

HEXACHLOROCYCLOHEXANES ET MÉSOINOSITOL. ACTION DES α -, β -, γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES SUR DIVERSES BACTÉRIES

par

CLAUDE FROMAGEOT ET MAURICE CONFINO

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

L'étude de l'action inhibitrice des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane sur la croissance de divers champignons a fait récemment l'objet de plusieurs travaux. Au cours d'une série de recherches concernant *Saccharomyces cerevisiae* (souche Gebrüder MAYER), pour laquelle la nécessité du mésoinositol (2 $\mu\text{g/ml}$) est établie, KIRKWOOD et PHILLIPS¹ ont constaté que, des quatre isomères, l'isomère γ est le plus actif, inhibant toute croissance à la dose de 60 $\mu\text{g/ml}$; de plus, ils ont observé que des doses croissantes de mésoinositol introduites dans le milieu diminuent progressivement l'action inhibitrice de l'isomère γ , sans toutefois la supprimer entièrement. Dans les conditions expérimentales réalisées par les Auteurs américains, l'effet protecteur maximum est atteint pour une concentration en mésoinositol de 6 $\mu\text{g/ml}$. D'autre part, observant le comportement de *Nematospora Gossypii*, qui exige également l'apport de mésoinositol pour sa croissance, BUSTON, JACOBS et GOLDSTEIN² ont mis en évidence la toxicité de l'isomère γ et ont montré que, ici encore, cette toxicité s'atténue au fur et à mesure que croît la quantité de mésoinositol présent dans le milieu, pour s'affaiblir considérablement quand cette quantité a atteint la valeur optimum pour la croissance, à savoir environ 100 $\mu\text{g/ml}$. BUSTON et ses collaborateurs n'ont pas utilisé l'isomère δ ; ils ont d'autre part constaté que l'isomère α présente une très légère action toxique et que l'isomère β n'exerce aucune action. Ces observations ont conduit leurs auteurs aux conclusions que le γ -hexachlorocyclohexane se comporte ici en antagoniste du mésoinositol, et que les structures spatiales de cet isomère et du mésoinositol sont analogues. Ces conclusions sont en accord avec l'hypothèse émise par SLADE³, d'après laquelle l'action toxique si intense du γ -hexachlorocyclohexane vis-à-vis des insectes pourrait être due à son aptitude à concurrencer et à déplacer le mésoinositol, dont on connaît le rôle indispensable pour de nombreux organismes.

La validité de ces conclusions est toutefois rendue douteuse par les résultats obtenus par SCHÖPFER, POSTERNAK et BOSS⁴. Ceux-ci, au cours d'investigations portant sur le comportement de *Eremothecium Ashbyii*, champignon vis-à-vis duquel le mésoinositol, sans être indispensable, exerce une action éminemment favorable, ont constaté l'action toxique ou inhibitrice exercée par le γ -hexachlorocyclohexane sur la croissance ou sur la flavinogénèse; mais ils n'ont pu mettre en évidence qu'une action protectrice du mésoinositol très irrégulière. L'étude de diverses souches appartenant à différentes espèces de *Candida* (*C. Guilliermondi* (A. Cast.) LANGERON et GUERRA, *C. Guilliermondi* var. *nitratophila* DIDDENS et LODDER, *C. albicans* ROBIN, *C. albicans* MACKINNON 493 et 572, *C. albicans* DEN DOOREN DE JONG) a montré d'autre part que l'isomère γ n'exerce

sur leur croissance qu'une inhibition passagère ou négligeable et que le rôle protecteur du mésoinositol vis-à-vis de cette inhibition, est faible et inconstant.

En outre, il est apparu que le γ -hexachlorocyclohexane même à la dose de 64 $\mu\text{g/ml}$, n'exerce aucune action sur d'autres espèces de champignons, telles que *Phycomyces blakesleeanus* Bgf., *Saccharomyces ellipsoideus* HANSEN et *Saccharomyces oviformis* OSTERW. Enfin, SCHÖPFER et ses collaborateurs ont constaté que, en présence de 64 $\mu\text{g/ml}$ de l'isomère γ , la croissance de *Ustilago violacea* n'est que de 28 %, et que la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN (souche BERNE) n'est que de 21 % de celle des témoins, le mésoinositol n'exerçant dans ces deux cas, même à doses élevées, aucune influence. L'expérience faite avec *Saccharomyces cerevisiae* est particulièrement intéressante, car elle montre que, dans les conditions où ils se sont placés, les auteurs suisses n'ont pu confirmer les résultats de KIRKWOOD et PHILLIPS. SCHÖPFER et ses collaborateurs n'ont pas utilisé l'isomère δ ; ils signalent simplement que les isomères α et β n'exercent aucune action notable.

