

Académie royale
des
Sciences coloniales

CLASSE DES SCIENCES NATURELLES
ET MÉDICALES

Mémoires in-8°. Nouvelle série.
Tome VI, fasc. 4.

Koninklijke Academie
voor
Koloniale Wetenschappen

KLASSE DER NATUUR- EN
GENEESKUNDIGE WETENSCHAPPEN

Verhandelingen in-8°. Nieuwe reeks.
Boek VI, aflev. 4.

L'ITURINE, NOUVEL ANTIBIOTIQUE D'ORIGINE CONGOLAISE

PAR

L. DELCAMBE

DOCTEUR EN SCIENCES CHIMIQUES
ATTACHÉ AU CENTRE DE RECHERCHES POUR LA PÉNICILLINE ET LES AUTRES
ANTIBIOTIQUES (LIÈGE)
MINISTÈRE DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

ET

R. DEVIGNAT

DOCTEUR EN MÉDECINE. — DIRECTEUR DE LABORATOIRE
DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE TROPICALE D'ÉLISABETHVILLE



Rue de Livourne, 80a
BRUXELLES

Livornostraat, 80a
BRUSSEL

1957

Hors commerce.

L'ITURINE, NOUVEL ANTIBIOTIQUE D'ORIGINE CONGOLAISE

PAR

L. DELCAMBE

DOCTEUR EN SCIENCES CHIMIQUES
ATTACHÉ AU CENTRE DE RECHERCHES POUR LA PÉNICILLINE ET LES AUTRES
ANTIBIOTIQUES (LIÈGE)
MINISTÈRE DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

ET

R. DEVIGNAT

DOCTEUR EN MÉDECINE. — DIRECTEUR DE LABORATOIRE
DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE TROPICALE D'ÉLISABETHVILLE

Mémoire présenté à la séance du 19 janvier 1957

RAPPORTEURS : MM. A. DUBOIS et A. CASTILLE.

L'Iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise.

I. INTRODUCTION

Il y a une dizaine d'années, l'un de nous, au cours de ses recherches bactériologiques, eut l'attention attirée par une souche d'un bacille sporulant doué de propriétés antibiotiques intéressantes.

Cette souche ayant été trouvée la première fois dans l'Ituri, au Congo belge, la ou les substances antibiotiques élaborées par elle dans les jus de culture furent appelées « iturine ». Dès le début des essais, effectués avec des jus de culture bruts, non purifiés, il fut possible de nettoyer et de guérir les ulcères phagédéniques en traitement au dispensaire attenant au laboratoire. Encouragé par ces premiers résultats, l'étude systématique de l'iturine fut alors entreprise en Belgique dans un laboratoire spécialisé ⁽¹⁾ pour l'étude des antibiotiques et pourvu d'une usine-pilote. C'est dans ce laboratoire que furent élaborées des méthodes de fabrication efficaces permettant de produire de l'iturine purifiée en quantité suffisante pour la réalisation des nombreuses recherches et essais nécessaires à la mise au point complète d'un nouvel antibiotique. L'un de nous put ainsi déterminer les principales propriétés physicochimiques ainsi que les activités biologiques de cette nouvelle substance.

C'est au cours de ces essais que fut notamment décelée l'activité antifongique puissante de l'iturine. Récemment, il fut possible de mettre à la disposition des cli-

⁽¹⁾ Le Centre de Recherches pour la pénicilline et les autres antibiotiques, Liège.

4 L'ITURINE, NOUVEL ANTIBIOTIQUE D'ORIGINE CONGOLAISE

niciens, suffisamment de produit purifié pour traiter environ 200 cas de mycoses cutanées bien déterminées et se faire ainsi une opinion exacte de la valeur thérapeutique de ce nouveau produit.

Devant les excellents résultats cliniques obtenus, la préparation industrielle de l'iturine a été décidée et est en voie de réalisation.

La présente note relate dans les grandes lignes les recherches effectuées au Congo et en Belgique depuis la découverte de la souche jusqu'aux essais cliniques effectués récemment.

II. DESCRIPTION ET CARACTÈRES DE LA SOUCHE PRODUCTRICE

1) Identification selon **BERGEY** [3] (*).

L'examen microscopique nous montre un streptobacille dont les éléments, gram positifs, mesurent de 3 à 6 μ de long sur 0,4 à 0,7 μ de large, et se groupent en chaînes. Celui-ci est très mobile et forme dans certaines conditions, des spores ellipsoïdes allongées, à paroi mince, mesurant de 1,5 à 1,8 μ de long sur 0,5 à 0,6 μ de large, qui apparaissent centralement ou subcentralement, sans déformation du sporangium [1]. En aérobiose, ce bacille se développe bien à des températures comprises entre 20 et 45° C. La croissance est arrêtée à 56° C. Le pH des cultures au départ peut être compris entre 5,5 et 8,5. Les isolements sur gélose fournissent des colonies blanchâtres des deux types *rough* et *smooth*. En bouillon ordinaire, il se produit un voile blanc plissé, assez résistant. Sur milieux liquides sucrés, le voile est plus dense et le milieu se trouble.

Sur gélose au sang, la culture est grasse et collante et s'entoure rapidement d'un halo d'hémolyse du type β . Le bacille hydrolyse la gélatine, l'amidon et coagule le lait dont il redissout rapidement le caillot. Il ne produit ni hydrogène sulfuré ni indol. Il réduit les nitrates en nitrites mais ne produit pas d'acide nitreux aux dépens des protéines du bouillon ordinaire. Il produit de l'acétyl-méthylcarbinol (VOGES-PROKAUER) aux dépens du glucose, mais n'acidifie pas le milieu

(*) Les chiffres entre [] renvoient à la bibliographie, p. 75.

glucosé jusqu'au virage du rouge de méthyle (*methyl-red test*).

En micro-glucide dish ou boîte à sucres en présence du réactif d'Andrade comme indicateur, il fermente en 24 heures avec caméléonage au troisième jour : le glucose, le maltose, le saccharose, le xylose, le glycérol et le sorbitol. Il n'attaque pas : le lactose, le rhamnose, le galactose, l'arabinose, le raffinose, la salicine, la dextrine, l'amygdaline, l'inuline, le dulcitol, l'inositol, l'érythritol et le mannitol.

Conclusion.

Bien que certaines imprécisions subsistent au sujet de la classification de ce bacille, il semble bien que l'on puisse le classer dans le genre *Bacillus* sous le groupe *Bacillus subtilis* pris dans le sens large adopté par BERGEY dans la dernière édition de son manuel.

Peut-être serait-il opportun de spécifier que ce bacille provient de l'Ituri et produit de l'iturine en lui ajoutant une indication de variété soit :

Bacillus subtilis, var. *Ituriensis*.

2) Types de colonies.

Les colonies, sur gélose ordinaire, se présentent sous deux aspects : les unes sont bombées, visqueuses, blanchâtres (type S) ; les autres plus plates, plus sèches, blanchâtres également, à surface ridée caractéristique (type R) [1]. Ces deux types donnent des cultures actives en milieu liquide bien que des différences se manifestent dans la production d'iturine (voir plus loin).

Ces colonies s'étendent aisément et avec certains milieux (contenant du sucre, par exemple) forment un voile peu visible sur toute la surface du milieu nutritif.

III. COMPLEXITÉ DES JUS DE CULTURE BRUTS

1) Schéma de fractionnement [1].

Dès le début des essais d'isolement des substances actives contenues dans les jus de culture, il est apparu qu'il s'agissait d'un mélange complexe. La méthode de fractionnement représentée *fig. 1* a été utilisée tout au

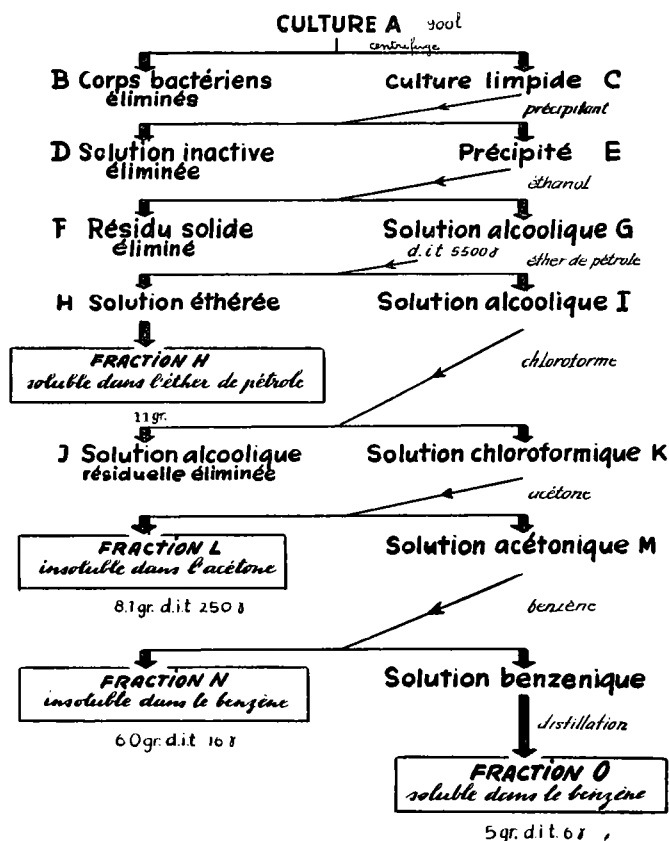


FIG. 1. — Iturine. Schéma d'extraction.

d.i.t. = dose par ml produisant une inhibition totale de la croissance de *Staphylococcus aureus*.

début des essais sur l'iturine, au moment où on ignorait tout des propriétés de cette substance. Il ne s'agit donc pas d'un procédé de fabrication mais uniquement d'une méthode ayant permis d'isoler trois groupes de substances actives. Les cultures traitées avaient été produites en bouillon peptoné en bouteilles stationnaires. La précipitation était effectuée par un acide ou un sel (sulfate ammonique ou chlorure calcique).

2) Caractères distinctifs des trois fractions actives O, N et L.

Ces trois fractions se différencient d'abord par leurs caractères de solubilité qui ont, du reste, permis de les séparer.

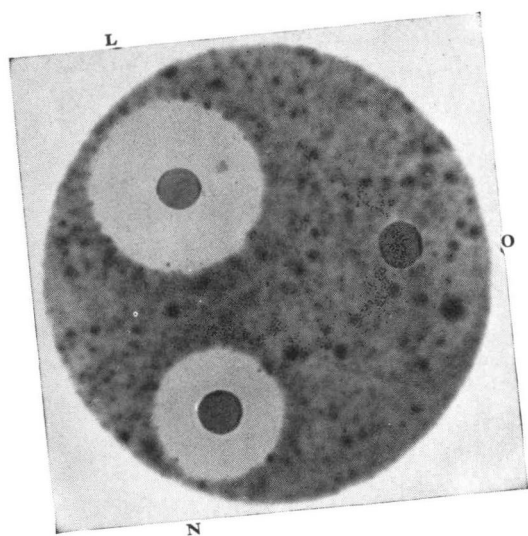
D'autres critères permettent encore de les différencier nettement, par exemple :

a) Spectre antibiotique.

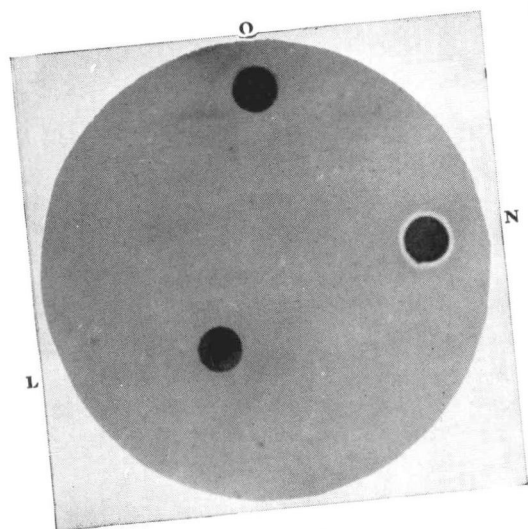
Par la technique de diffusion (voir description plus loin) à partir d'une rondelle de papier filtre imbibée de 5.000 γ de produit en solution, on obtient avec la fraction L une inhibition de 25 m/m env. sur *Penicillium notatum*, *Sarcina lutea* ; 18 m/m sur *S. aureus* 17, *Bacillus megatherium* 337, *B. Subtilis* G 543 ; et une activité nulle sur *Escherichia coli* CA 23, *Proteus vulgaris* OX 19 et *Pseudomonas aeruginosa* (voir fig. 2).

Avec la fraction N, à la même concentration, on obtient une inhibition de 22 m/m sur *S. aureus* 17, *B. megatherium* 337 et *B. subtilis* G 543 ; 18 m/m sur *P. notatum* et *S. lutea* ; enfin 7 m/m sur *E. coli* CA 23, *P. vulgaris* OX 19 et *PS. aeruginosa*.

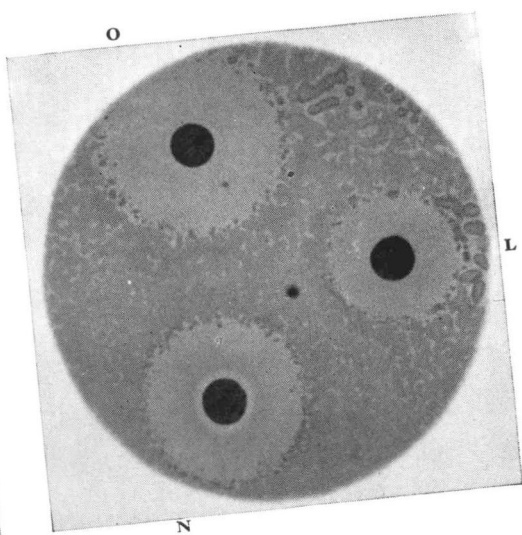
Avec la fraction O, à la même concentration, on obtient une inhibition de 25 m/m sur *S. aureus* 17, *B. megatherium* 337 et *B. subtilis* G. 543. L'activité est



P. notatum.



P. vulgaris.



B. megatherium.

L : fraction insoluble dans l'acétone.
 N : fraction insoluble dans le benzène.
 O : fraction soluble dans le benzène.

FIG. 2. — Différences d'activité antimicrobienne des trois fractions O, N et L.

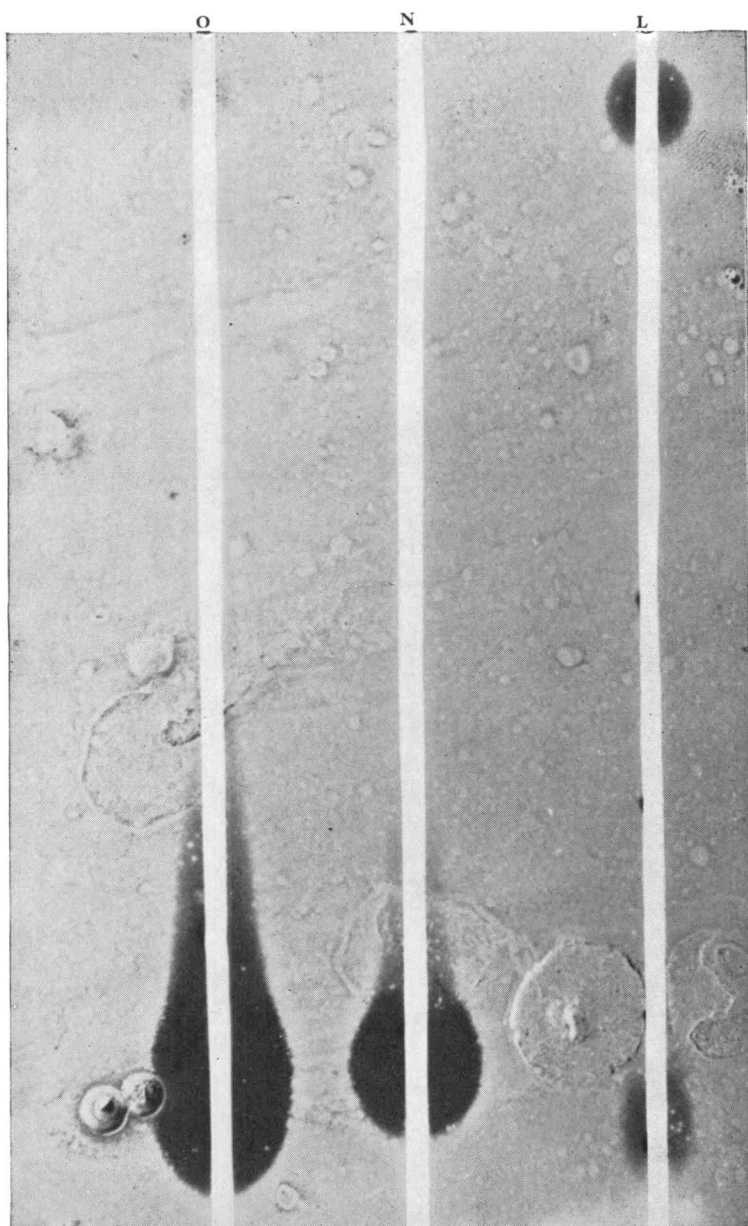


FIG. 3. — Développement (par inhibition de la croissance de *S. aureus*) des chromatogrammes sur papier correspondants aux fractions O, N, et L de l'iturine.

nulle sur *E. coli* CA 23, *P. vulgaris* OX 19, *P. S. aeruginosa* *P. notatum* et *S. lutea* [1].

b) Thermostabilité.

