

ACTION DU δ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE (DELTEXANE*) SUR LE BACILLE TUBERCULEUX

par

CLAUDE FROMAGEOT ET THÉRÈSE SÉJOURNÉ

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

Des recherches précédentes¹ ont montré que la croissance de diverses bactéries aérobies et anaérobies est inhibée par le deltexane à une concentration de l'ordre de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et, moins souvent et à un moindre degré, par le gammexane. Il nous a paru intéressant d'étendre ces investigations au bacille tuberculeux.

Etant données la faible solubilité du deltexane dans l'eau et sa solubilité notable dans les lipoïdes, on pouvait en effet penser a priori que le bacille tuberculeux, particulièrement riche en ces derniers, serait aussi particulièrement sensible au deltexane. D'autre part, l'absence de toxicité du deltexane pour les animaux supérieurs² et son indifférence probable vis-à-vis de leur métabolisme pouvait faire espérer que l'action éventuelle du deltexane serait susceptible de s'exercer également *in vivo*, et sans dommage pour l'animal. D'autre part enfin, la comparaison des isomères δ et γ de l'hexachlorocyclohexane devait permettre de confirmer sur un nouvel exemple, la supériorité du deltexane comme inhibiteur de la croissance bactérienne. Le présent travail est ainsi consacré à l'étude des influences du deltexane et du gammexane sur la croissance de quelques souches de bacille tuberculeux *in vitro* et *in vivo*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Bactéries. Les souches, virulentes, de *Mycobacterium tuberculosis* utilisées proviennent de la collection de l'Institut Pasteur. Elles comprennent une souche humaine (H. 512) et deux souches bovines (B. 260 et DUPRÉ S). Les bactéries, conservées sur pomme de terre, sont tout d'abord repiquées sur liquide de SAUTON. Après une incubation de 4 à 7 jours à 37°, on prélève un fragment du jeune voile formé, avec lequel on ensemente les tubes en expérience.

I. INFLUENCE DU δ - ET DU γ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE SUR LA CROISSANCE DU BACILLE TUBERCULEUX, *in vitro*, SUR LIQUIDE DE SAUTON SEUL

Le milieu de culture utilisé ici est le liquide classique de SAUTON à 5 % de glycérine, neutralisé à pH 7.4 par l'ammoniaque avant stérilisation. Ce milieu est réparti à raison de 10 ml par tube dans des tubes à essais de 22 mm de diamètre. Le tout est stérilisé 30 minutes à 115°. Après refroidissement, les tubes sont additionnés de 0.01 ml, soit d'une solution alcoolique de deltexane, soit d'une solution alcoolique de gammexane, soit d'alcool pur; une série de tubes, enfin, ne subit aucune addition.

Les hexachlorocyclohexanes sont dissous dans l'alcool éthylique à 95°, à des concentrations s'échelonnant de 0.4 à 2.4 %, à intervalles de 0.2 %. Chaque tube additionné d'alcool contient ainsi

* Le δ -hexachlorocyclohexane apparaissant maintenant comme doué de propriétés biologiques intéressantes, et différentes de celles du γ -hexachlorocyclohexane, nous proposons par analogie avec ce qui a été fait pour ce dernier (gammexane), de donner à l'isomère δ le nom de deltexane.

toujours la même quantité d'alcool (0.1 %) et seule varie la concentration en hexachlorocyclohexane (de 4 à 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Les tubes sont finalement ensemencés par un fragment de voile, de quelques mm^2 , dans les conditions habituelles, capuchonnés, puis maintenus à 37°. Les observations sur la croissance des bactéries sont faites après 8 et 15 jours. Dans ces conditions, la croissance dans les tubes témoins non additionnés d'alcool se manifeste après 8 jours par la formation d'un voile recouvrant la totalité de la surface libre du liquide, puis ultérieurement par le développement d'une colerette sur la paroi des tubes, colerette qui après 15 jours, dépasse 1 cm. L'alcool seul, à la concentration de 0.1 %, n'exerce aucune influence, dans aucun cas, sur cette croissance.

L'influence des hexachlorocyclohexanes est la suivante:

Le *gammexane* n'exerce aucune action inhibitrice sur la croissance d'aucune des souches étudiées, et ce jusqu'à la concentration maximum utilisée, de 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En présence de *deltexane*, les trois souches bactériennes étudiées se comportent de la même façon: croissance identique à celle des tubes témoins, pour les concentrations en *deltexane* inférieures ou égales à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; croissance nettement ralentie pour les concentrations comprises entre 12 et 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$; croissance totalement supprimée pour les concentrations égales ou supérieures à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ces résultats sont indépendants de la durée d'incubation.