L'étude de l'action toxique rapide des mêmes isomères vis-à-vis du cilié *Glaucoma piriiformis*, observé à l'état non proliférant, a conduit CHAIX, LACROIX et FROMAGEOT⁵ à un autre genre de constatations. Ici, c'est l'isomère δ qui se montre le plus actif (20 $\mu\text{g/ml}$), l'isomère γ n'exerçant d'action rapidement visible qu'à une dose cinq fois plus forte. En outre, le mésoinositol ne manifeste aucune propriété protectrice contre la toxicité de l'isomère γ . Des observations analogues ont d'autre part été faites par CHAIX et LACROIX⁶ en ce qui concerne l'action des mêmes isomères sur l'œuf d'oursin, fécondé ou non.

Il apparaît ainsi que la supériorité de la toxicité de l'isomère γ n'est pas aussi générale qu'on aurait pu le croire autrefois, et que l'hypothèse du rôle anti-mésoinositol de cet isomère, à supposer qu'elle puisse être retenue dans quelques cas, n'éclaire pas plus le mécanisme de la toxicité de l'isomère γ que celle de l'isomère δ dans le cas des cellules animales dont il vient d'être question. Aussi nous a-t-il paru utile d'étendre ce genre d'investigations à d'autres microorganismes. Les bactéries présentent ici un intérêt tout particulier. En effet, il semble⁷ que non seulement elles ne nécessitent aucun apport de mésoinositol pour leur croissance, mais même qu'un grand nombre d'entre elles ne synthétise pas le mésoinositol. La plupart des bactéries paraît ainsi n'avoir aucun besoin de cette substance. Or, si vraiment la plus grande part de la toxicité de l'isomère γ correspondait à une action anti-mésoinositol, on pourrait s'attendre à une indifférence totale des bactéries vis-à-vis de cet isomère. Dans le présent travail, nous avons étudié systématiquement à ce point de vue l'action des quatre isomères de l'hexachlorocyclohexane sur la croissance de bactéries appartenant à des types différents, et nous avons recherché une action protectrice éventuelle du mésoinositol vis-à-vis des isomères γ et δ . Disons dès maintenant que, dans de nombreux cas, nous avons constaté une inhibition de la croissance bactérienne par les isomères γ et δ , l'isomère δ s'étant révélé légèrement plus actif ($\sim 15 \mu\text{g/ml}$), et que nous n'avons jamais pu mettre en évidence une action protectrice du mésoinositol ni vis-à-vis de l'isomère γ , ni vis-à-vis de l'isomère δ .

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Hexachlorocyclohexanes. Les différents isomères de l'hexachlorocyclohexane utilisés ici ont été préparés par nous à partir d'hexachlorocyclohexane industriel. La séparation et la purification de chacun des quatre isomères ont été faites par dissolutions et cristallisations successives dans l'alcool méthylique, avec addition éventuelle d'éther de pétrole, et dans le chloroforme, selon la méthode indiquée par SLADE⁸. Nous avons vérifié la pureté des isomères obtenus par dosage du chlore et par la détermination des points de fusion.

Bibliographie p. 152.

Chacun des isomères est utilisé en solution alcoolique (éthanol à 95°) à des concentrations variant de 0.05 % à 0.3 %, selon les cas. La quantité de solution alcoolique introduite dans 10 ml du milieu de culture des microorganismes est comprise entre 0.01 et 0.10 ml.

Microorganismes. Les bactéries utilisées proviennent des collections de l'Institut Pasteur*; nous les désignons par les noms mêmes sous lesquels elles sont conservées dans cet Institut.

BACTÉRIES ANAÉROBIES

I. ACTION DES DIVERS HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Disposition des expériences

Chacune des souches de bactéries anaérobies étudiées est ensemencée dans un tube ordinaire contenant 7 ml de bouillon de viande glucosé⁸ que l'on a maintenu préalablement 30 minutes au bain-marie pour chasser l'air dissous; après ensemencement ce tube est étiré, scellé sous vide et placé à l'étuve à 37° pendant un temps qui dépend de la vitesse de croissance des diverses bactéries; c'est la culture-mère ainsi obtenue qui sert à ensemencer les tubes destinés à l'étude de l'action des hexachlorocyclohexanes. On utilise pour cette étude la méthode mise au point par PRÉVOT pour le dosage de la pénicilline⁹. Les tubes en question sont munis d'un agitateur magnétique; dans chacun d'eux, on introduit 10 ml de bouillon de viande glucosé, coloré par addition d'une solution de vert Janus, à raison de 1 ml de solution du colorant à 1 %, pour 1000 ml de bouillon. On les stérilise ensuite 30 minutes à 110°; au cours de cette stérilisation, le vert Janus vire au mauve violacé. Avant de les ensemencer, on maintient ces tubes 30 minutes au bain-marie pour chasser l'air dissous dans le milieu; on les laisse refroidir à 37°; on en fait trois lots. Dans le premier lot, on ajoute avec les précautions nécessaires, sous les volumes indiqués plus haut, les solutions des divers isomères de l'hexachlorocyclohexane. On obtient ainsi toute une gamme de concentrations en hexachlorocyclohexanes, allant de 4 µg/ml à 35 µg/ml; le deuxième lot, qui constitue une première série de témoins, reçoit les mêmes volumes d'alcool pur; le troisième lot correspond à une deuxième série de tubes témoins qui ne subissent aucune addition. On agite pendant une vingtaine de secondes, puis on ensemence avec une pipette de précision, en ayant soin que l'extrémité de la pipette se trouve à environ 2 cm au-dessous du niveau du liquide. On agite à nouveau une vingtaine de secondes, et on place le tout au bain-marie à 37°. Les observations sont faites soit au moment où les tubes témoins sont décolorés, ce qui correspond à un laps de temps variable suivant les souches bactériennes, soit plus tard. Cette méthode permet de déterminer la concentration limite en substance active au-dessus de laquelle toute croissance est apparemment inhibée, et au-dessous de laquelle la croissance est apparemment identique à celle des tubes témoins. La réponse obtenue est ainsi une réponse de "tout ou rien".

