

EXTRAIT DES

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

**L'ACIDE L-ASCORBIQUE
ET LES ANAÉROBIES**

PAR

François PATOCKA et Jean ILAVSKY

MASSON ET C^{ie}. ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (6^e)

L'ACIDE L-ASCORBIQUE ET LES ANAÉROBIES

par FRANÇOIS PATOCKA et JEAN ILAVSKY.

(*Institut bactériologique et sérologique
de l'Université Charles-IV, Prague.*)

En nous fondant sur les travaux du professeur Weinberg, nous avons entrepris d'étudier systématiquement l'influence des substances réductrices les plus diverses qui favorisent la croissance des microbes anaérobies stricts dans des conditions aérobies, et de comparer l'intensité de l'action spéciale de chacune de ces substances. Pour cela, nous avons fait toute une série d'expériences en nous servant des méthodes et des substances chimiques habituellement usitées et c'est au cours de ces expériences que nous avons eu l'idée d'employer à cette fin les propriétés réductrices de l'acide *l*-ascorbique. Les résultats obtenus (Académie des Sciences tchécoslovaque, novembre 1936) ont pleinement satisfait nos hypothèses en faveur desquelles nous n'avions pas, au début, trouvé d'encouragement dans la bibliographie mondiale. Enfin, la mention faite dans l'excellent ouvrage du professeur Weinberg (1) nous a donné la certitude que nous étions sur une bonne voie.

Le problème est basé sur l'expérience suivante (Frei). La présence de l'oxygène ou de l'eau oxygénée, même en très petite dose, dans un bouillon nutritif, provoque un arrêt assez long dans la croissance de n'importe quel microbe anaérobie strict, sans que celui-ci soit obligatoirement tué. Cet arrêt de développement correspond précisément à la période de temps nécessaire pour que l'anaérobie en question puisse, en produisant des substances réductrices (selon toute probabilité principalement des composés sulfhydriliques), abaisser le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture à une valeur nécessaire à son développement. Il est donc fort simple de

(1) *Les Microbes anaérobies*, p. 5.

réduire la durée de cette période négative à son minimum en ajoutant, au milieu de culture, des substances réductrices.

On peut répartir toutes les méthodes qui tendent vers le but dont nous avons parlé, en deux grands groupes :

1° Le groupe des méthodes qui emploient des substances chimiques, non toxiques, de composition relativement simple et bien connue. Parmi celles-ci, la cystéine, introduite par Hosoya Seigo et par Frei, nous intéressait particulièrement, non seulement parce qu'elle semble être l'agent le plus physiologique et un des réducteurs les plus efficaces, mais aussi parce que l'explication de son action, tentée par Frei, peut servir, légèrement modifiée, à comprendre l'action de l'acide ascorbique dans nos propres recherches. Frei croit que, sous l'influence catalytique des traces de sels de fer qui se trouvent dans le bouillon (extraits de viande), deux molécules de cystéine s'oxydent (la cystéine devient ainsi donneur d'hydrogène) en une molécule de cystine.

Une molécule d'hydrogène se trouve ainsi libérée et se lie à l'oxygène dissous dans le milieu nutritif, comme accepteur, de telle façon qu'il se forme, en plus de la molécule de cystine, une molécule d'eau. Par cette fixation, directement à l'intérieur du bouillon nutritif, de l'oxygène nuisible, le potentiel d'oxydo-réduction s'abaisse et la période d'arrêt du développement est annulée. L'anaérobie commence à pousser, même dans un tube de bouillon exposé à l'air. Par la production des substances réductrices qu'il provoque, le développement se poursuit, en même temps que l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction, jusqu'à des degrés limites fixés pour certaines conditions expérimentales par Plotz et Géloso. Nous pouvons, pour un grand nombre d'expériences, attester les beaux résultats obtenus avec la cystéine d'après la méthode de Frei et Riedmüller même avec des quantités moins considérables de cette substance, 0,5 p. 1.000 au lieu de 3 p. 1.000. Il en va de même pour le glutathion qui, malheureusement, en raison de son prix très élevé, ne peut pas être introduit dans la pratique courante.

2° Le groupe des méthodes dites biochimiques, qui n'ont pas trouvé jusqu'à présent d'explication précise, qu'il s'agisse d'une adjonction de fragments d'organes animaux ou de végé-

taux, ou d'une symbiose avec un microbe aérobie. Il semble que leur efficacité consiste en partie, selon Frei, dans l'adjonction, au milieu nutritif, de substances nutritives d'une très haute valeur, se trouvant dans les organes les plus divers ou dans les légumes (facteurs accessoires Z de Hoder). En outre, les extraits d'organes, de fruits et les microbes libèrent dans le milieu ambiant, par l'intermédiaire des ferments réducteurs qu'ils contiennent, des matières réductrices (Frei) qui changent le potentiel d'oxydo-réduction en valeur négative, très favorable aux anaérobies, comme le glucose, le glycogène, les phosphatides, l'acide fumarique, la cystéine, le glutathion.

On sait depuis longtemps que l'acide ascorbique est de première importance pour les actions énergétiques dans la cellule vivante. Par sa haute puissance oxydo-réductrice (étudiée par Wurmser), il joue le rôle d'un important accepteur intermédiaire au cours des oxydations et des hydrogénations dans la cellule. Son importance est d'autant plus grande que sa valeur réductrice est en partie réversible. C'est à sa présence qu'il faudrait attribuer le niveau élevé du potentiel oxydo-réducteur mesurable dans la cellule.

L'acide ascorbique a encore une autre propriété : celle d'activer les ferments. Enfin, selon l'hypothèse de Frei, il faut envisager, en étudiant les substances qui interviennent dans la respiration bactérienne (surtout à propos des microbes aérobies, et de leurs rapports avec sa classification nouvelle des bactéries), le rôle de l'acide ascorbique à côté d'autres substances, dont la fonction activante a été déjà établie, par exemple le glutathion.