Le moment, par rapport à la stérilisation, auquel on introduit la solution alcoolique de *deltexane*, est très important; si, au lieu de traiter les tubes à l'autoclave *avant* l'introduction de *deltexane*, on les traite *après*, tout effet inhibiteur du *deltexane* sur la croissance bactérienne disparaît. Pour expliquer ce phénomène, on pouvait tout d'abord supposer que l'influence inhibitrice du *deltexane* s'exerce seulement en présence d'alcool. Ce dernier étant susceptible d'être éliminé par évaporation au cours de l'autoclavage, le *deltexane* perdrait alors son activité. Cette hypothèse impliquant une synergie entre alcool et *deltexane*, ne nous paraît pas devoir être retenue pour les raisons suivantes: 1. Il est peu probable que l'alcool à la concentration de 0.1 % puisse exercer une action quelconque; 2. Des expériences dans lesquelles nous avons fait varier la concentration en alcool de 0.1 à 1 %, ont toujours montré que la concentration minimum de *deltexane* nécessaire pour l'arrêt total de la croissance bactérienne, est toujours sensiblement égale à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$; or, si l'alcool jouait ici un rôle, la concentration minimum active du *deltexane* devrait s'abaisser quand la concentration en alcool croît. 3. L'addition après autoclavage de 0.1 % d'alcool à un milieu ayant été autoclavé après l'introduction du *deltexane* (à la dose de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) n'empêche absolument pas la croissance bactérienne.

Une deuxième explication serait que le *deltexane* au cours du chauffage sous pression à 115° subit une transformation, par exemple un début de saponification, qui lui enlève toute activité. Sans que nous puissions apporter la preuve expérimentale de la validité de cette hypothèse, c'est celle que nous considérons comme la plus plausible.

Les fragments de voile, déposés à la surface du liquide additionné de *deltexane* à des concentrations égales ou supérieures à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quoique incapables de proliférer, gardent un aspect apparemment normal. Pour savoir si la croissance des bactéries qui constituent ce voile est inhibée réversiblement ou irréversiblement, nous avons recueilli les divers fragments de voile après un séjour de 19 jours sur les solutions contenant le *deltexane* aux concentrations inhibitrices, et nous les avons transportés sur du liquide de SAUTON normal. D'autre part, il était intéressant de rechercher si les bactéries qui se développent en présence de quantités de *deltexane* inférieures à 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acquièrent vis-à-vis de cette substance une certaine résistance. Pour résoudre ce point, nous avons prélevé des fragments des voiles provenant de cultures obtenues en présence de *deltexane*.

à des concentrations non inhibitrices, et les avons ensemencés dans des séries de tubes contenant soit du liquide de SAUTON seul, soit du liquide de SAUTON additionné de deltexane à la concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les résultats obtenus au cours de ces deux groupes d'essais sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

INFLUENCE DU DELTEXANE SUR LA CROISSANCE DU BACILLE TUBERCULEUX AVANT ET APRÈS UN CONTACT DE 19 JOURS AVEC LES SOLUTIONS DE DELTEXANE

+ + = Croissance normale, identique à celle des témoins sans deltexane
 + = Croissance ralentie
 ± = Croissance douteuse
 o = Aucune croissance

Concentration des cultures initiales en deltexane ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Croissance	Croissance des bactéries repiquées	
		Sur SAUTON normal	Sur SAUTON + 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de deltexane
8	++	++	o
10	++	++	o
12	+	++	o
14	+	++	o
16	o	±	o
18	o	o	o
20	o	o	o
24	o	o	o

De l'ensemble de ces résultats il ressort que:

1. Les trois souches de bacille tuberculeux étudiées ici sont sensibles au deltexane et non au gammexane. C'est là un nouvel exemple de ce que le deltexane est plus souvent toxique pour les bactéries que le gammexane.

2. Comparativement à celle des autres bactéries sensibles au deltexane¹, la sensibilité du bacille tuberculeux n'est pas particulièrement marquée. Il n'apparaît donc pas que la teneur en lipoïdes du bacille tuberculeux joue ici un rôle.

3. L'action du deltexane correspond, au moins après un contact de 19 jours, à une action bactéricide et non pas bactériostatique. Cet effet bactéricide s'exerce sans qu'il y ait lyse cellulaire, contrairement à ce que l'on observe dans le cas du cilié *Glaucoma piritiformis*³.