Une telle méthode de travail appelle plusieurs remarques:

1. Les cultures jeunes de certaines souches bactériennes comme *Welchia perfringens* et *Clostridium butyricum*, dégagent une quantité considérable de gaz. Pour pouvoir prélever un volume exact de liquide pour l'ensemencement, il est nécessaire de se débarrasser de ce gaz, pendant au moins quelques minutes. Pour ce faire, on utilise le procédé indiqué par PRÉVOT¹⁰: on transvase stérilement la culture du tube scellé dans un tube à essais stérile, à l'aide d'une pipette à boule. Ce simple transvasement provoque l'éclatement des bulles de gaz du milieu; on achève le dégagement du gaz par secouage du tube, dans lequel on prélève alors sans difficulté un volume déterminé de suspension des microorganismes.

* Nous sommes heureux de remercier ici le Dr DUMAS et le Dr PRÉVOT qui ont mis très aimablement à notre disposition les diverses souches qu'ils possèdent, ainsi que les ressources de leurs laboratoires respectifs.

2. L'introduction des différents hexachlorocyclohexanes en solution alcoolique fait que l'on doit tenir compte de l'action propre éventuelle de l'alcool sur les bactéries étudiées. Une étude préliminaire faite à ce point de vue nous a montré que les espèces suivantes ne se développent pas en présence d'alcool à 1 %. (Addition de 0.10 ml à 10 ml de milieu). Nous avons donc dû éliminer de notre étude : *Acuformis dubitatus* A 40 A; *Clostridium septicum*; *Inflabilis pseudoperfringens* P.E. 2; *Inflabilis teras* A 11 B; *Plectridium capitovialis* 278; *Staphylococcus anaerobus* R.U.

3. L'addition des divers hexachlorocyclohexanes en solution alcoolique à un milieu aqueux provoque dans certains cas la précipitation et la cristallisation de ces isomères⁵. Aussi les concentrations en hexachlorocyclohexanes ont-elles été choisies ici de telle sorte qu'elles restent en dessous de la limite de précipitation des isomères dans le milieu, ou qu'elles atteignent tout juste cette limite. Ainsi, le léger trouble formé après addition des solutions des hexachlorocyclohexanes disparaît après agitation dans le cas de l'isomère γ , tandis que dans le cas de l'isomère α et surtout dans le cas de l'isomère β , la solution garde après agitation une opalescence très faible due vraisemblablement à la dispersion colloïdale de ces isomères dans le bouillon de culture. Quant à l'isomère δ , sensiblement plus soluble, il ne donne lieu, dans les mêmes conditions, à aucune précipitation.

4. La disposition des tubes de PRÉVOT ne permet pas la réalisation d'une anaérobiose stricte. Cette imperfection nous a empêchés d'étudier un certain nombre de bactéries qui se multiplient parfaitement en tubes scellés, mais sont incapables de se développer dans les tubes à agitation magnétique : *Clostridium oedementiens* chevaux; *Clostridium tetani* L. 42; *Fusiformis fusiformis* 271 M; *Streptococcus putridus* L. B.

Résultats

Disons tout de suite que dans aucun cas les isomères α et β n'ont exercé d'action inhibitrice sur la croissance des bactéries anaérobies, même à la concentration de 35 $\mu\text{g/ml}$, sensiblement supérieure à leur solubilité.

L'action inhibitrice des isomères γ et δ est au contraire très nette. Les détails expérimentaux la concernant sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I

SENSIBILITÉ DE DIVERSES BACTÉRIES ANAÉROBIES AUX γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Le volume de culture-mère utilisé pour l'ensemencement est de 0.1 ml, sauf dans le cas de *Eubacterium cadaveris* E.C.1 et de *Ramibacterium ramosum* D où il est de 0.2 ml.

La concentration maximum utilisée ici en isomère γ ou en isomère δ est de 30 $\mu\text{g/ml}$. Lorsque aucune inhibition n'est observée à cette concentration, nous le signalons par (—).

Toutes les bactéries du présent tableau sont Gram-positives.