Il est intéressant d'examiner les opinions émises sur la relation qui existe entre l'acide ascorbique et la plupart des microbes pathogènes (on en a trouvé une pour la plupart des microbes aérobies) et éventuellement sur les relations entre ces derniers et certains de leurs produits, tels que les toxines. Grooten et Bezsonov assurent que la présence de l'acide ascorbique n'a pas encore été prouvée avec certitude dans les corps microbiens (contrairement à l'opinion récente de Frei citée plus haut). Etant donné qu'on y a découvert d'autres vitamines, les auteurs pensent qu'une substance aussi étran-

gère aux corps microbiens et possédant des qualités aussi éminemment réductrices, exerce certainement un effet bactéricide. Le bacille diphtérique et sa toxine sont les plus recherchés pour ces expériences, car on a constaté depuis longtemps que la quantité de vitamine C dans les glandes surrénales soumises à l'intoxication diphtérique, décroît rapidement. Polonyi, Carboso, Hard, Jungenblut ont montré dans une série de travaux, que dans une solution même très étendue d'acide ascorbique dans de l'eau physiologique, à un pH au-dessous de 6,8, le bacille diphtérique perd d'abord sa faculté de produire de la toxine, puis dégénère et meurt.

Récemment, Grooten et Bezsonov, un peu à l'encontre de l'opinion des autres auteurs, assuraient que l'action neutralisante de l'acide ascorbique vis-à-vis de la toxine diphtérique *in vitro* ne peut être réalisée que par un grand excès de cet acide (100 milligrammes pour 4MLD de toxine), tandis que *in vivo* l'action protectrice de l'acide contre la même toxine est à peu près nulle. D'autre part, l'action bactéricide de l'acide ascorbique contre les microbes dans un bouillon à réaction neutre est presque nulle ; s'il exerce une certaine bactériostase élective à l'égard du bacille de la coqueluche, elle se produit plutôt grâce à sa structure cyclique que par ses qualités réductrices. On verra plus loin que nous avons eu l'occasion de confirmer complètement ces derniers résultats.

Nos propres expériences sur l'acide ascorbique ont été réalisées pour la plupart avec des produits mis à notre disposition par Hoffmann-La Roche sous la forme de poudre cristalline, aisément soluble dans l'eau distillée et désignée sous le nom « d'acide *l*-ascorbique ». Quelques-unes ont été effectuées avec le « Cebion » de Merck.

Elles se divisent en six catégories :

I. Influence de l'acide ascorbique sur la croissance des anaérobies dans les cultures en milieu liquide (tubes de bouillon ordinaire, bouchés seulement avec un tampon d'ouate, c'est-à-dire en aérobiose complète).

II. Croissance des anaérobies, après addition d'acide ascorbique aux milieux solides (gélose en culot).

III. Influence de l'acide ascorbique sur la croissance des anaérobies dans les colonies en surface, comme dans la méthode

de Fortner, mais avec la gélose ordinaire, non additionnée de sang.

IV. Influence de l'addition d'acide ascorbique aux plaques classiques de Fortner au sang de lapin.

V. Production de toxines par les microbes anaérobies dans le milieu à l'acide ascorbique.

VI. Détermination du potentiel d'oxydo-réduction des milieux à l'acide ascorbique et des milieux de contrôle avant l'ensemencement et pendant la végétation.

Les souches dont nous nous sommes servis proviennent de la collection de l'Institut bactério-sérologique de l'Université Charles-IV, à Prague ; les unes ont été isolées en Tchécoslovaquie, les autres nous ont été envoyées de Paris (Institut Pasteur, 2), de Berlin, de Copenhague et de Varsovie. On a employé 35 souches d'anaérobies stricts : 4 souches différentes de *B. perfringens*, 4 souches différentes de vibron septique, 3 souches de *B. œdematiens*, 1 souche de *B. gigas*, 1 souche de *B. hemolyticus*, 3 souches de *B. histolyticus*, 4 souches de *B. sporogenes*, 1 souche de *B. aerofœtidus*, 2 souches de bacille tétanique, 4 souches de *Clostridium botulinum* et *parabotulinum*, 3 souches de *B. putrificus*, 1 souche de *B. saccharobutyrique*, 1 souche de *B. bif fermentans*, 2 souches de bacilles tétanomorphes et 1 souche d'anaérobie non sporogène (bacille de Schmorl). Plus de la moitié de ces souches étaient de provenance tchécoslovaque. Toutes les expériences ont été répétées et contrôlées dans les conditions les plus variées. La description exacte de ces expériences devant dépasser le cadre de ce travail, nous nous bornerons à une vue d'ensemble.

I. — EXPÉRIENCES AVEC LES MILIEUX NUTRITIFS LIQUIDES.

Nous avons versé le bouillon nutritif ordinaire *fraîchement régénéré*, dans des tubes stériles identiques, autant que possible, et d'une contenance approximative de 10 cent. cubes, pour que le bouillon en remplisse les *deux tiers*.

(2) Nous en exprimons nos plus vifs remerciements au professeur Weinberg.

Le premier groupe de bouillons :

a) N'a reçu aucune addition.

Au deuxième groupe :

b) Nous avons ajouté du glucose au taux de 1 p. 100.

Nous avons de même ajouté au troisième groupe :

c) 0,5 p. 100 de cystéine.

Au quatrième :

d) 0,5 p. 1.000 d'acide ascorbique.

