) BESREDKA. — Etudes sur l'Immunité dans les maladies infectieuses.
4) CLAVEAUX, E. M. et DIAZ ROMERO, C. — Tratamiento de la difteria por antivirus especifico. "Archivos Uruguayos de Med., Cir. y Esp.", 1933, pág. 863.
5) CLAVEAUX, E. M. et DIAZ ROMERO, C. — L'action inhibitrice de l'antivirus diphtérique et sa valeur comme moyen diagnostique. "Archivos de la Sociedad de Biol. de Montévidéo", 1937, pag. 114.
6) BARG. — Centr. fur Bak., 1927, pag. 328.
7) BERTARELLI. — Ann. d'Igiene. t. XLV., 1935.
8) CHAILLOT. — Etude in vitro sur les antivirus. C. R. S. B., pag. 122, 1930.
9) GOLDIE. — Absortion et destruction des substances inhibitrices dans les filtrats microbiens. C. R. S. B., 1931, pag. 762.
10) MUELLER et COHEN. — J. of Bact. t. XXXIV, 1937, pag. 381.
11) MURAO. — Nagasaki. Igakkvvas Zass. t. XI, 1933, pag. 922.
12) NITSCH. — Zeits. f. Kinderh., 1933, pag. 470.
13) KOSER e SAUNDERS. — J. of. Inf. Dis. vol. 56, 1935, pag. 305.
14) RENAUX. — Bruxelles-Medical, 1928, pag. 1433.
15) RENAUX. — C. R. S. B., 1930, pag. 129.
16) SCHIOPPA. — Bol. Inst. Sierot. Milan. t. XIII, 1934, pag. 266.
17) ZEEUVV. — These med. veter. Utrech, 1932.
18) VVADSVVORTH. — J. of Inf. Dis. XLII, 1928, pag. 179.