L'autoclavage à 120° annule l'activité de la fraction N sur *E. coli* ; réduit l'activité sur *S. aureus* des fractions O et N au 1/10 et au 1/100 pour la fraction N. La fraction L par contre, qui est beaucoup plus résistante à la chaleur, ne voit son activité sur *P. notatum* réduite que de moitié environ.

c) Résistance aux U. V.

L'irradiation d'une solution diluée de la fraction étudiée, disposée en couche mince (5 mm environ), est effectuée au moyen d'une puissante lampe en quartz « original Hanau » type ST U 500. La distance du brûleur à la solution est de 35 cm. Dans de telles conditions, la fraction N perd toute activité en 10 minutes ; la fraction O n'est détruite qu'après 20 à 25 minutes tandis que la fraction L garde toute son activité, même après 30 minutes d'irradiation.

d) Chromatographie sur papier.

Celle-ci a été effectuée sur papier Whatman n° 1 avec de nombreux solvants ou paires de solvants (chromatographie de partage) en vue d'examiner la pureté des diverses fractions. La substance active a été déposée à la micropipette à raison de 50 à 200 γ . Après développement du chromatogramme, la bandelette est séchée et placée sur de la gélose ensemencée de *Staphylococcus aureus*. Après incubation à 37°, la position des substances actives est repérée par l'inhibition de la croissance bactérienne. La fig. 3 montre les chromatogrammes

obtenus avec les solvants CHCl_3 /eau. Les fractions O et N ont des R_F voisins tandis que L ne s'est pratiquement pas déplacé. La faible tache en tête du chromatogramme de L indique que cette fraction contient vraisemblablement encore un faible pourcentage de la fraction O [1].

Dans d'autres essais, notamment avec $\text{C}_6\text{H}_6 + 15\%$ de CH_3OH et en utilisant 400 γ de la fraction O, on obtient une longue tache crénelée, ce qui indique que cette fraction contient plusieurs substances actives.

e) Vitesse de dialyse.

Des essais de dialyse, effectués en vue de débarrasser les diverses fractions de leurs impuretés colorées, nous ont montré que les fractions O et N traversent aisément une membrane de cellulose tandis que la fraction L ne dialyse que très lentement.

Conclusion.

Ces diverses techniques montrent que parmi les trois fractions isolées, deux d'entre elles présentent des propriétés assez voisines tandis que la troisième a des caractéristiques fort différentes.

IV. LIPOÏDES ACCOMPAGNANT L'ITURINE

1) Influence du type de souche utilisée sur la production des fractions O et N.

On a vu que deux types de colonies avaient été isolés : les unes grandes, blanches plutôt sèches, les autres petites, grasses, translucides.

D'après des essais de production en tubes contenant 4,5 cm³ de bouillon ordinaire, incubés à 25° et à 37°, nous avons observé que les petites colonies produisent plus de produit actif sur *S. aureus* 17 que les grandes colonies.

L'activité mesurée par le diamètre des zones d'inhibition est de 25 mm contre 15 mm, après 8 à 10 jours d'incubation. La production est légèrement supérieure à 25° C.

Des colonies de mutants isolés après irradiation aux rayons ultra-violets n'ont pas une production supérieure, en fractions O et N, à celle de la souche originale.

2) Relation entre les conditions de culture et la production des fractions O et N.

a) L'aération.

Si on réduit l'aération des cultures, par exemple, en plaçant au-dessus du bouillon ensemencé une couche de 1 cm de paraffine stérilisée, le voile blanc qui se forme, est beaucoup moins abondant qu'avec une aération normale et l'activité mesurée est très faible. Ceci montre

qu'une aération convenable est indispensable pour avoir une forte croissance du bacille ainsi qu'une bonne production en principes actifs. En cultures stationnaires, le taux de principe actif commence à diminuer à partir d'une épaisseur de couche liquide atteignant 4 à 5 cm.

Une bonne production a aussi été obtenue dans des flacons d'Erlenmeyer remplis au 1/5 et agités à raison de 60 secousses à la minutes. Par contre, l'aération produite par le barbotage d'air stérile assure une moins bonne production en principes actifs sur *S. aureus*.

b) L'acidité.

Différentes cultures de même composition mais ayant des pH au départ de 5,5 — 6,0 — 6,5 et 7,0 ont donné une production d'antibiotique identique.

Pendant l'incubation, le pH varie continuellement pour atteindre 8 à 9 en fin de culture. Si on ramène chaque jour le pH à la neutralité au moyen d'un acide stérilisé, l'activité obtenue n'est pas supérieure à celle d'une culture habituelle.

c) L'inoculum.

Divers milieux de culture usuels ont été utilisés pour préparer l'inoculum.

Pour autant que l'âge de l'inoculum soit compris entre 2 et 8 jours, la nature du milieu qui a servi à le préparer, que ce soit sur milieu solide ou sur milieu liquide, n'a pas d'influence notable sur l'activité des jus de culture. Celle-ci, exprimée par le diamètre des zones d'inhibition sur *S. aureus*, est toujours voisine de 25 mm.

d) La lumière.

Une culture abandonnée trois jours à la lumière ordinaire perd une partie de son activité sur *S. aureus* alors qu'à l'obscurité, aucune perte n'est enregistrée.

e) Le milieu de culture.

Des essais en milieu synthétique minéral, additionné de glucose, sur la meilleure source d'azote à fournir à la souche 831 pour produire le principe actif sur *S. aureus* ne donnèrent pas de différences bien marquantes. (Rappelons encore une fois qu'à ce moment des recherches, l'activité était testée sur *S. aureus* et qu'il s'agit uniquement de la productivité des fractions O et N. D'autres essais seront décrits plus loin pour la fraction L).

La production est bonne en présence de nitrate de sodium, asparagine, gélatine, peptone ; la culture est faible et inactive en présence de sulfate ammonique. La production la plus élevée a été obtenue en eau peptonée (voir *fig. 4*).

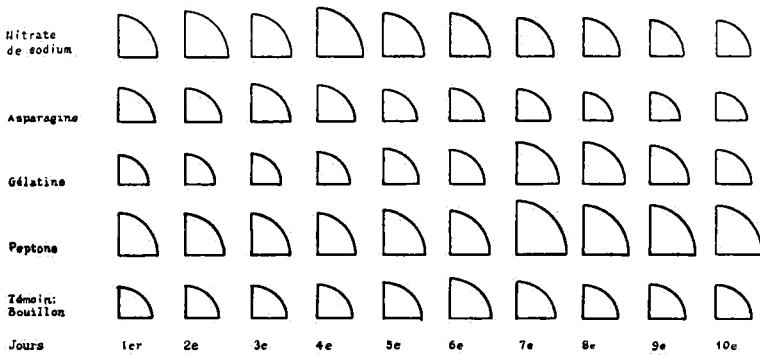


FIG. 4. — Influence de la source d'azote sur la production de la fraction active sur *Staphylococcus* n° 17.

(Un quart de cercle représente le quart d'un disque d'inhibition autour du cylindre de Heatley).

Sur Czapek nitraté ayant la formule suivante : NaNO_3 2 g ; MgSO_4 0,5 g ; KCl 0,5 g ; K_2HPO_4 1,0 g ; FeSO_4 0,02 g ; eau distillée 1000 ml ; additionné de l'un des hydrates de carbone suivants : glucose, lactose, saccharose, glycérol, mannitol et amidon soluble, la production d'antibiotique débute partout avant 24 heures de culture, don-

nant à ce moment des cercles d'inhibition sur *S. aureus* de 20 à 25 mm de diamètre. La production la plus forte est observée pour le glycérol et le glucose (voir fig. 5).

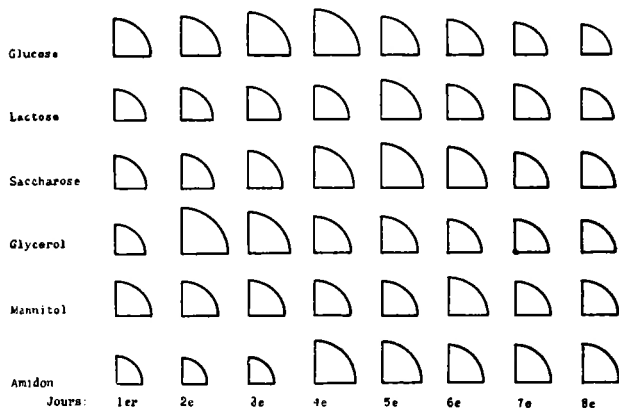


FIG. 5. — Influence de la source de carbone sur la production de la fraction active sur *Staphylococcus* n° 17.

Les différentes modifications du milieu ne se traduisent donc que par de faibles différences de rendement.

D'autres milieux plus complexes conviennent également sans toutefois produire davantage ; ce sont, par exemple : extrait de pommes de terre, extrait de levure, extrait de champignons divers, mélasse, *corn steep*, jus d'asperges.

L'apport de l'un des ions suivants : Mn, Mg, Co, Zn, Fe, Cd, K, Cl, PO_4 n'a pas produit de modification sensible.

3) Propriétés physico-chimiques des fractions O et N.

a) Solubilité.

La fraction O est soluble dans l'alcool, le chloroforme, l'acétone, le benzène mais peu soluble dans l'eau, l'éther de pétrole et l'éther.

La fraction N est soluble dans l'alcool, le chloroforme et l'acétone mais peu soluble dans l'eau, l'éther de pétrole, l'éther et insoluble dans le benzène.

b) Dialyse et ultrafiltration.

Après 4 jours de dialyse contre de l'eau distillée, presque toute l'activité des fractions O et N a disparu de la solution aqueuse dialysée.

D'autre part, une bonne partie de l'activité sur *S. aureus* se retrouve dans le filtrat d'une filtration effectuée sur membrane serrée (utilisée pour arrêter les bactéries).

Ces essais font supposer une petite taille moléculaire pour les principes actifs contenus dans les fractions O et N.

c) Spectre UV et action des UV sur le spectre.

La courbe d'absorption dans l'ultra-violet a été relevée au spectrophotomètre de Beckman pour chacune des trois fractions. La fraction N présente un léger maximum d'absorption vers 2.700Å. La fraction O présente une courbe d'absorption semblable avec un maximum vers 2.600 Å [1].

Ces maxima s'atténuent ou même disparaissent presque complètement après irradiation et inactivation par les rayons ultra-violet. La fraction L présente un maximum plus accentué à 2.780 Å qui subsiste après irradiation (voir plus loin).

d) Stabilité à la lumière, la chaleur, l'aération.

Après illumination par une lumière artificielle intense, ou par la lumière du jour pendant 48 h comprenant plusieurs heures d'exposition au soleil, l'activité sur *S. aureus* d'une solution aqueuse est déjà fortement diminuée. Après 8 jours, toute activité a disparu tandis

qu'un témoin maintenu à l'obscurité a conservé la majeure partie de son activité.

Les solutions résistent bien à une ébullition de 5 minutes, mais un chauffage à 120° pendant 15 minutes provoque une forte démolition de l'activité.

L'inactivation est moins accentuée lorsque le produit est dissout dans un solvant organique (benzène, éthanol, chloroforme, etc.) porté à l'ébullition même pendant 4 à 5 heures.

Le barbotage d'air dans une solution aqueuse produit après plusieurs jours une diminution sensible de l'activité.

Notons encore que même à l'obscurité et à basse température, on observe une diminution lente de l'activité.

e) Recherche de fonctions caractéristiques.

Les réactions classiques d'identification des fonctions suivantes ont été nulles ou très faibles : alcool primaire, secondaire ou tertiaire, aldéhyde, cétone, amine, amide, halogénure, noyau benzénique, sucre, phénol, peroxyde. Par chauffage dans la paraffine, on observe un fort dégagement de CO_2 , ce qui se produit souvent avec les acides organiques.

Les fractions O et N s'oxydent aisément par une solution aqueuse diluée de KMnO_4 froide avec perte de l'activité. Ceci n'indique pas la présence d'une fonction alcool car aucun des produits d'oxydation qui devraient en résulter n'a été décelé. Cette oxydation aisée peut indiquer la présence de liaisons doubles ou triples (d'autres fonctions possibles telles que aldéhyde, alcools, etc. ayant déjà été éliminées par d'autres tests spécifiques). Le test (à l'acétylure) des liaisons triples est négatif.

D'autre part, il y a fixation aisée de brome en solution chloroformique, sans formation importante d'acide brom-

hydrique, ce qui indique également la présence de doubles liaisons. Le produit de la bromuration a été précipité par l'éther et séché ; il est dépourvu d'activité. Après une débromuration avec Zn en solution alcoolique à 80 % à l'ébullition, aucune activité n'a été restituée.

Les fractions O et N fixent également de l'iode, en présence de HgCl_2 , dans le chloroforme. L'indice de saponification pour la fraction O est de 103 et pour la fraction N : 79.

Le test du glycérol est positif et une faible acidité libre a été décelée. On a également décelé un faible pourcentage d'azote et de phosphore. Le poids moléculaire déterminé par la méthode cryoscopique de RAST montre qu'il s'agit de petites molécules d'un poids moléculaire inférieur à 800.

Conclusion : Ces caractères sont ceux de matières lipidiques complexes.

4) Chromatographie des fractions O et N.

a) Recherche des conditions optimales.

Les fractions actives étant dissoutes dans du chloroforme, nous avons d'abord recherché sur de petites colonnes un absorbant convenable. L'amidon absorbe peu mais l'élution est aisée. Le talc absorbe très peu et se colmate aisément. Avec l'alumine, la chromatographie est aisée mais une bonne partie de l'activité reste fixée, semble-t-il. Finalement, nous avons adopté le carbonate de magnésie qui donne une absorption moyenne et une élution aisée.

b) Chromatographie de la fraction O et propriétés des substances isolées.

La substance active est dissoute dans du benzène. La première fraction qui est la plus abondante, traverse

la colonne ; l'addition de chloroforme fait sortir une seconde fraction ; les suivantes sont éluées par addition progressive de méthanol. On obtient de cette façon cinq éluats successifs dont les propriétés sont peu différentes et, contrairement à ce que nous espérions, l'activité antibiotique n'a pas été fortement concentrée dans l'un d'eux. Il s'agit par conséquent d'un mélange complexe de substances lipidiques non saturées à propriétés très voisines.

c) Chromatographie de la fraction N

La fraction N est dissoute dans du chloroforme. La première fraction traverse la colonne sans addition d'éluant. Des additions successives de méthanol font encore sortir trois bandes.

Conclusion.

Ces diverses expériences montrent clairement que les fractions O et N sont des mélanges complexes de substances lipidiques non saturées, actives surtout sur des bactéries gram positif. Or on a signalé, à plusieurs reprises, la présence de lipoïdes bactéricides dans les milieux de culture de diverses bactéries. On connaît également les propriétés bactéricides de certains acides gras et de leurs sels et on sait que les acides non saturés sont les plus actifs [45, 46, 47]. Les fractions O et N, dont l'intérêt thérapeutique semble réduit, ne semblent donc pas spécifiques des cultures du *bacillus* 831. Pour ces raisons, nous réservons à l'avenir la dénomination *Iturine purifiée* à la fraction L seule dont la nature ainsi qu'on le verra plus loin est toute différente.

V. PRÉPARATION DE L'ITURINE PURIFIÉE

1) Méthodes de dosage.

a) Par diffusion.

Cette méthode consiste à laisser diffuser dans une gélose nutritive, inoculée au moyen de germes sensibles, une quantité déterminée de la substance active. Celle-ci diffusant à partir de l'endroit où elle a été déposée, tue les germes sensibles ou inhibe leur croissance sur une surface qui est fonction de la concentration de la substance à doser. Ce sont les détails techniques préconisés par HEATLEY (1944) qui ont contribué au large développement de cette méthode, rapide, assez précise et utilisable pour le titrage de liquides non stériles [4] [5].

La solution active est placée au moyen d'une pipette Pasteur à l'intérieur d'un petit cylindre (en acier inoxydable d'un diamètre intérieur de 6 mm), stérilisé, déposé sur la gélose, inoculée avec un *Penicillium notatum*.