Le pH de tous les bouillons, avant l'ensemencement, a été ajusté à 7,2-7,4. L'acide ascorbique et la cystéine en solution ne pouvant être stérilisés par ébullition, nous avons stérilisé la solution en la filtrant sur bougie. La quantité nécessaire de filtrat a été ajoutée au bouillon. La filtration entraîne probablement une certaine perte des matières examinées, mais cela n'a pas eu de conséquences fâcheuses. L'ensemencement fut pratiqué au moyen de deux gouttelettes très petites de cultures de quarante-huit heures en bouillon de foie. La lecture des résultats fut effectuée d'abord au bout de douze à quinze heures, ensuite après vingt-quatre heures, et ainsi progressivement jusqu'au sixième jour, durée de l'expérience. Le résultat fut contrôlé au microscope et, en cas de doute, par ensemencement sur plaques de Fortner.

Après le sixième jour de culture, l'expérience a donné le résultat suivant (utilisation de 32 souches microbiennes différentes) :

a) Dans le bouillon ordinaire en culture impure (souillé par les microcoques de l'air) : 1 souche de *B. perfringens* pousse d'une manière à peine perceptible, puis presque imperceptible ; 1 souche du bacille tétanique (atoxique), 2 souches de *B. histolyticus* et 2 souches de *B. botulinus* (qui ont manifesté, même au cours d'autres expériences, des exigences très faibles en fait d'anaérobiose).

Résultat final : sur 32 souches, 6 poussent, la plupart d'une manière à peine perceptible et, partiellement, grâce à une infection secondaire.

b) Dans les bouillons au glucose, toutes les souches du *B. perfringens* poussent, ainsi que la souche atoxique de bacille tétanique comme dans l'expérience précédente, 2 souches de *B. botulinus* identiques aux souches de l'expérience

précédente, une souche de bacille histolytique pousse partiellement, une souche de *B. putrificus* et le bacille de Schmorl.

En résumé, sur les 32 souches anaérobies, 9 seulement poussent, la plupart très faiblement.

c) Dans la cystéine, le bacille tétanomorphe donne un résultat négatif, de même une souche de *B. sporogenes*, 2 souches de *B. œdematiens*, le *B. putrificus* W. On constate une croissance faible du bacille de Schmorl et du *B. hæmolyticus*.

Sur 32 souches, 25 poussent activement, 5 ne se développent pas, et 2 croissent très faiblement.

d) Dans les cultures à l'acide ascorbique, le bacille tétanomorphe ne donne aucune végétation et le *B. gigas* y croît très faiblement (encore en partie grâce à l'infection secondaire). Le *B. hæmolyticus* et la souche de *B. œdematiens* qui, avec le *B. gigas* et quelques-unes des souches de *B. botulinus* sont, comme nous avons pu le constater, parmi les anaérobies les plus exigeants, poussent tout à fait bien dans ce milieu.

Sur 32 souches des microbes anaérobies cultivés sans l'acide ascorbique dans les conditions mentionnées, 30 poussent activement, une faiblement, une seule ne pousse pas. Nous avons donc le droit de conclure, en nous appuyant sur ces expériences, qu'avec une réaction neutre, l'acide ascorbique employé dans les conditions que nous avons mentionnées, permet la croissance des anaérobies stricts même en aérobiose et que, à ce titre, son action est encore plus efficace, plus durable et plus sûre que celle de la cystéine.

A titre d'orientation, on a essayé d'injecter quelques anaérobies pathogènes comme le *B. œdematiens*, le vibrion septique, le *B. gigas* et le *B. histolyticus* cultivés, d'une part, dans des bouillons de foie ordinaires et recouverts de vaseline, qui sont d'emploi ordinaire à l'Institut bactériologique et sérologique de l'Université Charles-IV, et de cultiver les mêmes bacilles dans le bouillon nutritif à l'acide ascorbique. On s'est servi de la quantité de culture juste nécessaire pour tuer l'animal. La conclusion d'ensemble est qu'il n'y a aucune différence dans les propriétés pathogènes des microbes cultivés dans les conditions ordinaires et dans celles des microbes provenant de la culture à l'acide ascorbique. On a joint à ce groupe d'expériences sur milieux nutritifs liquides, 2 souches

de bacille diphtérique assez toxiques et une souche de bactérie du charbon. On n'a pas non plus constaté de différence de toxicité ou de virulence entre les cultures ordinaires et celles à l'acide ascorbique.

Ainsi, l'*acide ascorbique* à la concentration de 0,5 p. 1.000 (des quantités plus considérables exigent une correction sensible du pH) *rend non seulement plus facile le développement des anaérobies stricts en aérobiose, et cela d'une manière plus parfaite que la cystéine, mais encore elle ne modifie pas la morphologie, la vitalité et les qualités pathogènes des anaérobies, ni la toxicité, ni la virulence des microbes aérobies.*

II. — DÉVELOPPEMENT DANS LA GÉLOSE MODIFIÉE D'APRÈS LA MÉTHODE DE VEILLON.

A cet effet, on a préparé de la gélose à 2 p. 100 à partir du bouillon de veau employé dans le groupe d'expériences I, et l'on a ajouté à chaque tube, avant qu'elle soit prise :

1° 1 p. 100 de glucose stérilisé en solution aqueuse.

2° A peu près 1 p. 1.000 de cystéine en solution, stérilisée par filtration sur bougie.

3° 1 p. 1.000 d'une solution d'acide ascorbique préparée de la même manière.

Dans cette série d'expériences on n'a pas employé de gélose ordinaire non additionnée de matières réductrices, parce qu'il est très vraisemblable qu'un autre anaérobie, à l'exception du *B. perfringens*, ne s'y développerait pas. Pour chaque microbe, on aensemencé cinq petits tubes de gélose (encore liquide après l'addition des substances réductrices), « sans recharger », d'après la formule de Veillon. La première lecture fut faite plus de dix-huit heures après, ensuite au bout de vingt-quatre heures, quarante-huit heures, etc., et l'expérience fut terminée au bout de six jours de culture. Dans ces expériences on n'a employé qu'une souche de chaque espèce de tous les microbes mentionnés, à savoir celle qui, dans les autres expériences, s'était montrée douée de la plus grande faculté de développement.