Bactérie	Age de la culture-mère (heures)	Temps après lequel est faite l'observation (heures)	Concentration limite inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)	
			Isomère γ	Isomère δ
<i>Clostridium butyricum</i> CH	24	4	(—)	15
<i>Clostridium butyricum</i> CH	24	24	(—)	21
<i>Clostridium butyricum</i> CH 2	8	14	15	10
<i>Clostridium histolyticum</i> chevaux	8	14	8	4
<i>Clostridium Sordelli</i> 82	24	15	(—)	30
<i>Clostridium sporogenes</i> chevaux	8	8	9	9
<i>Eubacterium cadaveris</i> E.C.1	24	24	(—)	9
<i>Eubacterium nitrogenens</i> N 2	8	16	(—)	15
<i>Plectridium putrificum</i> Bienstock	24	14	30	9
<i>Ramibacterium ramosum</i> D	24	14	30	15
<i>Welchia perfringens</i> Lechien	8	14	(—)	21
<i>Welchia perfringens</i> Lechien	5	24	(—)	25

Ces résultats montrent que :

1. Toutes les bactéries étudiées sont sensibles, encore qu'inégalement, à la présence du δ -hexachlorocyclohexane.

2. Quelques bactéries sont indifférentes, en ce qui concerne leur croissance, à la présence du γ -hexachlorocyclohexane, à des doses égales ou inférieures à 30 $\mu\text{g/ml}$: *Clostridium butyricum* CH, *Clostridium Sordelli* 82, *Eubacterium cadaveris* E.C.I, *Eubacterium nitrogenes* N 2 et *Welchia perfringens* Lechien. La différence entre les souches voisines *Clostridium butyricum* CH et *Clostridium butyricum* CH 2, dont la première est insensible à la présence de l'isomère γ alors que la seconde est inhibée dans sa croissance par ce même isomère, mérite d'être signalée.

3. Lorsque les bactéries anaérobies sont sensibles à la présence de l'isomère γ , leur sensibilité est souvent moins grande que celle qu'elles manifestent vis-à-vis de l'isomère δ ; elle lui est parfois égale, mais jamais supérieure.

II. INFLUENCE DU MÉSOINOSITOL SUR L'ACTION INHIBITRICE DES γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Disposition des expériences

Les tubes préparés comme il a été dit plus haut sont divisés ici en cinq lots. Les tubes des trois premiers lots sont traités comme précédemment; les tubes du quatrième lot sont additionnés de volumes déterminés (0.02 à 0.20 ml) d'une solution aqueuse de mésoinositol à 0.3 %, et les tubes du cinquième lot reçoivent à la fois la solution de mésoinositol et la solution du γ - ou du δ -hexachlorocyclohexane.

Voici à titre d'exemple le détail de deux expériences portant, l'une (Tableau II) sur *Clostridium histolyticum*, particulièrement sensible à la présence des isomères γ et δ , et l'autre (Tableau III) sur *Clostridium butyricum* CH, sensible uniquement à l'isomère δ .

TABLEAU II

ACTION INHIBITRICE DU γ - ET DU δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LA CROISSANCE DE *Clostridium histolyticum*, EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE MÉSOINOSITOL

Age de la culture-mère: 8 heures

Quantité utilisée pour l'ensemencement: 0.1 ml

Observations faites après 14 heures

Température: 37° C

Concentration des solutions alcooliques en γ - ou en δ -hexachlorocyclohexane: 0.3 %

Concentration de la solution aqueuse en mésoinositol: 0.3 %

+ = Croissance identique à celle des témoins (tubes totalement décolorés)

± = Croissance à peine marquée (tubes partiellement décolorés)

o = Croissance nulle (tubes restés colorés)

Alcool seul (ml/10 ml)	Méso- inositol ($\mu\text{g/ml}$)	γ - ou δ -hexachlo- rocyclohexane ($\mu\text{g/ml}$)	Croissance en pré- sence des isomères		Croissance en ab- sence des hexachlo- rocyclohexanes
			γ	δ	
0.05 0.10	15 60				+
					+
					+
					+
		3	+	±	
		6	+	o	
	9 15 30 60	9	±	o	
		15	o	o	
		15	o	o	
		15	o	o	
		15	o	o	
		15	o	o	

TABLEAU III

ACTION INHIBITRICE DU δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LA CROISSANCE DE *Clostridium butyricum* CH, EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE MÉSOINOSITOL

Age de la culture-mère : 8 heures

Quantité utilisée pour l'ensemencement : 0.1 ml

Température : 37° C

Concentration de la solution alcoolique en l'isomère δ : 0.3 %

Concentration de la solution aqueuse en mésoinositol : 0.3 %

+ = croissance identique à celle des témoins (tubes totalement décolorés)

o = croissance nulle (tubes restés colorés)

Alcool seul (ml/10 ml)	Méso- inositol (μ g/ml)	δ -Hexachloro- cyclohexane (μ g/ml)	Croissance en pré- sence de l'isomère δ		Croissance en absence de l'hexachlorocyclo- hexane (après 4 h)
			Après 4 h	Après 24 h	
0.05					+
0.10					+
	9				+
	15				+
	60				+
		3	+	+	
		9	+	+	
		15	o	+	
	9	15	o	+	
	15	15	o	+	
	30	15	o	+	
	60	15	o	+	
		21	o	o	
		30	o	o	

Ces résultats sont très nets: ils montrent que l'inhibition de la croissance des bactéries anaérobies par le γ - ou par le δ -hexachlorocyclohexane n'est pas suspendue par le mésoinositol, même lorsque celui-ci est en quantité quatre fois supérieure à celle de l'isomère actif.