Pour des raisons de commodité, le *P. notatum* est incorporé à la gélose au moment de couler les boîtes de Petri.

Nous avons observé que pour une même concentration en produit actif, le diamètre des zones d'inhibition varie légèrement avec la concentration en germes sensibles.

La *figure 6* montre que le diamètre des zones d'inhibition diminue légèrement lorsque la concentration en *P. notatum* augmente. En tenant compte de ce fait, nous avons défini l'unité arbitraire suivante :

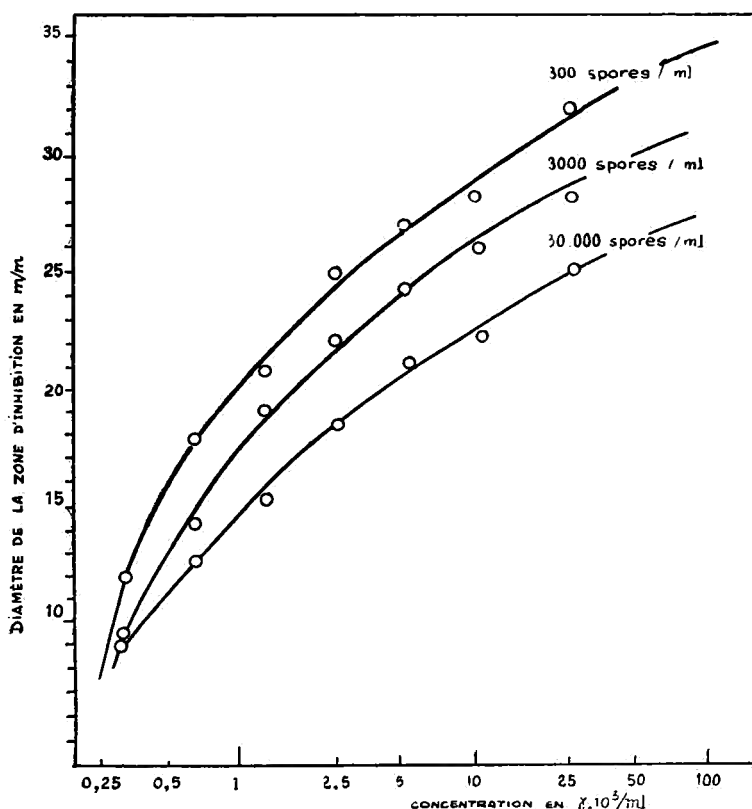


FIG. 6. — Diamètre des zones d'inhibition sur *P. notatum* en fonction de la concentration en iturine et de la concentration en germes sensibles.

Une solution d'iturine contient 100 unités par ml lorsqu'elle produit une zone d'inhibition de 23 mm de diamètre autour d'un cylindre de 8 mm de diamètre extérieur, 6 mm intérieur, 8 mm de haut, sur une gélose contenant 3.000 spores de *Penicillium notatum* par ml.

Le jus qui doit être titré, est d'abord centrifugé une demi-heure à grande vitesse, puis chauffé 20 minutes à 100° C. De cette façon, on obtient généralement une stérilité suffisante pour effectuer les dosages.

b) Par dilutions sériées.

Cette technique consiste à faire des dilutions successives du produit actif stérilisé, dans un milieu de culture liquide stérilisé, adapté au microorganisme témoin. Celui-ci est ensemencé de la même manière dans chaque tube. La croissance du germe réactif ne s'effectue qu'en dessous d'une certaine concentration en produit actif ; cette concentration inhibitrice minimum mesure l'activité du produit étudié. Cette méthode exige un produit stérile.

Le nombre des spores de *P. notatum* introduites dans chaque tube peut varier entre 100 et 10.000 sans qu'il y ait un déplacement sensible du terme du dosage. En pratique, nous inoculons environ 1.000 spores par tube contenant 4,5 ml de solution à doser. L'unité arbitraire choisie ci-dessus a été définie d'une manière telle que les deux méthodes donnent pratiquement un même résultat en unités par ml.

c) Par colorimétrie (Biuret).

Celui-ci est basé sur la réaction du Biuret. La protéine est traitée directement par CuSO_4 en présence de tartrate sodico-potassique alcalin, pour former un complexe rouge-pourpre [6]. Nous avons utilisé le réactif de GORNALL-BARDAWILL et DAVID : on dissout 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pur dans environ 500 cm³ d'eau distillée, on ajoute 6 g de tartrate sodico-potassique. $4\text{H}_2\text{O}$; on ajoute en agitant continuellement 300 ml de NaOH 2,5 N puis encore 1 g de KI. On amène le volume à 1.000 ml. On conserve dans un flacon parfaitement bouché et on renouvelle si un précipité se forme. Pour effectuer le dosage, on ajoute à 2 ml du liquide à doser 8 ml du réactif et on laisse 30 minutes dans un bain d'eau à 25° C. Si un trouble se forme à cause de la pré-

sence de graisses, on extrait à l'éther de pétrole, centrifuge et sépare les deux couches.

La *fig. 7* donne la relation entre la concentration en protéine et les lectures au colorimètre (KLETT SUMMERSON).

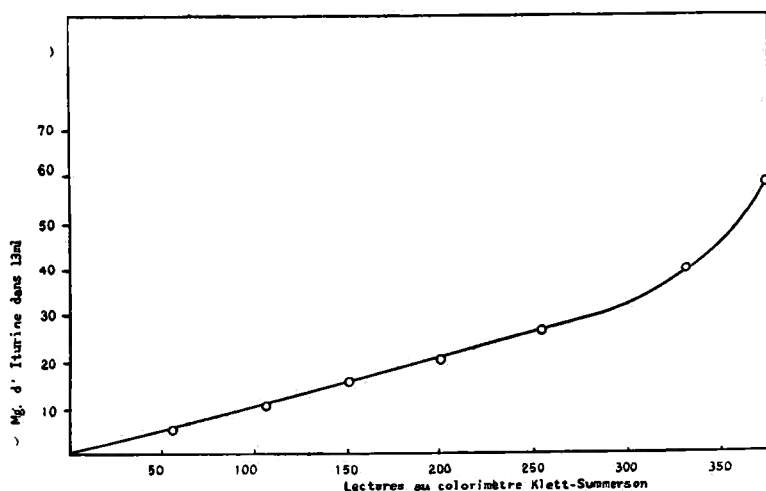


FIG. 7. — Courbe d'absorption de l'Iturine + CuSO_4 à 550 m μ .

d) Par spectrophotométrie.

Le spectre ultra-violet présente un maximum à 2.780 Å (voir plus loin). Nous avons établi la relation entre la concentration en iturine purifiée et la densité optique (voir *fig. 8*) pour la longueur d'onde correspondant au maximum. Cette technique permet le dosage précis et rapide d'échantillons purifiés.

2) Conditions de culture.

a) En Erlenmeyers.

MILIEUX ASSURANTS UNE FORTE CROISSANCE BACTÉRIENNE

Pour obtenir une forte production d'iturine, nous avons observé qu'il fallait d'abord donner au bacille

producteur tous les éléments nécessaires à une croissance abondante, puis rechercher les éléments qui assurent une forte sécrétion d'iturine.

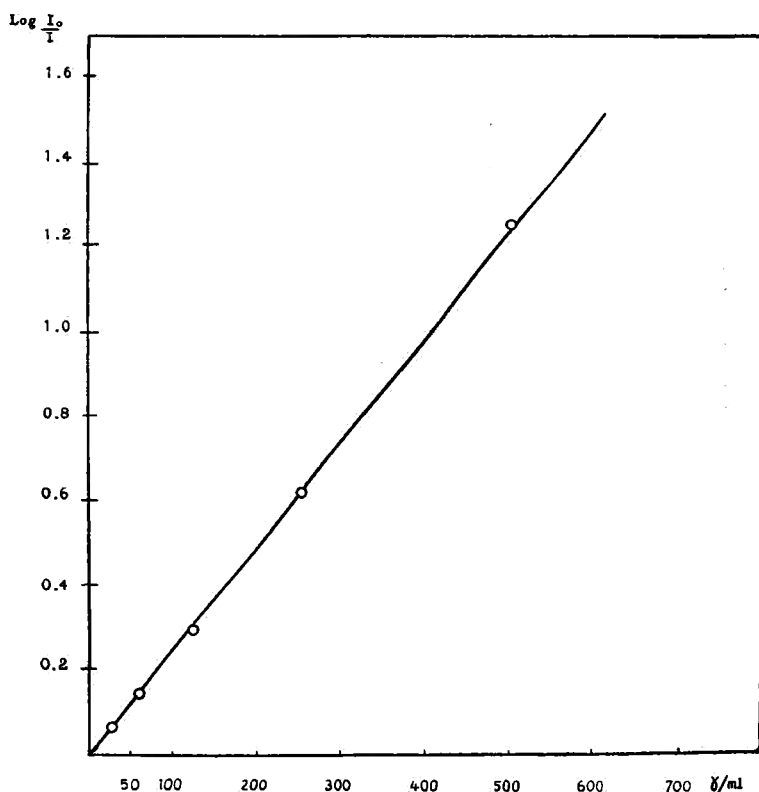


FIG. 8. — Courbe d'absorption à 2780 Å (Spectrophotomètre Unicam).

Lorsqu'on désire seulement préparer un inoculum, il peut être préférable de choisir un milieu qui assure avant tout une croissance rapide et intense, les considérations de production de l'antibiotique ne devenant capitales que dans la culture finale ? Ceci explique l'intérêt qu'il y a à connaître des milieux assurant une forte croissance bactérienne.

De nombreux milieux ont été essayés ; la croissance

microbienne étant évaluée après 3 jours de culture agitée en flacon d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 cm³ de milieu, en prélevant 40 cm³ que l'on centrifuge à grande vitesse. Le culot bactérien est pesé humide et ce poids a été comparé à celui que l'on obtient avec le bouillon ordinaire (peptone 1,5 %, sel 0,02 %, phosphate disodique 0,02 %, jus de viande 0,3 %).

Nous avons enregistré :

a) Une croissance inférieure à celle obtenue avec le bouillon ordinaire et un poids de corps microbiens inférieur à 100 mg (pour 40 cm³ de culture) avec du milieu de Czapek contenant l'une des additions suivantes : hydrolysate acide de caséine, bovalbumine, bière, glycérine, sucre ordinaire, glucose, pomme de terre, huile de foie de morue, extraits de champignons, acides ribonucléiques ;

b) Un poids d'environ 200 mg avec le milieu de Czapek additionné d'huile d'arachide ou d'un hydrolysate acide de bacilles 831 ;

c) Un poids d'environ 300 mg avec le bouillon ordinaire, la mélasse, extrait de betteraves, miel, hydrolysate enzymatique de caséine (en présence de sels) ;

d) Un poids supérieur à 400 mg avec le sucre candi brut, la cassonade, la mélasse de pommes (en présence de sels).

Ces essais montrent que le maximum de croissance est obtenu en utilisant des sucres impurs dans le milieu de culture.

MILIEUX ASSURANT UNE BONNE PRODUCTION D'ITURINE.

De nombreux milieux conviennent pour la production d'iturine en flacons d'Erlenmeyer agités ; en voici quelques-uns classés par efficacité décroissante — l'acti-

tivité étant indiquée par le diamètre de la zone d'inhibition sur *P. notatum*, après 4 jours de culture à 25° et 60 secousses par minute.

TABLEAU I. — *Influence du milieu de culture sur l'activité.*

	activité en mm
Bouillon ordinaire + 2 % de cassonade	18
Cassonade 2 % + peptone 1,5 % + phosphate disodique 0,02 % + sel 0,02 %	18
Czapek + sucre interverti 1 % + hydrolysât caséine 0,5 %	17
Czapek + corn-steep 1 % + sucre brun 2 %	16
Peptone 1,5 % + phosphate disodique 0,02 % + sel 0,02 % ..	16
Czapek + mélasse neutralisée 2 %	16
Czapek + sucre interverti 1 % + corn-steep 1 %	15
Czapek + glucose technique 1 % + corn-steep 1 %	14
Czapek + corn-steep 2 %	14
Czapek + mélasse de pommes 2 %	14
Czapek + hydrolysât de caséine 0,5 % + cassonade 2 %	13
Czapek + acide glutamique + citrate de sodium + glucose 1 %	12
Czapek + farine de son 2 %	12
Czapek + phosphate diammonique 1 % + sucre brun 2 %	12
Czapek + farine de poisson 2 %	12
Czapek + extrait de pommes de terre	11
Czapek + farine de coton ou de maïs 2 %	10
Czapek + sucre interverti 1 % + caséine 2 %	10
Czapek + extrait de champignons + cassonade 2 %	9

D'autres milieux n'ont donné que des teneurs négligeables en iturine. De ces essais, il ressort que la meilleure source d'azote semble jusqu'à présent être la peptone de viande. La production est considérablement augmentée en présence de sucres bruts impurs tels que cassonades et mélasses diverses. Les sucres blancs purs produisent moins et certains d'entre eux donnent des jus de culture très visqueux et plus difficiles à traiter (saccharose et lactose, par exemple).

Le *B. subtilis* 831 ne semble pas avoir d'exigences particulières en certains éléments minéraux pour pro-

duire l'iturine. D'ailleurs, les sources d'azote et de carbone généralement utilisées contiennent suffisamment d'impuretés pour fournir au microorganisme les éléments minéraux indispensables ainsi que certains facteurs actifs sous forme de traces. Notons cependant qu'avec certains milieux particuliers tels que la mélasse, la présence d'un peu de manganèse s'est révélée utile.

INOCULUM.

On peut utiliser une culture agitée de 24 ou 48 h, l'activité obtenue dans la culture après 4 jours d'incubation est la même pour des quantités d'inoculum introduites comprises entre 0,1 ml et 10 ml pour 200 ml de milieu.

On peut également préparer des suspensions de spores que l'on conserve en glacière. Pour cela, des boîtes de Roux contenant de la gélose nutritive sont inoculées et incubées 5 à 6 jours à 37°. Les spores blanches qui couvrent la surface de la gélose sont raclées aseptiquement en présence d'une solution saline à 1 % et disposées dans des tubes que l'on scelle et conserve en glacière.

La quantité de spores introduite, a peu d'influence sur l'activité finale de la culture pourvu qu'elle soit comprise entre $2,10^9$ et $2,10^{11}$ spores par flacon d'Erlenmeyer (de 1 l avec 200 ml de milieu) inoculé.

TYPES DE COLONIE.

Lorsqu'on effectue un étalement suffisamment dilué d'une culture du bacille 831 sur un milieu solide, on obtient généralement deux types de colonies : les unes sont grandes et blanches, les autres plus petites, grises et prennent parfois un aspect gras.

Les grandes colonies blanches examinées au mi-

croscopie se révèlent constituées de bacilles accompagnés de nombreuses spores. Ensemencées en milieu liquide immobile, un voile blanc sec apparaît rapidement.

Les petites colonies grises examinées au microscope se révèlent constituées de bacilles accompagnés de très peu de spores ainsi que de débris qui semblent responsables de l'aspect gras de certaines colonies.

Ensemencées en milieu liquide immobile, un voile plus ou moins abondant n'apparaît que tardivement. L'aspect différent des 2 genres de colonies semble donc lié à la présence plus ou moins abondante de spores et de débris bactériens.

TABLEAU 2. — *Production d'iturine et croissance microbienne en fonction du temps dans une fermentation en cuve de 10 litres.*

Temps	Φ de la zone d'inhibition en mm sur			Poids humide des bactéries en mg/ml.
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichosporum gigantum</i>	
0	—	—	—	—
19 h	11	20	—	14,4
26 h	13	23	8	14
50 h	10	15	6	13,6
57 h	9	13	—	8,8

Ce qui est important pour nous c'est que les grandes colonies blanches ont une productivité en antibiotique plus élevée que les autres.

Une irradiation par les rayons ultra-violets, suivie de l'isolement de mutants éventuels, n'améliore pas la productivité des petites colonies ; par contre, une légère amélioration a été obtenue avec les grandes colonies blanches.

Une étude systématique devrait cependant être faite à ce sujet.

b) En cuves de 10 l (système Vortex).

Description de la cuve. Ces cuves font partie d'une usine-pilote italienne pour l'étude des antibiotiques, où l'un de nous a effectué un séjour d'étude au cours duquel la mise au point de la préparation de l'iturine par fermentation submergée a été commencée.