L'expérience terminée, l'état des microbes était à peu près le suivant :

1° La gélose au glucose est complètement disloquée avec le *B. perfringens*, le vibrion septique, le *B. putrificus* et le bacille tétranomorphe et elle laisse voir, dans les fentes, des impuretés secondaires. Le *B. œdematiens*, le *B. gigas*, le *B. botulinus*, le *B. hæmolyticus*, le bacille de Schmorl et le bacille du tétanos se développent *pauvrement*.

2° Avec l'acide ascorbique comme avec la cystéine, le développement devient à peu près de même intensité ; à l'exception du *B. perfringens* et du *B. sporogenes*, les colonies sont devenues plus grandes et plus caractéristiques que dans le glucose, la gélose étant peu disloquée et ne montrant aucune impureté. Les résultats donnés par l'acide ascorbique, surtout avec le vibrion septique, le *B. putrificus* et le *B. gigas* sont encore meilleurs que ceux obtenus avec la cystéine. L'avantage spécial des milieux à la cystéine et à l'acide ascorbique est la dislocation relativement peu importante produite par les microbes donnant des gaz ; le signe spécial qui témoigne que le potentiel de réduction des milieux nutritifs à la cystéine et à la vitamine est beaucoup plus incliné du côté négatif, est le *rétrécissement de la zone stérile de surface à peu près jusqu'au tiers de ce que nous avons observé dans les géloses au glucose* au cours de nos expériences. En somme, on peut considérer avec certitude les résultats obtenus avec l'acide ascorbique sur les milieux nutritifs liquides, à savoir que celui-ci est une source d'actions réductrices nécessaires à l'anaérobiose, supérieure de beaucoup au glucose couramment employé.

III. — EXPÉRIENCES AVEC DES COLONIES EN SURFACE.

Nous avons ensemencé les microbes sur plaque de gélose de façon à obtenir des colonies en surface caractéristiques. Ces expériences ont été les plus compliquées, car elles exigeaient d'être répétées, surtout lorsque deux essais avec la même souche ne donnaient pas de résultats complètement identiques. On s'est servi, pour cette culture, de plaques de Fortner (coulées de gélose *sans* addition de sang), dont la hauteur est la moitié de celle de la boîte de Petri et on a suivi la méthode de Fortner (symbiose avec le *B. prodigiosus*) avec obturation de

la boîte au moyen d'une plaque de verre carrée scellée à la plastiline. L'avantage de ces plaques sur celles de Fortner (au sang) est leur transparence partielle, de sorte qu'on peut suivre le développement sans ouvrir le système anaérobie. Le temps de l'incubation total fut de quatre jours. On a pris comme milieu nutritif :

- a) La gélose ordinaire préparée avec du bouillon de veau ;
- b) La même gélose avec 1 p. 100 de glucose ;
- c) La gélose avec 1 p. 1.000 de cystéine ;
- d) La même avec 1 p. 1.000 d'acide ascorbique.

Le pH de tous ces milieux, dans les expériences finales, variait de 7,2 à 7,4. Un pH supérieur à 7,5 est favorable aux milieux au glucose qui tourne à l'acidité après la glycolyse microbienne, mais il est nuisible à l'acide ascorbique dont l'action réductrice, à un pH plus élevé, baisse très vite. La différence du développement des microbes, dans ces conditions, est beaucoup moins évidente que sur les milieux nutritifs liquides, ce qui est compréhensible, puisque la symbiose avec le *B. prodigiosus* réalise presque à elle seule l'anaérobiose, lorsqu'il ne s'agit pas de microbes d'une sensibilité particulière ; enfin, la gélose elle-même contient, dans ce cas, des matières réductrices émises par le *B. prodigiosus*. On peut admettre que le potentiel de réduction du milieu nutritif peut être abaissé par l'union de l'acide ascorbique et des produits émis par le *B. prodigiosus*, cet abaissement allant jusqu'aux valeurs défavorables, données par Plotz ($rH = -2$). Ni l'acide ascorbique ni la cystéine n'ont été filtrés, car nous avons observé que la solution assez concentrée d'acide ascorbique ou de cystéine, si elle a été mise dans un milieu froid et obscur, pendant une demi-heure environ, est à peu près stérile par l'effet de son acidité et de ses qualités réductrices. Evidemment, les quantités finales d'acide ascorbique ajoutées au milieu nutritif sont moins grandes que celles indiquées (par suite de l'oxydation spontanée), mais pratiquement il n'en résulte aucune cause d'erreur.

Résultats :

B. perfringens (4 souches) : le développement est plus rapide et les colonies sont plus nombreuses dans l'acide ascorbique ;

le glucose vient ensuite, puis la cystéine, et enfin la gélose simple sans matières réductrices.

B. œdematiens (3 souches) : l'acide ascorbique vient en premier lieu avec ses colonies caractéristiques (d'après Zeissler), le glucose simple vient en dernier lieu.

B. gigas (1 souche) : les colonies sont les plus développées et les plus nombreuses dans l'acide ascorbique. La cystéine, le glucose et la gélose ordinaire donnent à peu près le même résultat, toutefois moins marqué que dans le cas précédent.

Vibrion septique (3 souches) : en premier lieu vient l'acide ascorbique, quelle que soit la souche considérée, puis la cystéine et le glucose. La gélose simple donne des colonies solitaires et sans aucun caractère spécial. A la différence du développement sur plaque de Fortner, l'acide ascorbique et la cystéine montrent une tendance à former des colonies compactes, aux prolongements nombreux, plutôt qu'un léger voile homogène.