BACTÉRIES AÉROBIES

1. ACTION DES DIVERS HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Disposition des expériences

Chacune des souches de bactéries aérobies étudiées est tout d'abord ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon de viande glucosé, d'eau peptonée ou de milieu T (milieu de TRUCHE, KRAMER et COTONI¹¹). On obtient ainsi des cultures-mères qui, après 24 heures d'incubation à 37°, serviront à ensemencer les tubes mis en expérience. Ces tubes sont préparés de la façon suivante: après addition de 10 ml du milieu de culture, l'ensemble est stérilisé par passage à l'autoclave 30 minutes à 110°. On divise ensuite ces tubes en trois séries: ceux de la première série sont additionnés des solutions des divers isomères de l'hexachlorocyclohexane, sous les mêmes volumes que dans le cas des bactéries anaérobies; ceux de la deuxième série reçoivent les mêmes volumes d'alcool pur; enfin, quelques tubes qui constituent la troisième série (tubes témoins), ne subissent aucune addition. On agite chaque tube fortement, puis on ensemence par un volume donné (0.1 à 0.3 ml), de culture-mère. Après une nouvelle agitation, on place à l'étuve

à 37°. Le contenu des tubes reste limpide ou se trouble, suivant que les hexachlorocyclohexanes ajoutés inhibent ou non la croissance. Les observations sont faites comparative-ment avec les tubes témoins, en ayant soin d'agiter convenablement les tubes. Comme dans la méthode utilisée pour l'étude des bactéries anaérobies, on obtient ici une réponse de "tout ou rien" qui permet de déterminer la concentration limite active des substances en question.

Résultats

Indiquons immédiatement que, comme dans le cas des bactéries anaérobies, les isomères α et β n'exercent aucune action inhibitrice sur la croissance des bactéries aérobies étudiées ici. Au contraire, l'action inhibitrice des isomères γ et δ est très nette dans la plupart des cas. Les détails expérimentaux la concernant sont données dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

SENSIBILITÉ DE DIVERSES BACTÉRIES AÉROBIES AUX γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Le milieu de culture est constitué par du bouillon de viande glucosé, sauf dans le cas de *Streptococcus* MILLE (milieu T) et dans le cas de *Vibrio cholerae* POT (eau peptonée).

La concentration maximum utilisée ici en isomère γ ou en isomère δ est de 30 $\mu\text{g/ml}$. Lorsque aucune inhibition n'est observée à cette concentration, nous le signalons par (—).

Bactéries	Gram	Volume de culture-mère introduit (ml)	Concentration limite inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)			
			Observations après			
			24 heures		48 heures	
			γ	δ	γ	δ
<i>Bacillus subtilis</i> Caron	+	0.2	(—)	15		
<i>Escherichia coli</i> H	—	0.2	(—)	(—)		
<i>Pseudomonas pyocyanea</i> Bass	—	0.1	(—)	30		
<i>Proteus vulgaris</i>	—	0.2	30	21	(—)	21
<i>Brucella abortus</i> suis 5600	—	0.3			(—)	9
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Am. 8	+	0.1	9	9	21	9
<i>Bacillus anthracis</i> Veau Iran	+	0.1	(—)	15	(—)	15
<i>Staphylococcus aureus</i> Tisne	+	0.2	30	21	(—)	21
<i>Schigella dysenteriae</i> 35	—	0.1	(—)	(—)		
<i>Streptococcus</i> Mille	+	0.1	30	15	(—)	21
<i>Schigella paradysenteriae</i> Flexneri (SCHAFFNER)	—	0.1	(—)	9		
<i>Vibrio cholerae</i> Pot	—	0.3	30	25		
<i>Enterococcus</i> Gory	+	0.2	15	6	21	9

Il apparaît que la sensibilité des bactéries aérobies vis-à-vis des isomères γ et δ diffère selon les espèces:

1. Quelques-unes sont sensibles à la présence du γ - et du δ -hexachlorocyclohexane; tel est le cas, en particulier, de *Corynebacterium diphtheriae* Am. 8.

2. Certaines semblent insensibles à la présence de l'un et de l'autre de ces isomères: *Escherichia coli*, *Schigella dysenteriae* 35 et *Pseudomonas pyocyanea* BASS.

3. La plupart sont indifférentes, en ce qui concerne leur croissance, à la présence de l'isomère γ , tout en étant sensibles à la présence de l'isomère δ .