Il s'agit d'un récipient cylindrique en acier inoxydable soudé pourvu d'un couvercle en acier inoxydable également, fixé par boulons ; l'étanchéité étant assurée par un joint souple. Le couvercle comporte : au centre, un double roulement à billes muni d'un bourrage en asbeste graphitée ; autour de celui-ci : un orifice d'inoculation et deux orifices d'introduction de réactifs. Une bougie d'auto, fixée dans le couvercle, et dont l'électrode centrale prolongée est reliée à une sonnerie par l'intermédiaire d'un relais, permet de se rendre compte de l'apparition de mousse. Le chauffage ou le refroidissement est assuré par un bain d'eau thermostatisé à circulation continue.

La stérilisation s'effectue dans un autoclave séparé, les vannes d'entrée et de sortie d'air étant ouvertes. Les bouchons obstruant les orifices d'ensemencement et d'introduction de réactif ne sont pas vissés à fond de manière à laisser un passage pour la vapeur. Au sortir de l'autoclave, ces bouchons sont fermés et on établit aussitôt une pression d'air à l'intérieur de la cuve pour éviter toute contamination.

Un dispositif particulier de prise d'essai réduit au minimum la quantité de jus de culture prélevé et permet au volume de la culture de rester pratiquement constant pendant toute l'expérience [7].

Le système d'aération utilisé avec cette petite cuve était le système « vortex » consistant en une agitation rapide (700 tr/min) par une turbine (8 pales d'un diamètre de 70 mm) créant un tourbillon ; l'air étant amené

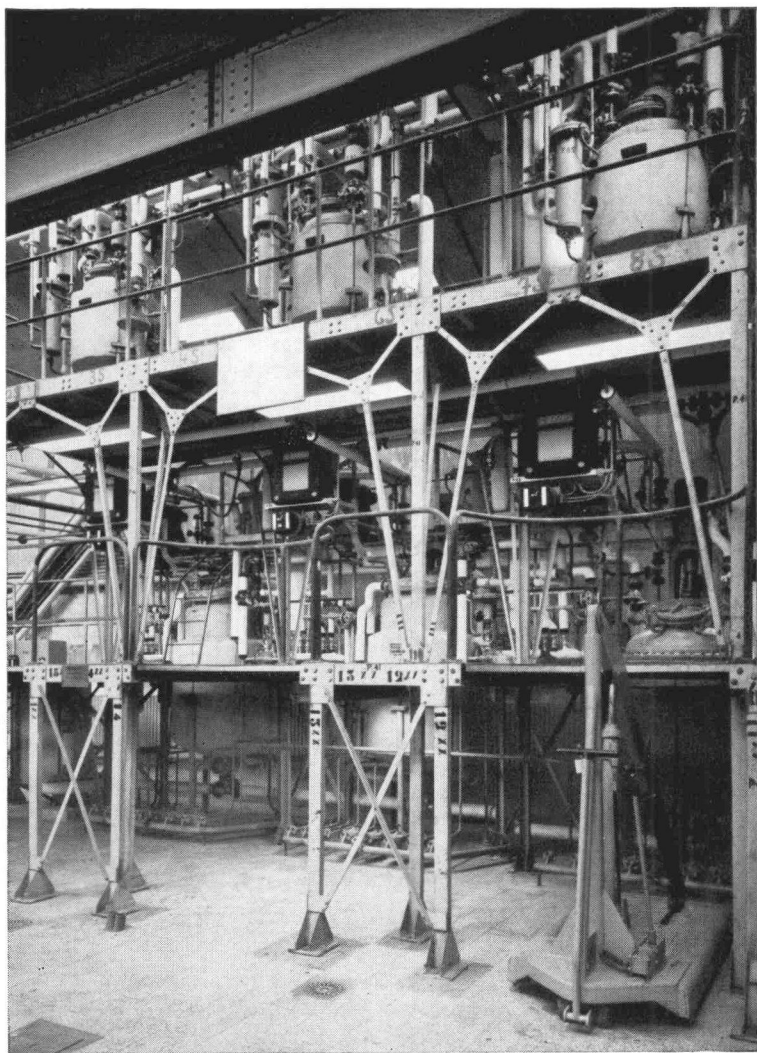


FIG. 10. — Vue d'ensemble des cuves de fermentation de 225 et 675 litres.
(C.R.P.A. Liège). (Photo Jacoby-Liège).

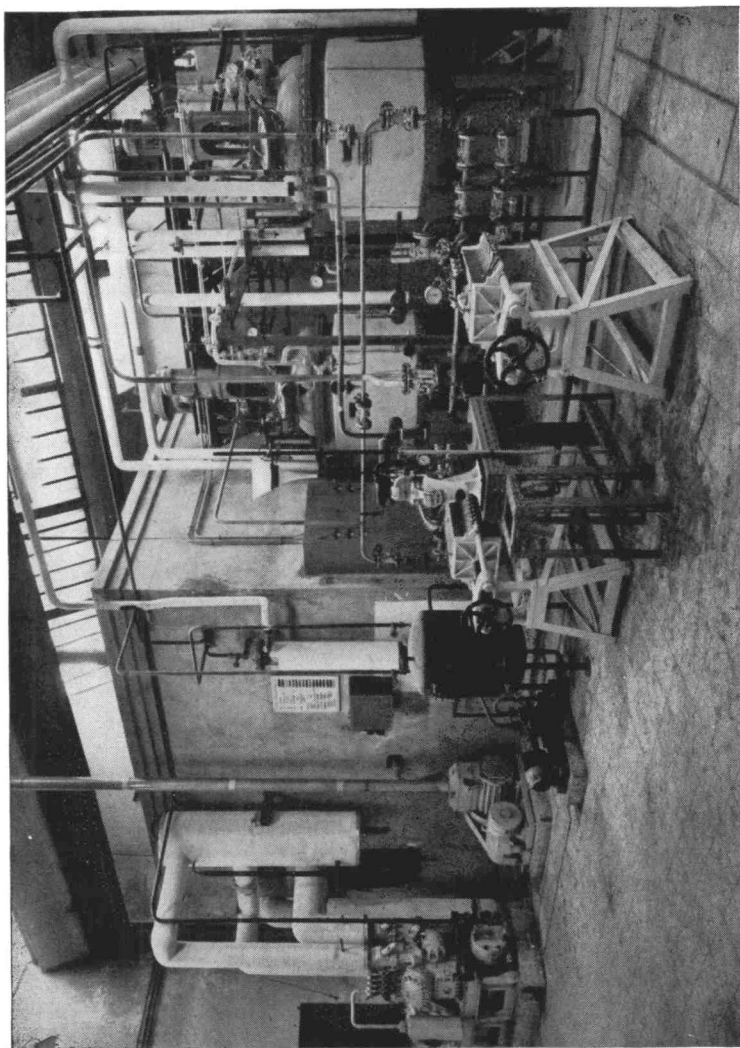


FIG. 11. — Section filtration. À l'avant-plan, entre les deux filtres-presse :
une centrifugeuse *Sharpless* petit modèle ; à l'arrière-plan : cuves de stockage.
(C.R.P.A. Liège).
(*Photo Jacoby-Liège*).

au-dessus du niveau de la culture. La pression à l'intérieur de la cuve a été maintenue constamment à $0,7 \text{ kg/cm}^2$.

La cuve qui contient 5 l de milieu stérilisé est inoculée avec 200 cm^3 d'une culture de 12 l de la souche 831. Les prélèvements pour la détermination de l'activité et de la croissance bactérienne ont été effectués au départ et après 19, 26, 50 et 57 h. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2.

Cette expérience montre qu'avec le système d'aération dit « vortex » et dans les conditions décrites ci-dessous, la production d'Iturine est rapide puisque le maximum est atteint après environ 24 h de culture

c) En cuves de 225 et 675 l.

DESCRIPTION DE L'INSTALLATION.

Ces cuves font partie d'une usine-pilote belge dont nous ne décrirons, dans les grandes lignes, que les parties intéressant la fabrication de l'iturine.

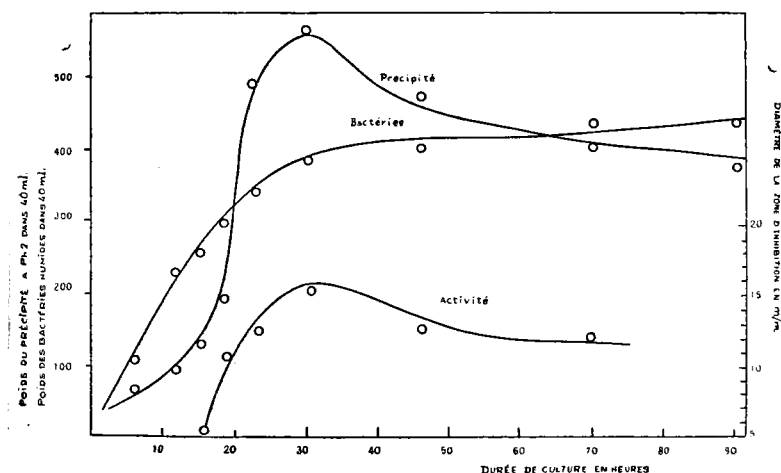


FIG. 9. — Courbe de production en cuve de 225 l avec une aération de 3 vol. d'air/min.

La vapeur nécessaire à la stérilisation du milieu, au maintien de la stérilité des vannes et à la thermostatisation des cultures est produite dans une chaudière automatique équipée d'un brûleur au mazout. Le débit horaire de vapeur peut atteindre 800 kg de vapeur sous une pression de 9 kg/cm². La vapeur détendue à une pression de 2,5 kg est envoyée dans les diverses tuyauteries de l'usine [8].

L'aération des cultures exigeant des volumes importants d'air stérile, l'installation comporte deux compresseurs. L'un est un compresseur rotatif à palettes à basse pression (3,5 kg/cm²) et débit relativement élevé (3.000 l/minute), fonctionnant de manière discontinue mais automatique pour assurer le remplissage d'un réservoir de stockage. C'est à partir de celui-ci que les cuves de culture sont normalement alimentées après réduction de la pression à 1,8 kg/cm² au moyen d'un détendeur approprié. Le second est un compresseur à pistons à 2 étages (7 kg/cm² — 1400 l/min.), également muni d'un réservoir de stockage et utilisé principalement pour actionner la turbine d'une centrifugeuse Sharpless.

On dispose également d'une machine frigorifique à pistons, de modèle courant, capable de produire 30.000 frigories/heure à 4° C. La saumure, refroidie par détente de fréon 12 dans un évaporateur multitubulaire, peut circuler, lorsqu'on le désire, autour des cuves de culture, des réservoirs de stockage, des colonnes d'extraction et de chromatographie ainsi que des condenseurs des appareils à distiller.

La préparation du milieu de culture est effectuée, souvent à l'état concentré, dans une cuve en acier inoxydable pourvue d'un agitateur rotatif et alimentée au choix en eau de ville, en eau adoucie ou en eau distillée. Le milieu peut être envoyé dans l'une quelconque des cuves de culture par des tuyauteries en acier inoxydable avec jeu de vannes, grâce à une pompe centrifuge en

fonte inoxydable. Une quantité suffisante d'eau est ensuite introduite, par le même procédé, pour compléter au volume désiré.

Les cuves de culture de 225 l (capacité utile 50 à 150 l) et celles de 675 l (capacité utile 300 à 500 l) sont construites suivant le même schéma [9] (fig. 10).

Les cuves constituent essentiellement des autoclaves, permettant la stérilisation du milieu nutritif et pourvus d'accessoires nécessaires à l'inoculation, l'aération, l'agitation, le maintien de la température correcte ainsi que de la stérilité du milieu. Construites en acier inoxydable 18/8 soudé, de 7 mm d'épaisseur, elles sont entourées d'une double enveloppe calorifugée dans laquelle on fait circuler de la vapeur à 1,5 kg pendant la stérilisation, de l'eau à température automatiquement réglée pendant la croissance et enfin de l'eau à 4° si on veut bloquer la multiplication du microorganisme. Un « trou d'homme » permet un nettoyage aisé de l'intérieur et deux « regards » en verre épais permettent d'observer et d'éclairer la culture durant toutes les opérations. Un agitateur rotatif excentré à double rangée de pales, assure un brassage constant du milieu (vitesse de rotation : 60 tr/min).

STÉRILISATION.

Le milieu est stérilisé 1/2 heure à 120° C ; puis on refroidit la cuve en introduisant de l'eau froide dans la double enveloppe. L'air stérile est introduit lorsque la pression à l'intérieur de la cuve est tombée à 0,25 kg environ de manière à garder constamment une pression positive dans la cuve.

AÉRATION.

L'air provenant des compresseurs, après déshuilage et détente partielle à 1,8 kg est filtré sur laine de verre

contenue dans un réservoir en acier inoxydable. Ce filtre a été au préalable stérilisé à la vapeur pendant 1/2 heure puis séché par circulation de vapeur dans sa double enveloppe calorifugée. L'air est introduit dans le milieu de culture, au bas de la cuve, au moyen d'un anneau perforé de petits trous (*sparger*). La sortie de l'air s'effectue par un tube recourbé, pourvu d'un dispositif de chauffage destiné à éviter les contaminations et relié à un rotamètre, indiquant à tout moment la quantité d'air qui traverse la culture.

Un avertisseur de moussage, constitué par une bougie d'auto dont l'électrode centrale a été prolongée est relié à un relais qui actionne une sonnerie lorsque la mousse atteint un niveau dangereux. Celle-ci est alors ramenée à un niveau acceptable par une addition aseptique d'un agent antimousse stérile. Celui-ci est renfermé dans un réservoir particulier séparément stérilisable par la vapeur. Ce dispositif peut également être utilisé pour l'introduction aseptique éventuelle de réactifs divers au cours de la croissance bactérienne. Il en est de même d'un second réservoir accessoire, séparément stérilisable et prévu surtout pour l'introduction aseptique de solutions d'hydrates de carbone en cours de fermentation.

INOCULUM ET INOCULATION.

Un échantillon de la souche 831, conservé en glace sur gélose inclinée, sert à inoculer une dizaine de flacons d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml de milieu stérilisé. Après 24 h de culture agitée, on transvase aseptiquement au travers d'une large flamme de gaz, le contenu des 10 flacons d'Erlenmeyer dans une bouteille d'inoculation spéciale [9] qui a été au préalable stérilisée. Cette opération s'effectue dans une chambre d'inoculation dont l'atmosphère est dépoussiérée par filtration sur feutre, et a subi, pendant une heure au

minimum, une irradiation ultra-violette intense. Le transvasement terminé, la bouteille est bouchée avec un tampon de coton d'abord, puis avec un capuchon métallique à visser qui assure une étanchéité convenable pour exercer au-dessus du liquide la pression d'air nécessaire pour envoyer l'inoculum dans la cuve. Un petit filtre à air, rempli de coton, empêche toute contamination par l'air comprimé.

La température de la cuve étant stabilisée à 30° C, par exemple (cette température sera maintenue pendant toute la fermentation), on laisse tomber la pression dans la cuve à 0,1 kg environ, puis on introduit la semence dans la cuve au travers d'une flamme de gaz, par l'orifice ad hoc, la sortie de la bouteille d'inoculation ayant été débarrassée de son tube protecteur et le filtre à air F étant relié à une source d'air comprimé (0,2 kg/cm²).

Immédiatement après, les vannes sont refermées remises sous vapeur et la pression d'air rétablie dans la cuve (1,5 kg/cm²).

MAINTIEN DE LA TEMPÉRATURE ET PRÉVENTION DES CONTAMINATIONS.

Le maintien de la température est assuré par passage continu dans la double enveloppe d'eau thermostatisée à cette température. Un dispositif de prise d'essai, situé au bas de la cuve, permet d'effectuer à tout moment des prélèvements stériles de la culture en développement. Ceci est réalisé par l'utilisation sur la ligne de sortie du milieu, de deux robinets successifs. L'espace compris entre ces deux robinets étant continuellement sous vapeur, sauf, bien entendu, au moment des prélèvements. De cette manière, toute contamination interpestive venant de l'extérieur est rendue impossible. Le même système existe du reste pour toutes les vannes

qui sont en communication directe avec l'intérieur de la cuve. Une pression de vapeur convenable est maintenue sur ces vannes au moyen de purgeurs thermostatiques qui n'éliminent que la vapeur condensée.

SÉPARATION DES BACTÉRIES DU MILIEU DE CULTURE.

Cette opération peut être réalisée soit par filtration avec addition de *filter aid* à un pH convenable ou par centrifugation. On dispose de deux filtres-presses en acier inoxydable (surface totale : 1 m² chacun), reliés aux cuves par une canalisation d'acier inoxydable, l'ensemble pouvant être stérilisé à la vapeur. La filtration est réalisée soit en exerçant une pression d'air convenable sur le liquide à filtrer se trouvant encore dans les cuves de culture, soit au moyen d'une pompe centrifuge en fonte inoxydable (pression maximum 4 kg/cm²). Deux regards en verre, placés respectivement à l'entrée et à la sortie du filtre, permettent de vérifier l'efficacité de l'opération. Le filtrat est amené dans une cuve de stockage dont l'intérieur est recouvert d'émail vitrifié (fig. 11).