B. hæmolyticus (1 souche) : même développement que celui du *B. gigas*.

B. sporogenes (4 souches) : 2 souches ne montrent aucune différence sensible de développement avec les différentes matières réductrices, 2 souches donnent de meilleurs résultats avec la cystéine et l'acide ascorbique qu'avec le glucose. La substance particulièrement favorable au *B. sporogenes* semble être la cystéine. Les cultures de *B. sporogenes* à la cystéine ont l'odeur d'hydrogène sulfuré.

B. histolyticus (3 souches) : la souche « Passage » atteint son meilleur développement dans les milieux à la cystéine, la souche « Berlin » dans l'acide ascorbique. La troisième ne montre pas de différence sensible avec les différentes substances.

B. botulinus (4 souches) : « A », « B », « C », « D », et une souche de *parabotulinus* ; dans 4 cas, le meilleur développement est obtenu avec l'acide ascorbique et la cystéine ; dans un seul cas avec l'acide ascorbique, la cystéine ayant une valeur à peu près égale à celle du glucose.

Bacille tétanique (2 souches) : la souche peu toxique de bacille tétanique se développe mieux dans l'acide ascorbique,

la souche « Varsovie » dans la cystéine, l'acide ascorbique et le glucose étant à peu près d'égale valeur.

Comme anaérobies non pathogènes, nous avons employé 2 souches de *B. putrificus*, 1 souche de *B. bif fermentans* et 1 souche de *B. aerofœtidus*.

B. putrificus « Fingerland » : le meilleur développement est obtenu dans la cystéine, ensuite dans l'acide ascorbique ; le développement dans le glucose et dans la gélose ordinaire est très faible.

B. putrificus « W » : l'acide ascorbique est le meilleur, la cystéine et le glucose sont à peu près égaux.

B. bif fermentans « Prague » : son développement, dans tous les milieux, est à peu près le même, les colonies au glucose sont plus massives, mais offrent une moindre tendance à former des voiles. Ce microbe est de ces anaérobies peu nombreux, dont les colonies atteignent, dans les milieux réducteurs sans albumines, des dimensions beaucoup plus considérables que sur plaque typique de Fortner.

B. aerofœtidus : son développement est le meilleur avec l'acide ascorbique, beaucoup plus faible avec le glucose et la cystéine.

IV. — EXPÉRIENCES SUR PLAQUES DE FORTNER ADDITIONNÉES DE SANG.

Ce groupe d'expériences a été réalisé en additionnant de l'acide ascorbique, à la dose de 1 p. 1.000, à la plaque typique de Fortner avec 10 p. 100 de sang de lapin. La plaque ordinaire de Fortner, sans addition d'aucune matière réductrice, servait de contrôle. Le pH des milieux et la technique d'ensemencement étaient à peu près les mêmes que dans les expériences précédentes. On a pris, de chaque espèce microbienne, une souche choisie comme en II. Le développement a été suivi pendant quarante-huit heures.

B. perfringens : colonies de grandeur à peu près égale, mais l'hémolyse est beaucoup plus accentuée avec l'acide ascorbique et en quantité beaucoup plus considérable.

Vibrion septique : croissance beaucoup plus rapide dans l'acide ascorbique.

B. histolyticus : colonies plus grandes et devenant plus muqueuses, après quarante-huit heures, avec l'acide ascorbique.

B. sporogenes : sensiblement meilleur avec l'acide ascorbique, mais seulement après quarante-huit heures.

B. oedematiens : sensiblement meilleur avec l'acide ascorbique.

B. gigas : croissance beaucoup plus massive avec l'acide ascorbique.

B. hæmolyticus : par exception, bien meilleur sur plaque de Fortner ordinaire

B. tetani : déjà au bout de vingt-quatre heures, la croissance est trois fois plus rapide dans l'acide ascorbique.

B. putrificus et tetanomorphus : même résultat.

B. botulinus : s'étend davantage sur plaqué de Fortner, mais la croissance est plus massive dans l'acide ascorbique.

B. de Schmorl : par exception, croissance plus faible dans l'acide ascorbique.

Il semble que l'acide ascorbique, ajouté aux milieux solides, améliore, de même que la cystéine, les possibilités de développement des anaérobies en colonies de surface dans les conditions d'anaérobiose courantes. L'acide ascorbique s'est montré plus actif même, dans nombre de cas, que la cystéine, de sorte qu'il peut être apprécié comme ayant une valeur égale à celle du glutathion expérimenté par Frei. Il n'existe que peu de cas où la cystéine soit plus avantageuse et bien plus rares encore sont ceux (*saccharobutyricus, tetanomorphus*) où le glucose a dépassé ces deux produits. Comme particulièrement remarquable et confirmant une observation faite d'autre part, on doit noter, pour le diagnostic des anaérobies, le fait que *la forme des colonies anaérobies de surface*, considérée par Zeisler comme un signe d'espèce constant, quoique variable dans certaines limites, est, en grande partie, fonction du potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture. Cette observation n'est peut-être pas également valable pour toutes les espèces d'anaérobies, mais elle vaut pour celles qui poussent en colonies avec prolongements ou qui tendent à former des voiles. Ce phénomène, capable d'expliquer les nombreuses différences dans la description des cultures anaérobies, est, à notre avis, de telle

importance qu'il vaut une étude spéciale. Lorsque la plaque de Fortner est vraiment insuffisante, il est possible de l'améliorer par l'addition de 1 p. 1.000 d'acide ascorbique.

V. — PRODUCTION DE TOXINES.

Dans les expériences qui suivent, nous avons essayé de déterminer quel est l'effet de l'acide ascorbique sur les toxines des microbes anaérobies les plus variés, à savoir si cet acide se montre indifférent ou s'il est susceptible de remplacer avantageusement le glucose, presque toujours employé pour la production des toxines anaérobies. Nous soulignons que nos résultats n'ont qu'une valeur d'orientation, car l'équipement de notre laboratoire et le nombre restreint des animaux à notre disposition ne nous ont pas permis de répéter nos essais. Nous n'avons pas eu non plus le loisir d'adapter nos souches aux conditions désirables et de réaliser un nombre suffisant de subcultures, comme l'exige la production des toxines en grande quantité.