4. D'une façon très générale, lorsque les bactéries aérobies sont sensibles à la présence de l'isomère γ , leur sensibilité est inférieure à celle qu'elles manifestent vis-à-vis de l'isomère δ .

II. INFLUENCE DU MÉSOINOSITOL SUR L'ACTION INHIBITRICE DES γ - ET δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANES

Disposition des expériences

On prépare ici deux séries supplémentaires de tubes: une quatrième série qui est additionnée de volumes déterminés (0.02 à 0.20 ml) d'une solution aqueuse de mésoinositol à 0.3 %, et une cinquième série qui reçoit à la fois la solution de mésoinositol et la solution du γ - ou du δ -hexachlorocyclohexane.

Résultats

Les Tableaux V et VI donnent les résultats obtenus respectivement dans les cas de *Enterococcus* GORY, sensible à la présence des isomères γ et δ , et de *Bacillus subtilis* CARON, sensible uniquement à l'isomère δ .

TABLEAU V

ACTION INHIBITRICE DU γ - ET DU δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LA CROISSANCE DE *Enterococcus* GORY, EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE MÉSOINOSITOL

Age de la culture-mère: 24 heures

Quantité utilisée pour l'ensemencement: 0.1 ml

Température: 37° C

Concentration des solutions alcooliques en γ ou en δ -hexachlorocyclohexane: 0.3 %

Concentration de la solution aqueuse en mésoinositol: 0.3 %

+ = Croissance identique à celle des témoins (tubes totalement décolorés)

± = Croissance à peine marquée (tubes partiellement décolorés)

o = Croissance nulle (tubes restés colorés)

Alcool seul (ml/10 ml)	Méso- inositol (μ g/ml)	γ ou δ -hexa- chlorocyclo- hexanes (μ g/ml)	Croissance en présence des isomères				Croissance en absence des hexachloro- cyclohexanes	
			γ après 24 h	δ après				
				24 h	48 h	120 h		
0.05 0.10	15 30 60	3 6 9 15 15 15 15 30 30 30	+	\pm o o o o o o o o	+ + o o o o o o	+ + + o o o o o	+ + + + +	
	15 30 60 15 30 60	15 15 15 15 30 30 30 30	o o o o o o o	o o o o o o o	o o o o o o o	o o o o o o o		o o o o o o o

Ainsi, pas plus que dans le cas de bactéries anaérobies, le mésoinositol n'empêche l'action inhibitrice des isomères γ et δ de l'hexachlorocyclohexane de s'exercer vis-à-vis des bactéries aérobies.

TABLEAU VI

ACTION INHIBITRICE DU δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LA CROISSANCE DE *Bacillus subtilis* CARON, EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE MÉSOINOSITOL

Age de la culture-mère : 24 heures

Quantité utilisée pour l'ensemencement : 0.2 ml

Température : 37° C

Concentration de la solution alcoolique en l'isomère δ : 0.3 %

Concentration de la solution aqueuse en mésoinositol : 0.3 %

+ = Croissance identique à celle des témoins (tubes totalement décolorés)

± = Croissance à peine marquée (tubes partiellement décolorés)

o = Croissance nulle (tube restés colorés)

Alcool seul (ml/10 ml)	Mésoinositol (μ g/ml)	δ -Hexachloro- cyclohexane (μ g/ml)	Croissance après 24 h	
			En présence de l'isomère δ	En l'absence de l'isomère δ
0.05	6			+
	30			+
0.05	30			+
		6	+	
		9	±	
		15	o	
	6	15	o	
	15	15	o	
	30	15	o	

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours du présent travail montrent une fois de plus l'importance de la structure stéréochimique des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane pour leur activité biologique. Si l'on considère les résultats obtenus antérieurement avec d'autres organismes, on voit que dans aucun cas, l'isomère β ne se montre doué d'une activité biologique notable. Mais, si l'on fait abstraction de cet isomère, il apparaît que la répercussion de la structure des autres représentants de l'hexachlorocyclohexane n'est pas la même selon les différents groupes d'organismes. Dans le cas des bactéries, l'isomère δ apparaît en gros légèrement plus actif (environ deux fois en moyenne) que l'isomère γ , alors que l'isomère α ne présente aucune action. La sensibilité des bactéries aux hexachlorocyclohexanes diffère ainsi de celle des insectes, vis-à-vis desquels l'isomère γ exerce une action considérablement plus intense que celle de l'isomère δ , et de celle de la levure étudiée par KIRKWOOD et PHILLIPS¹, qui est également plus sensible à l'isomère γ qu'à l'isomère δ . D'autre part, le comportement des bactéries vis-à-vis des hexachlorocyclohexanes peut être comparé à celui du cilié *Glaucoma piriformis*, plus sensible à la présence de l'isomère δ qu'à celle de l'isomère γ ; toutefois, les bactéries se distinguent du cilié en question par leur indifférence vis-à-vis de l'isomère α . Ces différences de sensibilité des divers groupes d'organismes vis-à-vis des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane, rendent obscurs les modes d'action biologique de ces derniers. Elles montrent, en tous cas, que l'explication de cette action par antagonisme vis-à-vis du mésoinositol, ne peut avoir de portée générale. Même si certaines bactéries exigeaient du mésoinositol pour leur développement, on ne conçoit pas comment cette explication pourrait être appliquée à l'action du δ -hexachlorocyclohexane, puisque, d'après KIRK-

WOOD et PHILLIPS, l'antagonisme ne devrait s'exercer qu'entre l'isomère γ et le mésoinositol. D'ailleurs, la non-efficacité du mésoinositol sur l'inhibition provoquée par la présence aussi bien du γ - que du δ -hexachlorocyclohexane, suffit à écarter toute possibilité de relation entre ces substances dans le cas des bactéries étudiées ici.