La centrifugation est réalisée au moyen de centrifugeuses Sharples à grande vitesse de rotation, dont les bols aisément démontables permettent un passage continu du liquide à traiter et une récupération aisée des bactéries sédimentées.

INFLUENCE DE L'AÉRATION.

La *figure 9* représente la marche d'une culture réalisée avec une aération de 3 volumes d'air/minute/volume de culture. On a remarqué que la croissance est d'autant plus intense que l'aération est plus forte. D'autre part, l'activité apparaît plus vite et atteint un taux plus élevé dans une culture fortement aérée. Il

y aura donc intérêt à aérer le plus fort possible dans les limites permises par le moussage qui à certains moments est assez gênant. L'antimousse que nous avons utilisé est une émulsion aqueuse d'huile de silicone (*Down Corning*).

3) Procédés de fabrication et purification.

a) Principes utilisés.

L'Iturine peut s'extraire du milieu de culture par une précipitation, en présence ou non des corps microbiens, par addition d'acides ou de sels. Le précipité formé peut être récolté soit au moyen d'un solvant approprié, non miscible à l'eau, soit par filtration ou centrifugation. Dans le cas où on sépare le précipité du jus de culture, on peut en extraire l'iturine par addition lente et progressive de soude diluée ou par extraction au moyen d'un alcool de faible poids moléculaire tel que : méthanol, éthanol, propanol, butanol.

Les solutions obtenues sont concentrées par distillation puis précipitées au moyen d'acétone ou d'éther. Le produit obtenu est ensuite séché sous vide. Dans le cas de l'extraction par un solvant organique de la culture précipitée, on utilise généralement le butanol que l'on concentre par distillation. On peut éventuellement faire repasser l'iturine en phase aqueuse par addition de benzène. D'une manière générale, le passage de l'iturine d'une solution aqueuse dans un solvant organique non miscible est fortement favorisé par acidification ou addition de sels. Le passage inverse peut se faire en ajoutant à la solution d'iturine dans un solvant organique, en présence d'eau, plusieurs volumes d'un solvant dans lequel l'iturine est insoluble tel que éther de pétrole, benzène, etc...

Le cycle des opérations peut être répété plusieurs fois.

L'iturine peut encore s'extraire du milieu de culture par absorption sur charbon actif mais le rendement de l'élution est faible.

D'autres détails pratiques ressortiront davantage de la description donnée ci-après, d'exemples particuliers de méthode de fabrication.

Divers essais d'extraction des corps microbiens par de l'alcool éthylique n'ont donné aucun résultat.

b) Procédés particuliers.

PREMIER PROCÉDÉ.

Le milieu utilisé contenait 5 % de mélasse alimentaire neutre et 1 % de phosphate diammonique dans de l'eau de ville. On utilise une cuve de 225 l décrite ci-dessus. Après 48 h de culture au cours de laquelle on a dû faire de nombreuses ajoutés d'antimousse, on ajoute 1 % de *filter aid* et on porte le pH à 3,5. On filtre sur filtre presse (fig. 10 et 11) et le *cake* obtenu est extrait à deux reprises par de l'éthanol. La solution alcoolique brune est distillée sous vide à basse température en présence de benzène ajouté en quantité suffisante pour éliminer complètement l'eau et la plus grande partie de l'alcool. On précipite alors par addition de 10 volumes d'un mélange acétone-éther qui dissout certaines impuretés mais dans lequel l'iturine est peu soluble. On obtient de la sorte, après filtration et séchage, 19 g d'une poudre grise titrant 16 u/mg.

DEUXIÈME PROCÉDÉ.

On utilise le milieu de culture suivant : cassonade 1 %, hydrolysate enzymatique de caséine 1 %, phosphate bipotassique 0,02 %, chlorure sodique 0,02 %.

Après 48 h de culture à 30°, avec une aération de

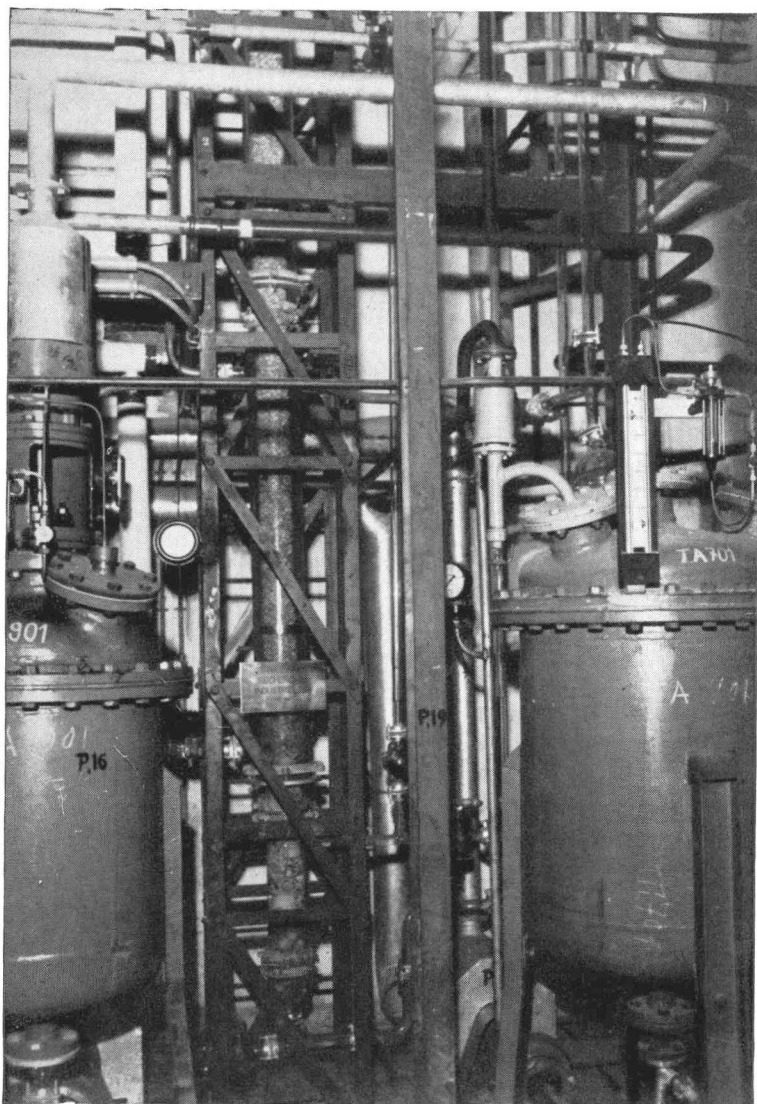


FIG. 12. — Colonne d'extraction à contre-courant : vue de face de la partie inférieure avec deux cuves de récolte. (C.R.P.A.-Liège).

(Cliché « La Meuse », Liège).

100 l/min, les 100 l de culture sont centrifugés pour écarter les bactéries. On acidifie le milieu clarifié à pH 3,5 et on effectue une extraction à contre-courant par du butanol n dans une colonne en verre de 5 m de hauteur, d'un diamètre intérieur de 10 cm, remplie d'anneaux Raschig qui augmentent la surface de contact (voir *fig. 12*). La solution brune d'Iturine dans le butanol est distillée jusqu'à élimination de l'eau puis précipitée par addition de 15 volumes d'un mélange acétone-éther. Le précipité est centrifugé puis séché sous vide. On obtient 20 g d'une poudre grise titrant 22 u/mg.

TROISIÈME PROCÉDÉ.

On prépare le milieu en dissolvant dans de l'eau brute : 1 % de glucose brut, 1 % de peptone de viande, 0,02 % de K_2HPO_4 et 0,02 % de NaCl.

Après 24 h. de croissance à 30°, les 100 l de culture sont transvasés aseptiquement dans une cuve de 675 l contenant 400 l de milieu frais stérilisé où la culture se poursuit pendant 48 h. Les corps microbiens sont alors éliminés par centrifugation et le liquide clair résultant est précipité par addition d'acide chlorhydrique jusque pH 3,0. Le précipité qui se forme est centrifugé. On le redissout par de la soude diluée jusque pH 7,0, on obtient 3 l d'une solution visqueuse qui est saturée de sel et extraite quatre fois avec du butanol n saturé d'eau. Les extraits butanoliques sont réunis et distillés jusqu'à élimination de l'eau. Le résidu est versé dans 5 l d'un mélange acétone-éther. Le précipité résultant est centrifugé et séché sous vide on obtient 60 g d'une poudre jaunâtre titrant 210 u/mg.

QUATRIÈME PROCÉDÉ.

Le milieu suivant a été utilisé pour l'inoculum préparé en flacons d'Erlenmeyer ainsi que pour les deux cultures

successives effectuées dans 100 l et 500 l de milieu : cassonade 1 %, peptone de viande 1 %, K_2HPO_4 0,02 %, NaCl 0,02 %.

Les cultures sont effectuées à 35° C avec une aération de 200 l par minute. Après 24 h de culture dans la petite cuve de 225 l (100 l de milieu), on effectue un transfert aseptique dans la cuve de 675 l (500 l de milieu). L'agitation est réalisée au moyen d'agitateurs inclinés, à 2 séries de pales tournant dans la petite cuve à 60 tr/min et dans la grande cuve à 120 tr/min. De fréquentes additions d'une émulsion de silicone stérilisée sont nécessaires pour éliminer la mousse qui se produit. Après 48 h de culture, on acidifie à pH 3,5 et on ajoute 5 kg de *filter aid*. On filtre le tout sur filtre presse garni de toiles de laine. On sèche légèrement le *cake* à l'air comprimé, on le détache et on l'extrait à trois reprises par agitation suivie de filtration avec du butanol n.

Les filtrats butanoliques sont réunis, neutralisés avec du $CaCO_3$ en poudre, filtrés et distillés sous vide jusqu'à consistance sirupeuse de façon à éliminer toute l'eau. On ajoute alors 10 volumes d'un mélange à parties égales d'acétone et d'éther éthylique. Le précipité qui se forme est centrifugé et séché sous vide à 50° C. On obtient ainsi 151 g d'une poudre jaune-grise titrant 250 u/mg.

On pourrait imaginer d'autres procédés de fabrication basés sur les principes vus ci-dessus et il est vraisemblable que des modifications seront apportées lors de la mise au point industrielle de la méthode de fabrication la plus économique.

c) Purification.

1) PAR ADSORPTION.

L'Iturine obtenue par l'un des procédés décrits ci-dessus, se présente sous l'aspect d'une poudre jau-

nâtre. Il est possible de la décolorer par adsorption des impuretés au moyen de diverses substances telles que alumine, silicagel, charbon actif etc., au prix cependant d'une perte plus ou moins grande en produit actif. A ce point de vue, il y a intérêt à obtenir des jus de culture le moins chargés possible en substances colorées, c'est pourquoi nous n'utilisons plus les jus de viande ainsi que la mélasse dans la formule des milieux.

L'adsorbant qui semble donner les meilleurs résultats, est le charbon actif du type de la « norit A ». La quantité d'adsorbant à ajouter pour obtenir une décoloration convenable (comprise entre 2 et 10 %) dépend de la composition du milieu de culture. Le solvant utilisé pour effectuer la décoloration a une grande importance. C'est ainsi que l'efficacité est faible dans l'eau, moyenne dans l'alcool et la meilleure dans le butanol n.

Avec ce solvant, il est possible d'obtenir l'iturine sous forme d'une poudre blanchâtre.

2) SUR RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS.

Une solution aqueuse d'iturine traverse avec légère perte d'activité des colonnes de résines échangeuses d'anions telles que amberlites IRA 400, IR₄B; par contre, elle précipite en présence des résines échangeuses de cations telles que IR 120 H, IRC 50 (forme acide), XE₆₄ par suite de l'acidité trop élevée. Elle précipite également avec les résines Monobed MB₃ et MB₁.

Avec la résine XE₆₄ partiellement neutralisée de manière à réaliser un pH moins acide que 5, il n'y a plus de précipitation.

A pH 5, il y a fixation réversible sur la résine à condition d'avoir une vitesse de passage suffisamment lente. L'élution s'opère en sortant la résine de la colonne et en la neutralisant progressivement. De cette façon, on retrouve toute l'activité et le produit est moins coloré

qu'au départ. En agissant sur le pH et la force ionique, nous essayons en ce moment de réaliser une véritable chromatographie. Les vitesses de passage doivent cependant être extrêmement lentes, et les quantités mises en œuvre très faibles, car l'iturine, qui a un poids moléculaire élevé, ainsi qu'on le verra plus loin, pénètre difficilement à l'intérieur de la structure poreuse de la résine, la fixation ne s'opérant qu'en surface ce qui diminue considérablement la capacité d'adsorption de la résine. Une chromatographie de ce genre nécessite un collecteur automatique de fractions [10]. On dose la quantité d'iturine contenue dans chacune d'elle par spectrophotométrie.

VI. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE L'ITURINE

1) Caractères de solubilité.

L'iturine purifiée est aisément soluble dans l'eau, les alcools inférieurs (tels que méthanol, éthanol, propanol, butanol etc...) ainsi que dans la pyridine. Elle est très peu ou pas soluble dans l'acétone sec, l'éther de pétrole, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le trichloréthylène, le benzène, l'acétate d'amyle, l'éther, le sulfure de carbone et le dioxane.

On effectue souvent une précipitation de l'iturine en solution par l'acétone ou l'éther. Celle-ci est aisée lorsqu'il s'agit de solutions dans la pyridine et le butanol ; plus lente pour les solutions dans l'éthanol, méthanol ou propanol et n'a lieu que pour de fortes concentrations en solution aqueuse.

La précipitation à l'acétone s'effectue mieux à pH neutre ou légèrement alcalin ; elle est plus complète par addition d'éther.

L'iturine peut s'extraire d'une solution aqueuse par un alcool peu soluble dans l'eau tel que : alcool butylique, amylique, benzylique, méthyl-isobutyl-carbinol et cyclohexanol, le passage dans la phase organique étant favorisé par addition d'acide ou de sel.

Le passage inverse de l'iturine, en solution dans un de ces solvants, dans l'eau peut s'effectuer en ajoutant plusieurs volumes d'un solvant dans lequel l'iturine est insoluble. Le meilleur rendement a été obtenu avec l'éther de pétrole et le benzène.

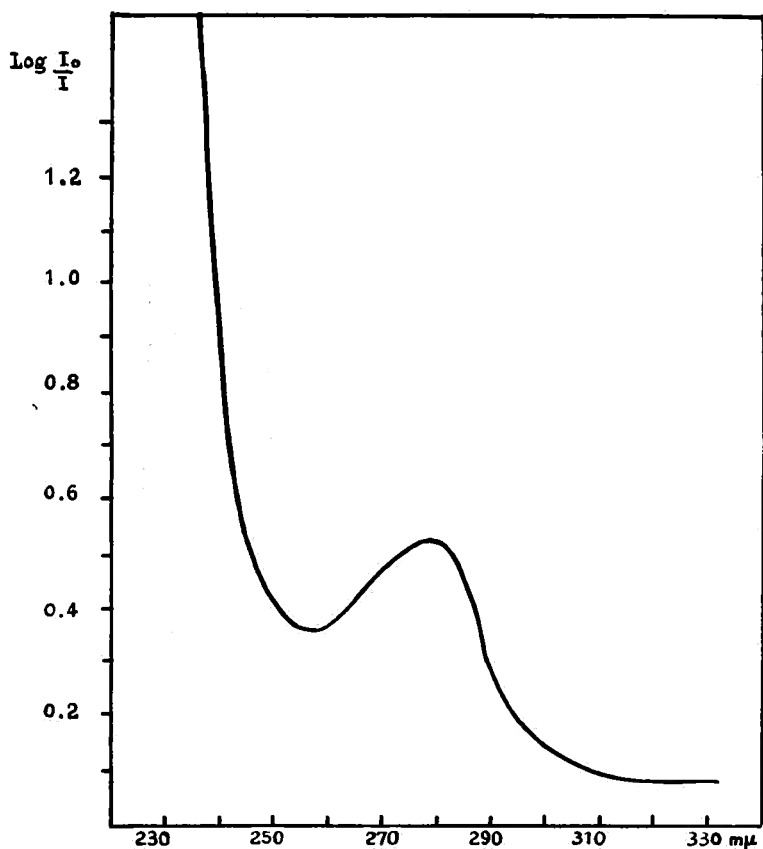


FIG. 13. — Spectre ultra-violet.