Pour produire la toxine, on s'est servi de grandes fioles, contenant de 150 à 200 cent. cubes de bouillon en couche épaisse. On a obturé ces fioles à la paraffine ou à la vaseline stérile. La composition de nos milieux est la suivante : pour la production des toxines du *Vibrion septique*, du *B. histolyticus* et du bacille tétanique, bouillon composé de deux tiers de bouillon de veau ordinaire et d'un tiers de bouillon fait de caillot sanguin digéré par la pepsine. Les bouillons fraîchement régénérés ont été répartis à raison de 150 cent. cubes par fiole, l'un avec 1 p. 100 de glucose, l'autre avec 0,5 p. 1.000 d'acide ascorbique. Pour le tétanos, on a ajouté, en même temps, un troisième bouillon à 1 p. 100 de glucose, plus 0,5 p. 1.000 d'acide ascorbique. Un quatrième bouillon au glucose, celui que l'Institut d'Hygiène de l'État Tchèque employe couramment pour la production de la toxine, a servi de contrôle. Le pH final était de 7,2. Le bouillon tétanique n'a pu être conservé à l'étuve que dix ou douze jours, de sorte qu'on n'a pas obtenu, à coup sûr, le titre le plus élevé possible. Les cultures du *B. histolyticus* et celle du vibrion septique furent laissées à l'étuve, comme d'usage, pendant un temps court.

Le titrage a été effectué sur des cobayes. Pour le *B. histolyticus*, le titre a été déterminé par injection intradermique de la toxine et nous avons désigné par MLC la plus faible dilution de la toxine qui, injectée dans la peau sous le volume de 0 c. c. 1, provoque, au bout de trois jours, une nécrose dont le diamètre est d'environ 4 millimètres. La toxine du vibrion septique a été titrée sur les souris par injection intra-veineuse de 0 c. c. 5 de liquide.

Les résultats nous ont surpris dans une certaine mesure, parce qu'ils indiquent que, dans tous les cas, la production des toxines est plus favorisée par le glucose que par l'acide ascorbique. La différence la plus remarquable fut observée avec le *B. histolyticus*, dont la toxine au glucose produisit une nécrose nette à la dilution de 1/10, alors que la toxine à l'acide ascorbique n'agissait que concentrée. Pour le *Vibrion septique*, le titre du bouillon au glucose était de 15 MLC pour 1 cent. cube, celui de l'acide ascorbique n'était que de 10.

Les résultats les plus intéressants sont ceux que nous avons obtenus avec le bacille tétanique.

Comme il convient, on a utilisé, dans tous les cas, une même souche ; la préparation des milieux, l'incubation et le titrage furent faits parallèlement.

La toxine, dans notre bouillon au glucose, a donné environ 5.000 MLC par centimètre cube et, avec l'acide ascorbique seul, 1.000 MLD seulement. Le bouillon tétanique de l'Institut d'Hygiène, qui renferme, lui aussi, du glucose, n'a donné qu'environ 4.000 MLD, tandis que notre bouillon contenant du glucose et de l'acide ascorbique a donné 10.000 MLD par centimètre cube. Voici un exemple de ces titrages.

Tétanos 3.

Bouillon tétanique de l'Institut d'Hygiène (bouillon de veau glucosé).

SOLUTION	RÉSULTAT
1/5.000	+ 4 20
1/10.000	++++
1/15 000	+++

Titre constaté : environ 4.000 MLD par centimètre cube.

Tétanos 4.*Bouillon de veau glucosé et additionné d'acide ascorbique.*

SOLUTION	RÉSULTAT
1/1.000	+ 1
1/5.000	+ 2.20
1/10.000	+ 3 20
1/15.000	++++
1/20.000	+ 7.20

Titre constaté : 10.000 MLD par centimètre cube.

+, indique la mort de l'animal, le chiffre suivant indique le nombre de jours (à gauche du point décimal) et d'heures (à droite); + + + +, tétanos total, fortement marqué; + + +, tétanos total, plus faible.

Le résultat final de nos expériences est que l'acide ascorbique, aussi bien d'ailleurs que d'autres matières réductrices, s'est montré moins favorable que le glucose à la production des toxines anaérobies. Mais il est possible que cette influence défavorable soit plus apparente que réelle, parce que l'acide ascorbique accélère plus le développement des anaérobies que ne le fait le glucose (croissance 2 ou 3 fois plus rapide en anaérobiose). Il est donc possible que le maximum de production de la toxine soit atteint beaucoup plus tôt que dans les bouillons au glucose, de sorte que nos essais de toxicité auraient été faits en période de décroissance (surtout pour les toxines, dont le maximum est atteint en peu de temps, *B. perfringens* et vibrion septique par exemple). Malheureusement, le manque d'animaux nous a empêchés de faire la preuve expérimentale de cette hypothèse.

Nous considérons comme un résultat positif, qui semble important au point de vue pratique, celui que nous avons obtenu par l'emploi simultané du glucose et de l'acide ascorbique pour la production de la toxine, parce que l'augmentation au double du pouvoir toxique ne saurait être accidentelle.

VI. — DÉTERMINATION DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION.

Pour terminer, nous donnons quelques chiffres du titrage du potentiel d'oxydo-réduction des milieux nutritifs dont nous nous sommes toujours servis soit avant l'ensemencement, soit au cours du développement de certains microbes anaérobies sporulés, non pathogènes. Le potentiel des quatre milieux a été

déterminé électrométriquement avec une électrode au calomel saturée, à l'aide d'électrodes d'or et de platine. Nous nous bornerons à donner les résultats les plus démonstratifs.