D'autre part, il n'est pas encore possible d'attribuer la plus ou moins grande sensibilité des divers types de bactéries à un caractère connu; en particulier, il ne semble exister aucune relation entre cette sensibilité et le caractère de coloration au Gram, contrairement à ce que l'on observe dans d'autres cas.

Il serait évidemment intéressant de connaître les structures stéréochimiques des différents isomères de l'hexachlorocyclohexane. Malheureusement, cette structure ne semble être établie avec certitude que pour l'isomère β , le seul qui jusqu'ici se soit régulièrement montré inactif vis-à-vis de toutes les espèces biologiques étudiées. La structure des autres isomères n'a fait jusqu'ici l'objet que d'hypothèses, discutées en particulier par SLADE³, et qui ne reposent, d'ailleurs, que sur des bases fragiles. D'après SLADE, étant donné l'encombrement des atomes de Chlore, cinq isomères seulement de l'hexachlorocyclohexane seraient possibles, qui correspondraient aux isomères α , β , γ et δ , l'isomère α représentant un mélange racémique de deux isomères asymétriques. La découverte récente de l'isomère ε ¹² met évidemment en question la validité des conclusions précédentes. Quoiqu'il en soit, le présent travail, confirmant à ce point de vue la conclusion du travail de SCHÖPFER et de ses collaborateurs, montre qu'il n'existe guère de raison biologique pour attribuer à l'isomère γ une configuration spatiale analogue à celle du mésoinositol.

RÉSUMÉ

L'étude de l'action des isomères α , β , γ et δ de l'hexachlorocyclohexane sur la croissance de diverses bactéries, montre que:

1. Toutes les bactéries étudiées sont ici insensibles aux isomères α et β , ceux-ci étant présents à des doses inférieures ou égales à 30 $\mu\text{g/ml}$.

2. Les souches suivantes sont insensibles aux isomères γ et δ , ceux-ci étant présents à des doses inférieures ou égales à 30 $\mu\text{g/ml}$: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* 35 et *Pseudomonas pyocyanea* Bass.

3. Les souches suivantes sont insensibles à l'isomère γ , mais inhibées par l'isomère δ , la moyenne des concentrations limites actives de ce dernier étant de l'ordre de 15 $\mu\text{g/ml}$: *Clostridium butyricum* CH, *Clostridium Sordelli* 82, *Eubacterium cadaveris* E.C. 1, *Eubacterium nitrogenens* N 2, *Welchia perfringens* Lechien, *Bacillus subtilis* Caron, *Proteus vulgaris*, *Brucella abortus suis* 5600, *Bacillus anthracis* veau Iran, *Staphylococcus aureus* Tisné, *Streptococcus* Mille et *Shigella paradyseenteriae* Flexneri.

4. Les souches suivantes sont inhibées par l'isomère γ et par l'isomère δ : *Clostridium butyricum* CH 2, *Clostridium histolyticum* chevaux, *Clostridium sporogenes* chevaux, *Corynebacterium diphtheriae* Am. 8 et *Enterococcus* Gory.

D'une façon générale, lorsque les bactéries sont sensibles à la présence de l'isomère γ , leur sensibilité est souvent moins grande que celle qu'elles manifestent vis-à-vis de l'isomère δ ; elle lui est parfois égale, mais jamais supérieure.

5. L'inhibition de la croissance par l'isomère γ ou par l'isomère δ n'est suspendue en aucun cas par la présence de mésoinositol, même lorsque ce dernier est à une concentration quatre fois supérieure à celle de l'hexachlorocyclohexane. Cette inhibition ne correspond donc pas à un antagonisme entre les hexachlorocyclohexanes et le mésoinositol.

SUMMARY

Study of the action of the α , β , γ and δ isomers of hexachlorocyclohexane on the growth of various bacteria shows that:

1. All the bacteria studied here are insensitive to the α and β isomers at concentrations below or equal to 30 $\mu\text{g/ml}$.

Bibliographie p. 152.

2. The following strains are insensitive to the γ and δ isomers at concentrations below or equal to 30 $\mu\text{g/ml}$: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* 35 and *Pseudomonas pyocyanea* Bass.