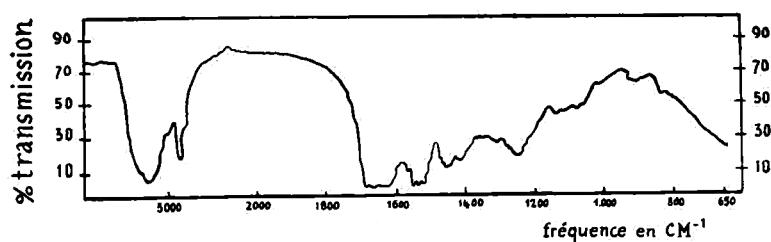


FIG. 14. — Spectre infra-rouge de l'iturine.
En abscisses : les fréquences en cm^{-1} .
En ordonnées : le pourcentage de transmission.

2) Pouvoir rotatoire.

L'iturine présente en solution aqueuse une déviation lévogyre.

$$[\alpha]_D^{20} = - 34^{\circ}9.$$

3) Spectre ultra-violet.

Le spectre effectué dans l'eau pure ou dans l'alcool éthylique avec une concentration de 200 γ /ml présente un maximum à 2780 Å (voir *fig. 13*) et un minimum à 2.570 Å. C'est le genre de spectre ultra-violet que l'on observe fréquemment avec les protéines. L'iturine contient notamment de la tyrosine (voir dosage des acides aminés) qui absorbe fortement à 2680-2760 et 2.820 Å.

4) Spectre infra-rouge.

L'iturine en poudre fine a été mélangée intimement à du bromure de potassium en poudre. Le mélange est alors comprimé pour réaliser une pastille qui est soumise au rayonnement infra-rouge. L'appareil, un spectrophotomètre Perkin-Elmer, trace automatiquement le spectre sur un diagramme qui indique en abscisses les fréquences en cm^{-1} et en ordonnées le pourcentage de transmission (voir *fig. 14*).

Une protéine comme l'iturine renferme de nombreux groupements pouvant provoquer une absorption, de sorte que des interactions nombreuses peuvent déplacer les bandes d'absorption caractéristiques. Notons cependant des bandes d'absorption marquées vers 1550 et 1650 cm^{-1} , attribuables à la liaison peptidique ; vers 2.700 à 3.000 cm^{-1} , attribuables à la liaison C-H (saturé) ; à 3.000-3.100 cm^{-1} , attribuables à C-H aromatique (tyrosine) ; à 3.300-3.370 cm^{-1} , attribuables à N-H dans R-NH_2 ; à 3.400-3.600 cm^{-1} , attribuables à OH dans

R-OH (tyrosine) ; enfin vers $750-1.000\text{ cm}^{-1}$, attribuables à C-C des chaînes ouvertes.

5) Électrophorèse.

Cette technique consiste à soumettre une particule étudiée en milieu liquide, à l'influence d'un champ électrique [11]-[12]-[13]. Toute particule chargée électriquement se déplacera vers l'électrode de signe opposé au sien. Dans le cas de l'iturine et pour les pH auxquels on a opéré, la migration s'est effectuée vers le pôle positif.

Mesures effectuées à pH 5,2.

L'expérience est réalisée à $0,5^{\circ}\text{C}$ dans un tampon acétate de sodium-acide acétique $0,2\text{ N}$ à pH 5,2.

La conductivité de la solution d'iturine dans le tampon est de $0,00879\ \Omega^{-1}/\text{cm}^{-1}$.

Un courant de 30 mA traverse l'appareil pendant 164 minutes.

Le gradient de potentiel est de

$$\frac{0,030}{0,75 \times 0,00849} = 4,71\text{ volt}/\text{cm}^{-1}$$

$0,75\text{ cm}^2$ étant la section de la cellule.

Dès lors la mobilité dans la solution est de

$$\frac{1,67}{164 \times 60 \times 4,71} = 3,60\text{ cm}^2 \cdot 10^{-5}/\text{sec}^{-1}/\text{volt}^{-1}$$

Mesures effectuées à pH 9,5.

L'expérience est réalisée à $0,5^{\circ}\text{C}$ dans un tampon au glycocolle de pH 9,5. La conductivité dans la solution étant de $0,00681\ \Omega^{-1}/\text{cm}^{-1}$ nous avons un gradient de potentiel de $3,8\text{ volt}/\text{cm}^{-1}$ et on enregistre une mobilité de $6,7\text{ cm}^2 \cdot 10^{-5}/\text{sec}^{-1}/\text{volt}^{-1}$.

D'autres expériences ont été réalisées à des pH plus acides dans des solutions riches en acide acétique. La mobilité diminue fortement mais les valeurs obtenues sont incertaines par suite de précipitations aisées à ces pH.

Conclusion.

Les expériences d'électrophère montrent que l'iturine se comporte comme une molécule amphotère, la mobilité étant plus élevée aux pH alcalins qu'aux pH acides.

6) Ultracentrifugation.

Cette technique consiste à soumettre les particules étudiées à un champ de force centrifuge suffisamment intense pour les faire sédimenter. Un dispositif optique approprié permet de suivre cette sédimentation et de l'enregistrer (voir *fig. 15*) à des temps divers.

La constante de sédimentation s est égale à

$$\frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

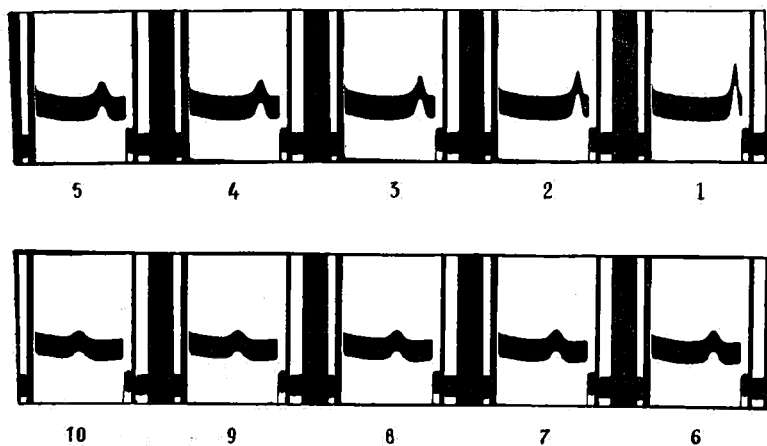


FIG. 15. — Sédimentation d'une solution d'iturine à 59.780 t/m.

(sédimentation dans un champ de force unitaire)

x étant la distance du ménisque au centre de rotation,
 t le temps en secondes,
 ω vitesse angulaire.

Les mesures pour l'iturine ont été effectuées à 23,2°, à une vitesse de 59.780 tr/min, sur une solution à 0,5 % dans du tampon à pH 5,2.

Les valeurs obtenues pour x à différents temps ont permis de calculer pour s une valeur de 5,16 cm/sec/dyne/gr ou 5,16 unités Svedberg.

Si on corrige cette valeur en tenant compte, d'une part de la viscosité et de la densité du solvant à la température de l'expérience par rapport à celle de l'eau pure à 20° C et, d'autre part, du volume spécifique partiel (0,75), on obtient :

$$S_{20}^{\circ} = 5,16 \times \frac{9,59}{10,05} \times \frac{1 - 0,75 \times 0,99820}{1 - 0,75 \times 1,00433} = 5,01$$

Conclusion.

Les diagrammes de sédimentation n'ont pas révélé une hétérogénéité de poids moléculaire importante. La valeur de s calculée indique un poids moléculaire élevé dont la valeur précise ne peut être connue qu'après avoir mesuré la constante de diffusion.

7) Constante de diffusion.

Celle-ci a été déterminée en superposant une solution d'iturine dans du tampon pur à du tampon pur dans une cellule spéciale. La technique utilisée consiste à mesurer l'ordonnée maximum y_m de la courbe dc/dx en fonction du temps (voir tableau 3) [14] [15] [16].

- c étant la concentration
 x la distance à la surface de séparation
 t le temps
 A surface du « pic ».

On effectue une correction graphique pour la légère perturbation provoquée par la mise en contact de la solution d'iturine dans le tampon, avec le tampon seul (acide acétique, acétate pH 5,2 — 0.2N — temp : 0,5° C).

TABLEAU 3. — *Valeurs de D pour différents temps.*

Y ^m en cm	A en cm ²	temps en min.	D en cm ² /sec.
2,3	0,432	102	$4,54 \times 10^{-7}$
0,74	0,428	997	$4,49 \times 10^{-7}$
0,48	0,435	2.447	$4,35 \times 10^{-7}$
			$4,46 \text{ cm}^2 \times 10^{-7} / \text{sec.}$

La valeur obtenue a aussi été corrigée par rapport à l'eau pure à 20° C. :

$$D_{20^\circ}^{\text{eau}} = 4,46 \cdot 10^{-7} \times \frac{293,2}{273,7} \times 1,75 \times 0,965 = 8,05 \text{ cm}^2 \cdot 10^{-7} / \text{sec.}$$

8) Calcul du poids moléculaire.

On a la relation $M = \frac{RTs}{D \cdot (1 - V\rho)}$ indépendante de

la forme et de la structure de la molécule
avec M : masse moléculaire

R : constante des gaz = $8.313.10^7$ ergs

T : température absolue

s : constante de sédimentation

x : distance du centre de rotation en cm

t : temps en seconde
 D : constante de diffusion
 V : volume moléculaire
 C : densité du solvant

En introduisant dans cette formule les valeurs trouvées pour s et D , on obtient

$$M = \frac{8,3 \cdot 10^7 \times 293 \times 5,01 \cdot 10^{-13}}{8,05 \cdot 10^{-7} (1 - 0,75 \times 1,004)} \approx 61.000$$

9) Étalement monomoléculaire.

Bon nombre de protéines ont la propriété de s'étaler en couche monomoléculaire sur une surface aqueuse comme le font les acides gras. Il en est ainsi de l'iturine. Pour évaluer la masse moléculaire d'une substance dispersée en film monomoléculaire, on peut se baser sur l'analogie entre l'état gazeux superficiel et l'état gazeux ordinaire ce qui donne la relation [17] :

$$FA = nRT \text{ ou } FA = \frac{RT}{M} \text{ ou } F = \frac{RTC}{M}$$

avec F = pression superficielle en dynes/cm

A = aire occupée par le film en m^2/mg

n = nombre de moles étalées de masse M

RT à $25^\circ = 2.460$

C = concentration superficielle en $mg/m^2 = \frac{1}{A}$.

Si on veut tenir compte du fait que le film n'est pas à l'état gazeux parfait ou introduit par analogie avec l'équation de VAN DER WAELS un facteur de cosurface α et on obtient :

$$F(A - \alpha) = \frac{RT}{M}$$

$$FA = \alpha F + \frac{M}{m} RT$$

si on trace le diagramme donnant en ordonnées les valeurs du produit FA et en abscisses les valeurs de F , en extrapolant à pression nulle les valeurs de FA on obtient la valeur du terme $\frac{m}{M} RT$ qui permet de calculer M (voir *fig. 16*).

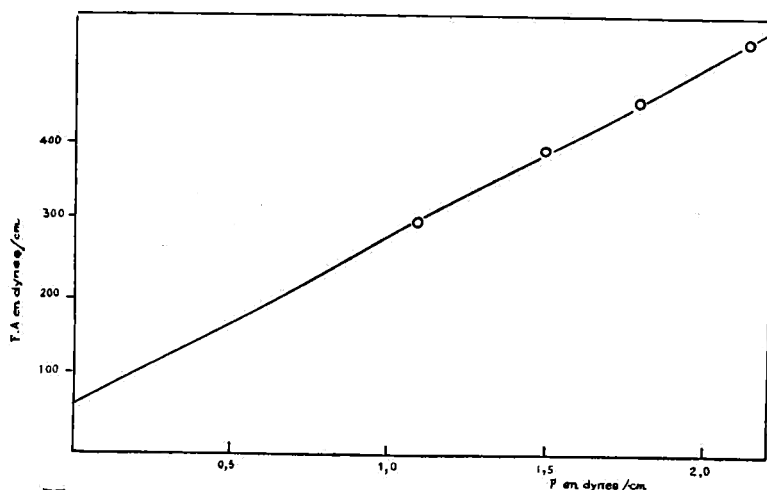


FIG. 16. — Étalement en couche mince : relation entre F et FA .

Ceci nous donne pour l'iturine :

$$\frac{14 \times 50 \times 58 \times 10^{-4} \times 10^{-3}}{2.460 \times 55 \times 10^{-3}} \simeq 33.400$$

La valeur obtenue par cette méthode est notablement plus petite que celle obtenue par ultracentrifugation-diffusion. Il est vraisemblable que des interactions importantes sont la cause de cette différence.

10) Courbes de solubilité.

Depuis les travaux de KUNITZ et NORTHROP, qui obtinrent, les premiers, des protéines hautement purifiées à solubilité rigoureusement constante, les courbes de solubilité sont souvent utilisées pour contrôler la pureté, suivre le fractionnement ou pour vérifier l'identité des protéines [18] [19] [20] [21]. La méthode de KUNITZ-NORTHROP s'effectue à pH constant avec des quantités variables de la substance étudiée. En principe, il suffit d'agiter des quantités variables du corps à étudier avec un volume constant du solvant jusqu'à réalisation de l'équilibre. On obtient la courbe de solubilité en portant en ordonnées la quantité soluble et en abscisses la quantité totale de la substance étudiée. Dans la première partie de la courbe tout le solide ajouté se dissout en donnant une solution limpide et les points représentatifs tombent sur la ligne à 45°. Lorsque la phase solide apparaît, trois types de courbes sont possibles :

1) Une courbe de pente zéro.

C'est ce qu'on obtient avec un corps pur. Mais on peut encore avoir cette courbe dans le cas d'une solution solide de deux ou plusieurs composés ayant exactement la même solubilité. On écarte le doute en répétant la détermination avec un autre solvant.

2) Une courbe incurvée :

C'est le cas d'une solution solide de deux ou plusieurs composants.

3) Une courbe présentant des cassures :

Chaque cassure représente l'apparition d'une nouvelle phase solide.

Il faut remarquer que ce genre de courbe peut être obtenu avec une seule substance présente sous deux formes solides distinctes, par exemple, amorphe et cristalline ; isomère *d* et *l* si l'un d'eux est en excès, etc...

Il est donc nécessaire d'effectuer les courbes de solubilité avec plusieurs solvants et, dans le cas de courbes de mélanges, séparer les solides et déterminer leur nature.

De même qu'un corps pur fond à température constante, la solubilité dans un solvant déterminé est constante. Pour les corps fragiles comme les protéines, cette méthode peut remplacer la détermination du point de fusion. D'autre part, cette méthode est extrêmement sensible et a plusieurs fois permis de mettre en évidence une hétérogénéité que les autres techniques n'avaient pu déceler.

Application à l'iturine.

Nous avons effectué des courbes de solubilité en milieu acide (acide trichloracétique à 5 %) et en milieu alcalin

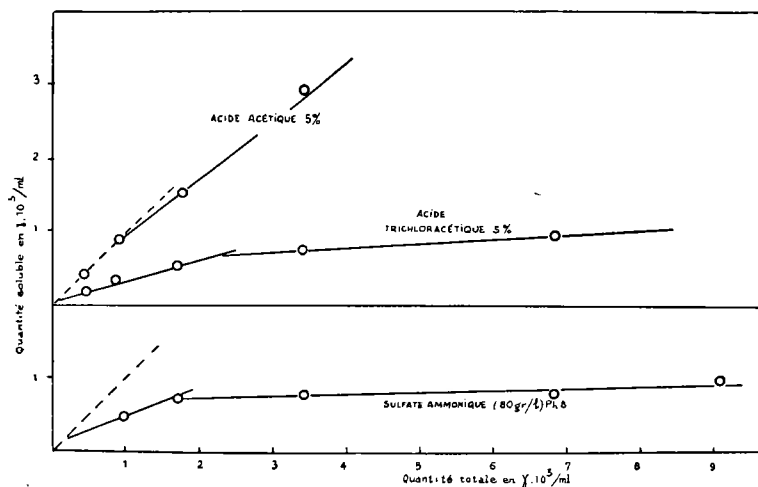


FIG. 17. — Courbes de solubilité.

(pH 8.0) avec du sulfate ammonique pur (80 gr /litre) comme précipitant.

Pour établir la courbe, on place des quantités croissantes d'iturine en solution dans l'eau distillée dans des tubes de 20 cm³ et on complète avec de l'eau distillée pour avoir 5 cm³ dans tous les tubes. On ajoute alors 5 cm³ de précipitant, on agite et on laisse flocculer pendant 2 heures, on centrifuge et on pipette une quantité convenable du liquide surnageant pour effectuer un dosage spectrophotométrique.