1° Mesure du potentiel de notre bouillon nutritif (de veau), effectuée le 10 août 1936, à la température de 25° et à pH 7,5 :

a) Bouillon sans matières réductrices	+ 0,020 volt
b) Bouillon avec 1 p. 100 de glucose	+ 0,018 —
c) Bouillon avec 1 p. 1.000 de cystéine	— 0,090 —
d) Bouillon avec 1 p. 1.000 d'acide ascorbique	— 0,095 —

On remarque le grand pouvoir réducteur du bouillon avec la cystéine ou l'acide ascorbique, dont les titres sont à peu près les mêmes.

Mêmes bouillons que dans l'expérience précédente, mais vingt-quatre heures plus tard (en aérobiose) :

a.	+ 0,030 volt
b.	+ 0,012 —
c.	— 0,03 —
d.	— 0,056 —

Les taux du bouillon ordinaire se sont accrus en valeur positive (probablement par suite de l'absorption de l'oxygène de l'air), le bouillon glucosé est devenu plus réducteur, ce qui est dû probablement à la décomposition lente du glucose, tandis que les deux derniers ont élevé le potentiel d'oxydo-réduction à des valeurs presque positives, par la décomposition de matières aussi instables que la cystéine et l'acide ascorbique.

2° Autre exemple du bouillon à pH 7,4, à la température de 25° :

	FRAICHEMENT PRÉPARÉ	APRÈS 24 HEURES
a	+ 0,022 volt	+ 0,005 volt
b	+ 0,050 —	+ 0,005 —
c	— 0,155 —	— 0,020 —
d	— 0,195 —	— 0,040 —

3° Potentiel du bouillon préparé à partir du caillot sanguin :

	FRAIS	APRÈS 24 HEURES
a	+ 0,040 volt	+ 0,005 volt
b	+ 0,038 —	+ 0,012 —
c	— 0,145 —	— 0,010 —
d	— 0,168 —	— 0,090 —

Les données ci-dessus et d'autres montrent la grande différence qui existe, d'une part, entre le potentiel d'oxydo-réduction du bouillon ordinaire, celui du bouillon au glucose qui a toujours des valeurs positives, d'autre part entre les hautes valeurs négatives du bouillon à la cystéine et à l'acide ascorbique. On comprend aisément pourquoi les anaérobies, particulièrement ceux qui sont assez sensibles, ne peuvent se développer dans les conditions d'aérobiose, dans le bouillon au glucose, considéré d'ordinaire comme le moyen le plus apte à réaliser l'anaérobiose ; *d'autre part, on conçoit que les anaérobies puissent se développer, même dans des conditions d'aérobiose complète, dans le bouillon à la cystéine et à l'acide ascorbique.* Nous fondant sur nos chiffres, nous avons même le droit d'affirmer, selon le titrage du potentiel d'oxydo-réduction par la méthode potentiométrique, ce que nous avons déjà prouvé par la méthode expérimentale, à savoir que l'acide ascorbique est, quant à ses qualités réductrices, un moyen encore plus parfait que la cystéine. En outre, ce qui est essentiel autant qu'inattendu, son action réductrice est de plus longue durée (voir résultats après vingt-quatre heures) que celle de la cystéine.

A titre d'exemple, nous indiquons un titrage parmi ceux qui furent réalisés avec le *B. sporogenes* ensemencé dans nos quatre bouillons usuels :

- a) Bouillon ordinaire ;
- b) Bouillon au glucose ;
- c) Bouillon à la cystéine ;
- d) Bouillon à l'acide ascorbique.

Avant l'ensemencement (pH, 7,4 ; température, 25°) :

a	+ 0,035 volt
b	+ 0,05 —
c	— 0,140 —
d	— 0,146 —

L'addition de II gouttes de culture et le séjour de trois heures à l'étuve (37°) ont suffi à modifier les valeurs positives des bouillons a et b, mais n'ont changé en rien les bouillons c et d :

<i>a.</i>	— 0,033 volt
<i>b.</i>	— 0,025 —
<i>c.</i>	— 0,145 —
<i>d.</i>	— 0,130 —

Les mêmes cultures, après vingt-cinq heures d'incubation à 37° :

<i>a.</i>	— 0,040 volt
<i>b.</i>	— 0,045 —
<i>c.</i>	— 0,265 —
<i>d.</i>	— 0,200 —

Dans les bouillons *a* et *b*, il n'y a aucun signe macroscopique de développement, alors que dans les bouillons *c* et *d* le microbe montre un développement très remarquable.

On voit que les valeurs de *eH* mesurées par nous, même en tenant compte des erreurs commises, comptent dans le sens des expériences *in vitro*, à savoir que l'acide ascorbique est de même efficacité, ou encore plus efficace, pour le développement des anaérobies, que la cystéine, même lorsque les conditions d'anaérobiose ne sont pas complètes.

La différence entre l'action de l'acide ascorbique sur le développement des anaérobies et celle de la cystéine tient, croyons-nous, à ce que l'acide ascorbique n'est pas donneur d'hydrogène comme la cystéine, mais sous l'action de l'oxygène atmosphérique, tend à prendre la forme oxydée réversible, de sorte qu'il absorbe directement l'oxygène libre des milieux nutritifs et abaisse la période de latence du développement des microbes anaérobies au minimum. Si cette hypothèse était valable, l'effet de l'acide ascorbique serait plus grand que celui de la cystéine qui, par son oxydation, devient d'abord donneur d'hydrogène ; c'est seulement après que cet hydrogène peut se lier à l'oxygène, tandis que l'acide ascorbique est un accepteur de l'oxygène direct, ce qui explique son action plus efficace que celle de la cystéine dans la culture des anaérobies en aérobiose. D'autre part, on sait que l'oxydation de l'acide ascorbique est en partie réversible. Une partie de celui-ci prend la forme réduite et peut se lier de nouveau à l'oxygène. Cela explique pourquoi l'action réductrice de l'acide ascorbique est de plus longue durée que celle de la cystéine, dont l'oxydation est une réaction irréversible.