3. The following strains are insensitive to the γ isomer but are inhibited by the δ isomer, the mean limiting active concentration of the latter being of the order of 15 $\mu\text{g/ml}$: *Clostridium butyricum* CH, *Clostridium Sordelli* 82, *Eubacterium cadaveris* E.C. 1, *Eubacterium nitrogenes* N 2, *Welchia perfringens* Lechien, *Bacillus subtilis* Caron, *Proteus vulgaris*, *Brucella abortus suis* 5600, *Bacillus anthracis* calf Iran, *Staphylococcus aureus* Tisné, *Streptococcus* Mille, and *Shigella paradysenteriae* Flexneri.

4. The following strains are inhibited by the γ and δ isomers: *Clostridium butyricum* CH 2, *Clostridium histolyticum* horse, *Clostridium sporogenes* horse, *Corynebacterium diphtheriae* Am. 8, and *Enterococcus* Gory.

In general, when bacteria are sensitive to the γ isomer, this sensitivity is often less than with respect to the δ isomer; it is sometimes equal to it but it is never greater.

5. The inhibition of growth by the γ and δ isomers is in no case prevented by the presence of meso-inositol, even when the concentration of the latter is four times as great as that of the hexachlorocyclohexane. The inhibition, therefore, does not correspond to an antagonism between the the hexachlorocyclohexanes and meso-inositol.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Untersuchung der Wirkung des α , β , γ , und δ -Isomere von Hexachlorzyklohexan auf das Wachstum verschiedener Bakterien zeigt, dass

1. alle hier untersuchten Bakterien für das α und β -Isomer unempfindlich sind, wenn diese Isomere in Konzentrationen, die kleiner sind als oder gleich an 30 $\mu\text{g/ml}$, vorhanden sind.

2. die folgenden Stämme für das γ und δ -Isomer unempfindlich sind, bei einer Konzentration dieser Isomere, die kleiner ist oder gleich an 30 $\mu\text{g/ml}$: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* 35 und *Pseudomonas pyocyanea* Bass.

3. die folgenden Stämme für das γ -Isomer unempfindlich sind, aber durch das δ -Isomer gehemmt werden, wobei die durchschnittliche aktive Grenzkonzentration des letzteren von der Grössenordnung von 15 $\mu\text{g/ml}$ war: *Clostridium butyricum* CH, *Clostridium Sordelli* 82, *Eubacterium cadaveris* E.C. 1, *Eubacterium nitrogenes* N 2, *Welchia perfringens* Lechien, *Bacillus subtilis* Caron, *Proteus vulgaris*, *Brucella abortus suis* 5600, *Bacillus anthracis* (Kalb Iran), *Staphylococcus aureus* Tisné, *Streptococcus* Mille und *Shigella paradysenteriae* Flexneri.

4. die folgenden Stämme durch das γ - und das δ -Isomer gehemmt werden: *Clostridium butyricum* CH 2, *Clostridium histolyticum* (Pferd), *Clostridium sporogenes* (Pferd), *Corynebacterium diphtheriae* Am. 8 und *Enterococcus* Gory.

Allgemein gilt, dass bei Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber der Anwesenheit des γ -Isomers, ihre Empfindlichkeit oft viel geringer ist als die gegenüber dem δ -Isomer; sie ist höchstens gleich, aber niemals grösser.

5. die Wachstumshemmung durch das γ -Isomer oder das δ -Isomer in keinem einzigen Fall durch die Anwesenheit von Mesoinosit aufgehoben wird, sogar wenn das letztere in einer vierfach grösseren Konzentration vorhanden ist als das Hexachlorzyklohexan. Die Hemmung entspricht also nicht einem Antagonismus zwischen den Hexachlorzyklohexanen und dem Mesoinosit.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. KIRKWOOD ET P. H. PHILLIPS, *J. biol. Chem.*, 163 (1946) 251.
- ² H. W. BUSTON, S. E. JACOBS ET A. GOLDSTEIN, *Nature*, 158 (1946) 22.
- ³ R. E. SLADE, *Chem. and Ind.*, 64 (1945) 314.
- ⁴ W. H. SCHÖPFER, TH. POSTERNAK ET M. L. BOSS, *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.*, 10 (1947) 443.
- ⁵ P. CHAIX, L. LACROIX ET CL. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 57.
- ⁶ P. CHAIX ET L. LACROIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 86.
- ⁷ B. C. J. G. KNIGHT, *Vitamins and Hormones*, 3 (1945) 108.
- ⁸ A. PRÉVOT ET H. J. BOORSMA, *Ann. Inst. Pasteur*, 63 (1939) 600.
- ⁹ A. PRÉVOT, *Ann. Inst. Pasteur*, 72 (1946) 840.
- ¹⁰ A. PRÉVOT, *Ann. Inst. Pasteur*, 72 (1946) 471.
- ¹¹ CH. DOPTER ET E. SACQUÉPÉE, *Précis de Bactériologie*, Baillière, Paris 1931.
- ¹² K. C. KAUER, R. B. DU VALL ET F. N. ALQUIST, *Ind. Eng. Chem.*, 39 (1947) 1335.

Reçu le 9 Février 1948