Dans les deux cas, nous avons obtenu des courbes caractéristiques de mélanges contenant au moins trois substances (voir *fig. 17*).

Cette technique permet de déceler dans l'iturine une hétérogénéité sur la nature exacte de laquelle nous ne sommes pas encore fixés.

VII. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DE L'ITURINE

1) Analyse brute : C, H, N.

Celle-ci a été effectuée par les méthodes classiques et a donné les résultats suivants :

N 10,7 %
C 43,0 %
H 6,35 %

2) Recherche de fonctions caractéristiques.

Les tests habituels pour les fonctions suivantes sont restés négatifs : alcool, aldéhyde, cétone, halogénure, sucres, phénol, peroxyde.

Des tests positifs mais faibles ont été obtenus pour les fonctions amide et noyau benzénique.

3) Réactions diverses.

Nous avons obtenu une précipitation plus ou moins abondante avec les réactifs suivants : acide chlorhydrique, sulfurique, nitrique, acétique, trichloracétique, picrique, citrique, phosphotungstique et tannique ; sulfates de cuivre, d'ammonium, de sodium, de magnésium ; chlorure de mercure, de fer, d'ammonium, de sodium ; acétate de plomb, ferrocyanure de potassium, sel de Reinecke, phénol.

Sont positives les réactions du BIURET (liaison pepti-

dique), xanthoprotéique ou de MULDER (nitrodérivés) de Millon (— OH sur noyau) du sulfure de plomb (cystine) à la ninhydrine (α aminé). Sont négatives ou très faibles les réactions de LIEBERMANN (tryptophane) de RASPAIL (tryptophane) de FEHLING (réducteur) de SAKAGUCHI (guanidine) et d'ADAMKIEWICZ (tryptophane).

Les réactions de SELIVANOFF (fructose et autres céto-ses), MOLISH (sucres réducteurs) sont négatives avec l'iturine ou son hydrolysate acide. La réaction de BIAL (pentoses) est très faible avec l'hydrolysate acide seulement. La réaction de DISCHE est très faible avec l'iturine ou son hydrolysate acide.

L'iturine résiste bien à l'action prolongée pendant 20 h à 37° de : trypsine à pH 8,0, pepsine à pH 3,0, papaïne à pH 6,0. D'autre part, aucune diminution sensible d'activité n'a été enregistrée au contact de cystéine, thiols, H_2S , H_2O_2 et de sang ; par contre le formol diminue fortement l'activité.

4) Dosage des acides aminés.

Ce dosage a été réalisé par voie microbiologique, selon les techniques mises au point par DUNN et coll. [22] ainsi que SANDERLICH et BAUMANN [23].

Dans le cas de l'utilisation de bacilles lactiques, la croissance, c'est-à-dire la quantité d'acide aminé présent, se mesure par un dosage acidimétrique de l'acide lactique produit.

Le milieu de culture contient un sucre, un mélange d'acides aminés comprenant tous les acides aminés sauf celui à doser et aussi des sels et vitamines. Les résultats obtenus avec l'iturine sont réunis dans le tableau 4. Il faut noter que cette technique ne permet pas de doser tous les acides aminés et ne donne que les pourcentages

d'acides de forme L. Ceci explique pourquoi on n'arrive au total qu'à 50 % environ. Une autre méthode (chromatographie sur papier suivie d'électrophorèse) a permis d'identifier la cystine ($\pm 2\%$) et la sérine ($\pm 2\%$) en plus de tous les acides déjà trouvés par la première méthode. Les valeurs beaucoup plus élevées obtenues notamment pour les acides aspartique et glutamique, la tyrosine et la proline, indiquent qu'il y a dans l'iturine une forte proportion de ces acides aminés sous la forme D. Les résultats détaillés de ces dosages seront publiés ultérieurement.

TABLEAU 4. — *Acides aminés de l'iturine.*
(dosage microbiologique)

Arginine	0,52	Lysine	0,92
Acide aspartique	22,20	Methionine	0,33
Acide glutamique	10,31	Phényl-alanine	0,54
Glycine	0,95	Proline	7,36
Histidine	0,06	Thréonine	0,66
Isoleucine	2,23	Tyrosine	1,43
Leucine	1,76	Valine	0,63

5) Stabilité à la lumière, chaleur, aération, stérilisation par la chaleur.

Une solution d'iturine, exposée à la lumière du jour et soumise à une aération modérée par barbotage d'air stérile, ne subit pas d'inactivation notable.

En solution aqueuse, l'iturine résiste bien à un ou plusieurs chauffages à 60° ainsi qu'à une ébullition de 1/2 h à 100°.

Un autoclavage à 120° pendant 20 minutes détruit une partie de l'activité à pH neutre ou acide et inactive complètement à pH alcalin.

Lorsqu'on chauffe l'iturine pulvérisée finement, sous vide, on peut porter la température jusque 150° C sans

faire disparaître l'activité et ce procédé est utilisé pour la stérilisation avant de préparer les pommades ou solutions destinées à un usage médical.

En solution aqueuse à température ordinaire, la destruction est rapide à pH nettement alcalin, tel que 10, très lente à pH neutre et relativement lente à pH acide.

6) Électrotitration.

La méthode utilisée consiste à ajouter à un volume déterminé d'une solution d'Iturine, NaOH ou HCl et à mesurer le pH après chaque addition. On calcule ensuite la quantité de base (ou d'acide) fixée en fonction du pH [26].

Le calcul des constantes d'ionisation (ou de leur log : pK) à partir de la courbe d'électrotitration est aisé dans le cas d'une seule ou même de deux ou trois fonctions ionisables pour autant qu'en un point de la courbe correspondant à l'ionisation d'une fonction, on puisse négliger les variations de l'ionisation des autres. Pour les molécules comportant de nombreuses fonctions ionisables, comme les protéines, ces calculs sont difficiles. L'iturine peut contenir les fonctions ionisables suivantes :

α CO ₂ H terminaux	3.0-3.2
CO ₂ H latéraux (ac. asp. et glut.)	4.4
imidazole (histidyl)	6.0-7.0
α amino terminaux	7.6-8.4
ϵ amino (lysyl)	9.5-10.6
OH phénolique (tyrosyl)	9.8-10.4
guanidine (arginyl)	12

La courbe 18 représente les résultats d'une électrotitration effectuée sur 200 mgr d'iturine en solution dans KCl 0,2 N. Nous avons porté en ordonnées la quantité de base fixée, exprimée en mol. gr. 10^{-6} , c'est-à-dire la

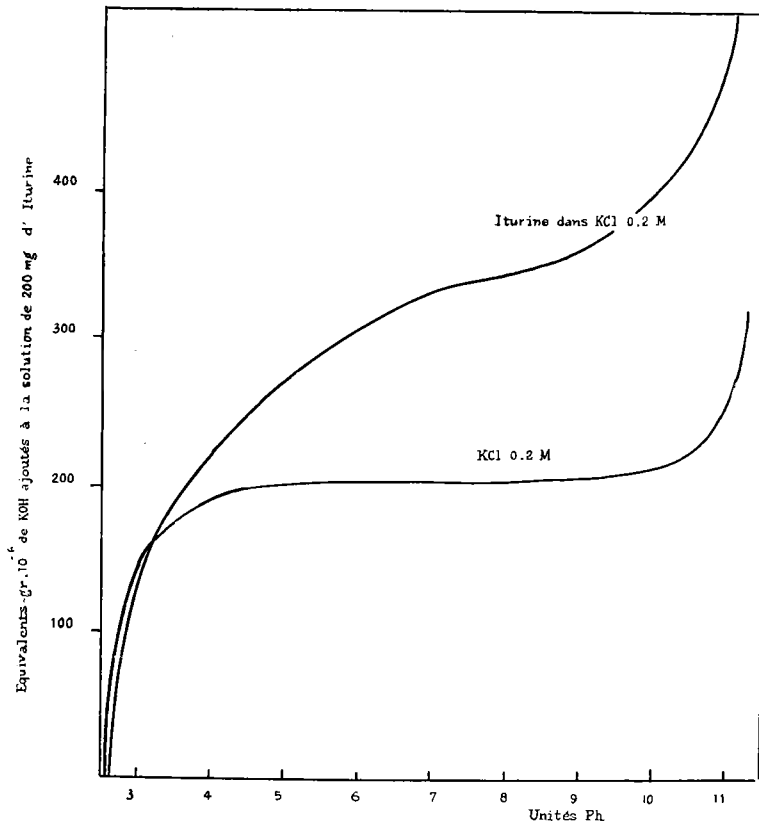


FIG. 18. — Courbe d'électrotitration.

quantité de base ajoutée, augmentée de la quantité d'ions H^+ et diminuée de la quantité d'ions OH^- libres en solution.

Conclusion.

La courbe obtenue montre une forte fixation de base entre pH 3,5 et 7,0 et entre pH 9 et 11,0 ce qui peut s'expliquer par la présence dans l'iturine d'une forte proportion d'acides aspartique et glutamique de $pK \simeq 4,4$ ainsi que de lysine et beaucoup de tyrosine dont

les pK sont voisins de 10. D'autre part, la teneur en histidine de pK 6,5 environ est très faible. Notons encore que l'arginine est titrée à un pH trop alcalin pour intervenir dans le tracé de la courbe.

VIII. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE L'ITURINE

1) Spectre antibiotique.

L'évaluation de l'activité antibiotique sur différentes souches microbiennes a été faite en incorporant des quantités croissantes d'iturine (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 γ /ml) à de la gélose nutritive contenant 2 % de sucre. Chaque souche à tester est inoculée au fil à la surface d'une série de tubes aux concentrations progressives en iturine. Après 2 à 8 jours d'incubation à 25° ou 37°, suivant les espèces, on note la concentration à partir de laquelle la croissance ne s'effectue pas. C'est la dose inhibitrice qui est notée dans le tableau 5. Celui-ci nous montre que l'activité sur les bactéries est faible à part quelques exceptions mais, par contre, l'activité antifongique est intense et pour des concentrations relativement faibles, de nombreuses souches pathogènes sont inhibées. Ces propriétés antifongiques peuvent être utilisées pour enrayer des infections à champignons ; pour contrôler des infections (par ex., dues à *candida albicans*) provoquées par l'usage d'antibiotiques qui rompent l'équilibre bactérien, ainsi que pour lutter contre les maladies des plantes provoquées par des champignons.

2) Toxicité.

Lorsqu'on injecte des lots séparés d'animaux avec des doses croissantes d'un produit toxique et qu'on porte sur un graphique en abscisses le log de la concentration utilisée et en ordonnées les pourcentages de mortalité observés, on obtient souvent une courbe de forme

sigmoïde. C'est le cas notamment pour les fongicides et l'iturine en particulier. L'évaluation graphique du LD 50 a été effectuée au moyen du diagramme imaginé par HAZEN et appliqué aux mesures de toxicité par GADDUM puis par BONÉT-MAURY [27-28].

TABLEAU 5. — *Spectre antibiotique de l'Iturine.*

Agrobacterium tumefaciens	128*
Bacillus megatherium	128
Bacillus subtilis G 543	> 1024
Bacillus subtilis 831	> 1024
Corynebacterium diphtheriae	32
Corynebacterium asperum	> 1024
Escherichia coli K 12	> 1024
Staphylococcus aureus H	> 1024
Micrococcus lysodeikticus	128
Mycobacterium phlei	> 1024
Proteus vulgaris	> 1024
Salmonella typhimurium	> 1024
Salmonella typhosa	> 1024
Sarcina lutea	8
Streptococcus hemolyticus	128
Serratia marcescens	128
Aerobacter aerogenes	> 1024
Streptomyces griseus	> 512
Streptomyces albus G	64
Streptomyces 67	> 1024
Streptomyces 51	> 1024
Saccharomyces carlsbergensis	16
Chaetomium globosum	256
Candida albicans	64
Torulopsis neoformans	16
Aspergillus niger	8
Penicillium chrysogenum	16
Penicillium notatum	16
Phialophora pedrosoi	32
Phialophora compactum	32
Phialophora janselmi	16
Ctenomyces interdigitalis	32
Sabouraudites canis	4
Trichophyton rubrum	32
Langeronia sandanensis	16
Epidermophyton floccosum	16
Sporotrichum schenckii	32
Trichoderma viride	64
Gercosporella herpotrichoides	8
Trichosporum giganteum	8

(*) Microgrammes par ml produisant une inhibition totale.

Nous avons utilisé des souris de race champagne, d'un poids moyen de 22 g environ, sans distinction de sexe. Après quelques essais préliminaires qui ont permis de situer le LD 50 entre 50 et 250 mg/kg, on injecte des lots de 40 souris par voie sous-cutanée avec des doses croissantes comprises entre ces deux limites.

Les résultats obtenus sont résumés par la *fig. 19*.

On en déduit que le LD 50 pour la souris est de 157 mg/kg.

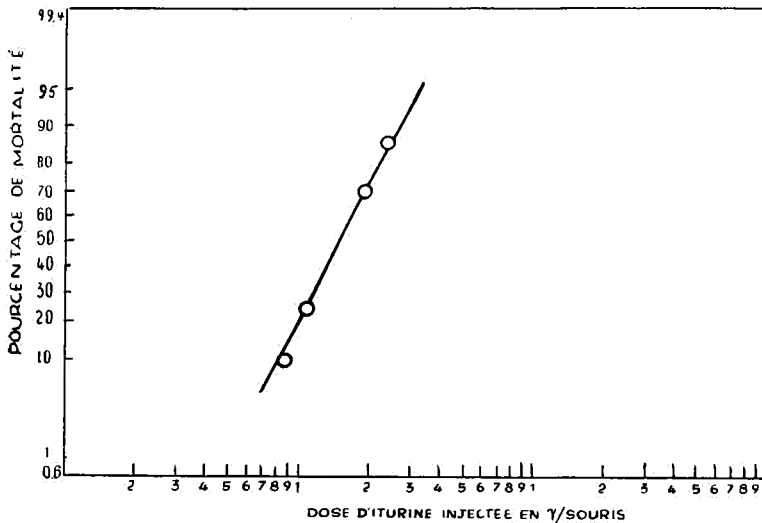


FIG. 19. — Calcul graphique du LD 50 pour la souris.

Si on compare cette toxicité avec celle d'autres antibiotiques peptidiques (voir tableau 6), on remarque que l'iturine a une toxicité moyenne dans cette classe de substances.

TABLEAU 7. — *Composition en acides aminés*

		Tryptophane	Phénylalanine	Tyrosine	Leucine	Proline	Acide aspartique	Acide glutamique	Valine	Ornithine	Alanine
Tyrocidine	A	—	2D 1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	
	B	1L	2D	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	
	C	+									
Gramicidine	A	2	—	—	6				5		3
	B	—	2	—							
	C			1							
Gramicidines	S		1D		1L	1L			1L	1L	
Gramicidine	J		2L		1D	1L			1L	2DL	
Pénicillines											
Polymyxine	A		—		1D						
	B		1D		1L						
	C			1L		—					
	D		—		1D						
	E		—		1D						
Polypeptine			1D		2L				1D		
									—		
Circuline			—		1D						
Actinomycine	C ₁					2L			2L		
	C ₂					2L			L		
	C ₃					2L			—		
	X ₁					2L			2L		
	X ₂					L			2L		
	I ₀					+			+		
	I ₁					+			+		
Lichéniformines	A et B		2			2	1		2		
Nisines	A B et C D				+	+	+	+	+	—	+
Iturine			+	+	+	+	+	+			
Bacitracines			1D		1L		2DL	1D		1D	
Subtiline		+	+		+	+	+	+	+		+
Bacillomycine		—	—	+	—	—	+	+	—		—

TABLEAU 6. — *LD 50 en mg par kg de quelques antibiotiques peptidiques.*

Antibiotique	Injection sous cutanée	Injection intraveineuse
Bacitracine	1300-2500	360
Subtiline	150-670	60
Iturine	157	60-70
Nisine		30
Tyrocidine		15-16
Polymyxine A	87,5	6,9
» B	82,5	6,1
» C	160	11,9
Circuline	77	10
Gramicidine		2.5-3.0

Le LD 50 par voie intraveineuse est compris entre 60 et 70 mg par kg ; le nombre d'animaux injectés jusqu'à présent est trop faible pour donner un chiffre plus précis.

Divers essais ont été également effectués sur des lapins domestiques. Nous avons pu leur injecter, par voie intraveineuse 10 mg par kg, 10 jours consécutivement, et, 20 mg/kg, 10 jours consécutivement, par voie sous-cutanée, sans dommage apparent.

Avec des doses plus fortes, par voie intraveineuse (20 mg/kg/jour), le lapin ne résiste pas et à l'autopsie, on trouve les reins et le cœur intacts mais le foie et la rate atteints de nécroses.