RÉSUMÉ.

1° *L'acide ascorbique facilite le développement des anaérobies stricts, et même des anaérobies les plus sensibles, dans des conditions aérobies.*

2° L'action de l'acide ascorbique est identique à celle de la cystéine, et même souvent plus efficace.

3° Selon notre expérience, on ne peut aucunement affirmer que l'acide ascorbique, aux doses que nous avons indiquées, en réaction neutre ou légèrement alcaline, soit nuisible à la vitalité ou à la production des toxines des microbes aérobies. Il n'est nuisible qu'à forte concentration ou si la réaction est très acide.

4° Dans les conditions ordinaires, l'acide ascorbique n'exerce pas une action plus favorable que celle du glucose à la production de la toxine des microbes anaérobies. *Mais il augmente très fortement la production des toxines des anaérobies, s'il est ajouté au bouillon en même temps que le glucose.* La combinaison de ces facteurs pourrait donc avoir une grande importance pratique.

5° On a trouvé, par le titrage du potentiel d'oxydo-réduction par voie électrométrique, que les milieux nutritifs représentés par les bouillons à l'acide ascorbique ont des valeurs négatives à peu près identiques à celles des milieux à la cystéine. Mais l'action réductrice de la vitamine C est de plus longue durée, de sorte que, pour un emploi pratique, l'acide ascorbique est de beaucoup supérieur à la cystéine.

6° On peut employer l'acide ascorbique non seulement comme moyen indépendant pour réaliser la culture des anaérobies dans les milieux liquides, mais encore comme substance d'addition à d'autres milieux, particulièrement aux plaques au sang, ce qui augmente de beaucoup leurs propriétés réductrices nécessaires à la réalisation de la première culture des anaérobies stricts les plus sensibles.

Nota : Après avoir envoyé notre travail à la rédaction des *Annales*, nous avons pris connaissance de deux mémoires traitant de sujets analogues, sous certains rapports, à notre étude, l'un d'Ehrisman, 1936, l'autre de Kliger et Guggenheim, 1938, qui avaient, jusqu'alors, échappé à nos recherches bibliographiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ARLOING, MOREL, JOSSERAND et THÉVENOT. *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 1937, p. 281 et 347.
- AUBERTIN, AUREL et GÉNEVOIS. *C. R. Soc. Biol.*, **98**, 1928, p. 957.
- BLEYER. *Münch. Med. Woch.*, 1933, p. 257.
- CARDOSO. *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 749.
- D'ANTONA. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **114**, 1934, p. 427.
- FRANTA. *C. l. c.*, **47**, 1936, p. 1472.
- FREI. *Ergebnisse der allgemeinen Pathol. : Allgemeine Biologie der anaeroben Bakterien*. München, 1936.
- FREI et RIEDMÜLLER. *Ztrbl. f. Bakt. Orig.*, **119**, 1930, p. 282 ; *ibid.*, **121**, 1931, p. 92.
- GAGYI. *Klin. Wochenschr.*, **15**, 1936.
- GROOTEN et BEZSONOFF. *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 413.
- GOLDIE. *Ces Annales*, **48**, 1932, p. 179.
- HAMSIK, RICHTER et WAGNER. *Lékarškà chemie*, Praha, 1931-1933.
- HODER et BREUER. *Zeits. f. Imm.*, **70**, 1931, p. 279.
- JUNGBLUT. *J. exper. Med.*, **62**, 1935, p. 517.
- JUNGBLUT et CLAUS. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **120**, 1935.
- KISHINS et SHIGAKI. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **99**, 1930, p. 187.
- KNIGHT. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **11**, 1933, p. 419.
- KOCH. *Ztrbl. f. Bakt. Orig. I.*, **132**, 1934, p. 358.
- KOLLE, KRAUS et UHLENHUT. *Handbuch der Path. Mikroorg.*, **4**, 1928 ; *ibid.*, **10**, 1929.
- LEPPER et MARTIN. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **101**, 1931, p. 39.
- LONG, PERRIN et OLITZKY. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **98**, 1930, p. 483.
- MAC CONKEY et SMITH. *J. exp. Med.*, **58**, 1933, p. 503.
- MOURIQUAND, EDEL et JOLY. *Ztrbl. f. Bakt. Ref.*, **119**, 1935.
- NESPOR. *Cas. l. c.*, **36**, 1936, p. 1130 ; *Biol. listy*, **1**, 1937, p. 49 ; *ibid.*, **2**, 1936, p. 118.
- PLOTZ. *C. R. Soc. Biol.*, **193**, 1930, p. 591.
- PLOTZ et GELOSO. *Ces Annales*, **45**, 1930, p. 613.
- POLONYI. *Wien. Med. Woch.*, **686**, 1935.
- REYMAN. *Ztrbl. f. Bakt. I. Orig.*, **108**, 1928, p. 401.
- SCOTT et BRANDLEY. *J. Bact.*, **26**, 1937, p. 1.
- STEPP, KUHNAU et SCHRODER. *Die Vitamine und ihre klinische Anwendung*, Stuttgart, 1937.
- WAGNER. *Biol. listy*, **1**, 1934, p. 6.
- WEINBERG et GINSBOURG. *Données récentes sur les microbes anaérobies*, 1927.
- WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, Paris, 1937.
- WURMSER. *Oxydations et réductions*, Paris, 1930.
- WURMSER et KUBO. *C. R. Soc. Biol.*, **125**, 1937, p. 620.
- WURMSER et LOUREIRO. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, p. 543 ; *ibid.*, **116**, 1934, pp. 101 et 583.