4. Le fait que, après un contact de 19 jours en présence de deltexane à des concentrations inférieures à la concentration minimum totalement inhibitrice, les bactéries repiquées sur liquide de SAUTON contenant du deltexane à cette même concentration (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) restent incapables de croître, montre qu'il n'y a guère d'accoutumance des bactéries à la substance en question.

II. INFLUENCE DU DELTEXANE SUR LA CROISSANCE DU BACILLE TUBERCULEUX *in vitro* SUR LIQUIDE DE SAUTON EN PRÉSENCE DE SÉRUM

Chaque tube renferme ici 10 ml d'un milieu de culture constitué par le mélange de 5 ml d'une solution stérilisée à l'autoclave correspondant au liquide de SAUTON dont tous les constituants sont à une concentration double, 3 ml d'eau distillée stérile et 2 ml de sérum de cheval, stérilisé par filtration. Les tubes sont additionnés en outre de 0.01 ml soit d'une solution alcoolique de deltexane, soit d'alcool pur; une série de tubes, tubes témoins, ne contient ni alcool ni deltexane. Les concentrations du deltexane dans l'alcool éthylique s'échelonnent ici de 0.4 à 4.8 %. Les tubes sont ensuite ensemencés et traités comme il a été dit plus haut.

Les résultats sont tout à fait nets: en présence de 2 ml de sérum pour 10 ml de milieu de culture, toute activité du deltexane disparaît pour les concentrations inférieures ou égales à 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A la concentration de 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la croissance subit au début un certain ralentissement qui s'atténue d'ailleurs après 15 jours. Dans aucun cas, la croissance n'est arrêtée. La présence de sérum supprime ainsi pratiquement toute action inhibitrice du deltexane.

Cette action du sérum apparaît analogue à celle des tweens qui protègent *Glaucoma piritiformis* contre l'action毒ique du gammexane³; il semble que dans les deux cas, l'hexachlorocyclohexane soit fixé par la molécule protectrice, donnant un complexe inactif du genre de ceux décrits par ALEXANDER ET TRIM⁴ résultant de l'union de phénols et de détersifs. Quoi qu'il en soit, l'action protectrice du sérum permet de prévoir que l'influence du deltexane sur le bacille tuberculeux *in vivo* doit être nulle.

Une série d'expériences faites sur 30 cobayes, inoculés avec la souche H. 512, a montré qu'il en est bien ainsi. Cette expérience, dans les détails de laquelle il est inutile d'entrer, a confirmé d'autre part l'innocuité du deltexane, injecté chez 15 animaux par voie intramusculaire à la dose journalière de 15 mg par animal, sous forme d'une suspension micro-cristalline, dans 1 à 3 ml d'une solution hydroalcoolique à 30% d'alcool.

Nous sommes heureux de remercier ici MM. BRETEY et POCHON, de l'Institut Pasteur, qui ont mis aimablement à notre disposition les ressources de leurs laboratoires, et en particulier les diverses souches de bacille tuberculeux; M. BOISVERT, du même Institut, dont les conseils techniques nous ont été précieux; et M. CONFINO auquel nous devons la préparation des hexachlorocyclohexanes purs.

RÉSUMÉ

Le δ -hexachlorocyclohexane (deltexane) inhibe complètement à la concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (3 souches) sur liquide de SAUTON. Le γ -hexachlorocyclohexane (gammexane) n'exerce aucune action à la dose de 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$. L'action inhibitrice du deltexane disparaît en présence de sérum.

SUMMARY

δ -Hexachlorocyclohexane (deltexane) inhibits completely at a concentration of 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ the growth of *Mycobacterium tuberculosis* (3 stocks) on SAUTON liquid. γ -Hexachlorocyclohexane (gammexane) has no effect at a concentration of 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The inhibiting action of deltexane disappears in the presence of serum.

ZUSAMMENFASSUNG

δ -Hexachlorocyclohexan (Deltexan) hemmt in der Konzentration von 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vollständig das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* (3 Stämme) auf der Flüssigkeit von SAUTON. γ -Hexachlorocyclohexan (Gammexan) hat in einer Konzentration von 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keinerlei Effekt. Die Hemmwirkung von Deltexan verschwindet bei Anwesenheit von Serum.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ CL. FROMAGEOT ET M. CONFINO, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 142.
- ² T. DRESDEN ET B. J. KRIJGSMA, *Bull. Entomol. Research*, 38 (1948) 575.
- ³ P. CHAIX, L. LACROIX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 57.
- ⁴ A. E. ALEXANDER ET A. R. TRIM, *Proc. Roy. Soc. B.*, 133 (1946) 220.

Reçu le 17 juillet 1948