Notons encore quelques essais en vue de dépister un danger éventuel présenté par les bacilles sécréteurs d'iturine.

L'inoculation sous-cutanée de 2 mg de corps bacillaires frais au cobaye reste sans aucune suite. Celle de 2 mg par voie péritonéale n'est suivie le 2^e jour que d'une légère élévation de température à 39° C.

L'inoculation intraveineuse de un mg de corps bacillaires frais à 12 souris blanches laisse les 12 souris éprouvées en parfaite santé.

Le bacille 831 lui-même ne semble donc pas dangereux.

IX. CARACTÈRES PERMETTANT DE DIFFÉRENCIER L'ITURINE DES AUTRES ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES

1) Composition en acides aminés.

Nous avons réuni dans le tableau 7 les compositions connues en acides aminés des principaux antibiotiques peptiques. On voit immédiatement que l'iturine diffère des autres antibiotiques par plusieurs acides aminés.

La coliformine [29] contient en plus d'acides aminés divers du glucose et du xylose alors que l'iturine ne contient aucun carbohydate.

2) Action des enzymes.

La subtiline [30] est inactivée par la pepsine, la trypsine et la papaïne. La micrococcine [31] est inactivée par la pepsine et la trypsine alors que l'iturine résiste à ces enzymes.

La bacilysine [32] est inactivée par la trypsine de même que la circuline [33].

3) Action de réactifs divers.

L'alvéine [34] précipite en milieu alcalin contrairement à l'iturine qui précipite en milieu acide. La fluvo-mycine [35] ne précipite pas en milieu acide. La bacil-

line [36] est inactivée par H_2S alors que l'iturine résiste à ce réactif.

4) Spectre infra-rouge.

La *fig. 20* montre les différences observées par cette technique entre l'iturine, la cinnamycine [37] et la mycolutéine [38].

5) Spectre antibiotique.

Alors que l'iturine est pratiquement inactive sur le *E. coli*, la circuline [33] agit à des doses de 1,5 à 3,0 γ /ml et la polymyxine [39] à des doses de 0,04 à 0,30 γ /ml. La fluvomycine est inactive sur *P. chrysogenum* alors que l'iturine l'inhibe avec quelques γ /ml.

6) Poids moléculaire.

La plupart des antibiotiques peptidiques ont un poids moléculaires de 500 à 3.000 environ. Un seul, la penatine [40], a un poids moléculaire élevé (150.000) comme l'iturine, mais il s'agit d'une substance thermoslabile toute différente.

7) Solubilité.

La bacilipine [41] est soluble dans l'acétate d'amyle, le benzène, l'éther, etc... solvants qui ne dissolvent pratiquement pas l'iturine.

La bacillomycine [42] est soluble dans l'acétone ainsi que l'eumycine [44] alors que ce réactif précipite l'iturine de ses solutions.

La biocérine [43] est insoluble dans l'eau contrairement à l'iturine.

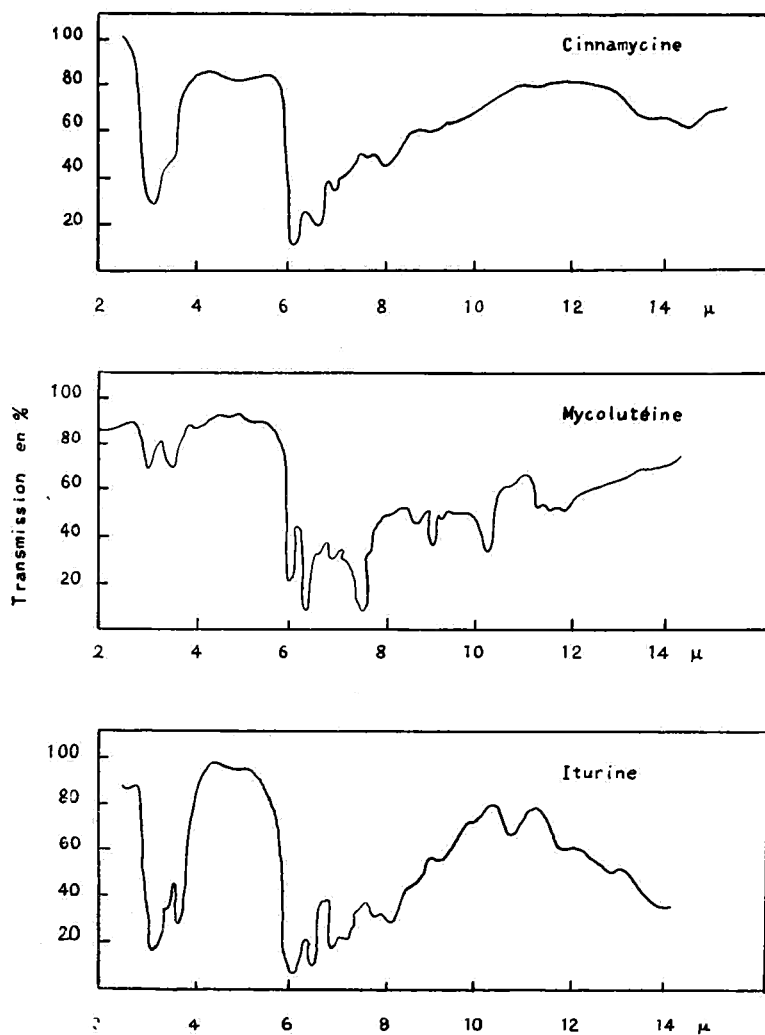


FIG. 20. — Comparaison entre les spectres infra-rouges de l'iturine, la cinnamycine et la mycolutène.

Conclusion.

L'ensemble de ces différents critères ainsi que d'autres trop longs à énumérer permettent d'affirmer que l'iturine est nettement différente des antibiotiques peptidiques décrits jusqu'à présent.

X. ESSAIS CLINIQUES

1) Traitement d'ulcères.

Les premiers essais d'application thérapeutique de l'iturine furent effectués au Congo pour le traitement d'ulcères phagédéniques tropicaux.

Le traitement consistait en pansements humides imbibés de bouillon de culture brut. Les ulcères purulents remplis d'une association fuso-spirillaire, grandes comme la paume d'une main, se nettoyèrent rapidement et évoluèrent vers la cicatrisation et la guérison. Bientôt l'odeur pénétrante et écœurante de l'ulcère phagédénique disparut de la salle de pansements réservée aux ulcéreux.

Plusieurs lots d'iturine brute furent utilisés de cette façon en 1946 et 1947, simplifiant grandement le problème du nettoyage et de la cicatrisation de ce genre d'ulcères.

2) Traitement de mycoses cutanées.

En se basant sur l'intense activité antifongique mise en évidence par les essais *in vitro* des traitements de dermatomycoses ont été effectués en Belgique dans deux séries d'essais cliniques [24]-[25].

La première série d'essais a donné les résultats consignés dans le tableau 8.

Dans cette première série d'essais, on a écarté toute mycose présentant une complication infectieuse. Certains malades étaient des cas frais, d'autres avaient été soignés antérieurement par divers produits antifongiques sans aucun succès. Au cours de ces essais, il

est apparu qu'une concentration de 5 % dans un onguent neutre, était nécessaire pour obtenir une bonne activité.

TABLEAU 8. — *Résultats du traitement de dermatomycoses par l'iturine.*

Maladies	Nombre de cas	Résultats		Durée du traitement	Réactions
		Guérisons	Insuccès		
Pityriasis Versicolor	5	5	0	8-15 jours	néant
Herpès circinés et Kérions	12	12	0	2-4 semaines	néant
Eczémas marginés de Hébra	9	6	3	2-4 semaines	sensations de brûlure dans 3 cas dont un a pu être guéri
Mycoses des espaces interdigitaux et régions plantaires	15	9	6	2-4 semaines	sensation de brûlure dans 4 cas, accompagnée dans 3 cas de dermite relativement courte

En résumé, sur un total de 41 malades traités on a obtenu 32 guérisons et 9 échecs soit une proportion de guérisons atteignant 78 %. Les réactions secondaires ont été relativement peu importantes et 6 mois après les traitements, aucune récurrence n'était apparue.

Une deuxième série d'essais cliniques a donné les résultats résumés dans le tableau 9.

TABLEAU 9. — *Résultats du traitement de dermatomycoses par l'iturine (2^e série).*

Maladies	Nombre de cas	Guérison clinique après 30 jours
Épidermophytie interdigitale	37	23
Épidermophytie palmo-plantaire	16	8
Éczéma marginé de Hébra	20	11
Pityriasis Versicolor	9	9
Érythrasma	8	6
Herpès circiné	11	9

Ces essais ont montré l'action thérapeutique particulière sur des entités cliniques réputées rebelles comme les épidermophyties palmo-plantaires et les herpès circinés.

On n'a enregistré que 2 récurrences sur 55 guérisons dans les 6 mois qui ont suivi le traitement. Malgré son activité, cette substance a peu de potentialité allergisante. Enfin, l'activité antifongique est supérieure à celle des autres produits utilisés actuellement en clinique ainsi que le montre le tableau 10.

TABLEAU 10. — *Comparaison entre l'activité de l'iturine et celle d'autres antifongiques.*

Agent thérapeutique	Nombre de cas traités	Pourcentage de guérisons après 30 jours
Iturine	101	66
Astérol	73	61
2-2' dioxy 5-5 dichloro-diphényl sulfur	69	61
Dérivés undécyléniques	42	47
Pyroxétol	30	43
Alcool iodé	30	43

XI. CONCLUSION GÉNÉRALE

En 1945, l'un de nous, au cours de ses recherches bactériologiques, a découvert au Congo belge une souche d'un bacille aérobie sporulant qui produit dans divers milieux de culture un principe antibiotique appelé iturine. Dès les années 1946-1947, il fut possible au moyen des jus de culture bruts, de nettoyer et de guérir des ulcères phagédéniques. L'étude complète du produit fut alors poursuivie en Belgique. Le bacille producteur, catalogué sous le n° 831 présente toutes les caractéristiques d'un *Bacillus subtilis*. Deux types de colonies ont été isolés présentant des différences notamment au point de vue de la proportion relative des principes actifs élaborés dans les cultures. Il est en effet apparu rapidement que les jus de culture bruts étaient des mélanges très complexes pouvant se résoudre en trois groupes de substances. Deux de ceux-ci (fractions O et N) étant solubles dans l'acétone et le 3^e (fraction L) insoluble dans ce solvant. Ces trois groupes se différencient aisément par leur spectre antibiotique, leur thermostabilité, leur résistance aux U.V., la chromatographie sur papier ainsi que la vitesse de dialyse.

Les caractères physico-chimiques des fractions O et N sont ceux des lipides. Elles s'oxydent aisément, avec perte d'activité, et on a pu montrer qu'il s'agissait de substances non saturées.

Les conditions de culture, telles que nature du milieu, pH, température, aération et agitation ont été étudiées. Ces fractions O et N soumises à l'analyse chromatographique sur magnésie se révélèrent très complexes

et les caractéristiques des produits isolés ont été déterminées. Elles perdent rapidement leur activité par irradiation aux rayons U. V. avec modification de leur spectre. Des substances lipidiques de ce genre ont été décrites à plusieurs reprises dans des cultures bactériennes et ne semblent pas spécifiques de la souche 831, aussi réservons-nous l'appellation d'iturine à la fraction L uniquement qui est d'une tout autre nature.

L'iturine peut être dosée par plusieurs méthodes tant par voie microbiologique que chimique et une unité arbitraire a été définie. Les conditions de culture en tubes, flacons d'Erlenmeyer puis en cuves de différentes capacités ont été déterminées.

Des méthodes d'extraction et de purification ont été mises au point à l'échelle du laboratoire d'abord puis à l'échelle « usine-pilote ».

En recherchant les fonctions caractéristiques ainsi qu'en effectuant diverses réactions d'identification, il est apparu rapidement que l'iturine était de nature polypeptidique. Les constantes physiques caractéristiques, pour ce genre de composés, furent mesurées à savoir : spectres infra-rouge et ultra-violet, constante de diffusion, vitesse de sédimentation, vitesse de migration électrophorétique, étalement en couche mince, électrotitration et courbes de solubilité. Seule la dernière technique citée a permis de mettre en évidence une hétérogénéité du produit purifié. Il semble donc que l'on ait deux ou plusieurs substances polypeptidiques, de poids moléculaire élevé, ayant des propriétés extrêmement voisines. D'autres techniques plus sensibles (immuno-chimie et partage à contre courant) sont à l'étude actuellement pour essayer de les séparer. La détermination des acides aminés a été effectuée par chromatographie sur papier et par dosage microbiologique. L'iturine est stable à la lumière et à la chaleur ce qui permet une stérilisation aisée pour les usages médicaux. Le spectre

antibiotique a révélé une activité négligeable sur les bactéries mais une puissante activité antifongique notamment sur de nombreuses souches pathogènes. La toxicité déterminée par le LD 50 sur souris ainsi que par divers essais sur lapin est du même ordre de grandeur que celle d'autres antibiotiques peptidiques déjà connus tels que subtiline et polymyxine C. De toutes façons, si l'injection intraveineuse ou intramusculaire appelle certaines restrictions, l'application locale ne provoque aucune irritation importante ; d'autre part, au cours des essais effectués jusqu'à présent, aucune réaction d'ordre allergique ne s'est manifestée. Divers critères, tels que la composition en acides aminés, la résistance aux enzymes, le spectre infra-rouge, le spectre antibiotique permettent d'affirmer que l'iturine est différente des autres antibiotiques déjà décrits. Les essais cliniques effectués récemment montrent que l'iturine est plus active que les autres antifongiques déjà connus. On a enregistré environ 70 % de guérisons totales de mycoses cutanées et cela pratiquement sans récives.

D'autre part, certaines affections réputées rebelles comme des épidermophyties palmoplantaires et des herpès circinés ont pu être guéries. Ainsi grâce à l'heureuse découverte sur le sol congolais d'une souche douée de propriétés particulières et grâce aux recherches décrites dans ce mémoire, l'arsenal des antibiotiques modernes sera bientôt enrichi d'un nouveau produit qui, sans être révolutionnaire, permettra, nous l'espérons, de soulager bien des souffrances, en Afrique et ailleurs.

XII. POSTFACE

Qu'il nous soit permis de remercier, tout d'abord, la direction de l'Union Minière pour l'honneur qu'elle nous a fait en décernant à notre mémoire une mention et pour la généreuse rétribution qu'elle lui a accordée.

Notre travail n'aurait pas pu être mené à bien sans l'aide précieuse et la collaboration bienveillante de plusieurs personnes, notamment : le professeur M. WELSCH qui nous a enseigné diverses techniques microbiologiques et nous a constamment aidé de ses conseils judicieux ; le professeur E. CHAIN qui nous a accueilli dans ses laboratoires ; les professeurs V. DESREUX et M. FLORKIN ainsi que sa collaboratrice M^{me} G. DUCHATEAU ; le professeur RENARD et ses collaborateurs, chez qui nous avons pu effectuer diverses mesures ou dosages et qui nous ont aidés de leurs conseils fructueux ; enfin le professeur C. LAPIÈRE et les docteurs J. P. CLAIRBOIS et S. BLOQUIAU qui nous ont fait profiter de leur grande expérience pour les premiers essais cliniques. Qu'ils veuillent bien trouver ici nos remerciements les plus sincères.

Les recherches effectuées à l'étranger n'ont pu être réalisées que grâce à des subsides de l'I. R. S. I. A. ; nous tenons à lui en exprimer toute notre gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

Purification de l'Iturine.

- [1] DELCAMBE, L. (1950), *C. R. Soc. Biol.*, **144**, 1431 ; (1952), *C. R. Soc. Biol.*, **146**, 789 ; (1952), *C. R. Soc. Biol.*, **146**, 1808.
- [2] DELCAMBE, L. (1952), *Arch. Intern. Physiol.*, **60**, 554.

Identification de la souche.

- [3] BERGEY, D. H. et coll., *Manual of determinative Bacteriology*. (Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1945, p. 706).

Dosages.

- [4] N. G. HEATLEY (1944), *Biochem. J.*, **38**, 61.
- [5] J. G. VINCENT et H. V. VINCENT, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, **55**, p. 162 .
- [6] H. J. FISTER, *Manual of standardized procedures for spectrophotometric chemistry* (Standard Sc., supp. Corp., New York, 1950).

Cuves de 10 litres.

- [7] E. B. CHAIN (1954), *Rend. Ist. sup. di Sanità*, vol. XVII, 61-86.

Cuves de 225 et 667 litres.

- [8] WELSCH, et M. DELCAMBE, L., 1954, XXVII^e Congrès chim. ind. Brux.
- [9] DELCAMBE, L. (1954), *Ind. Chim. Belge XIX*, pp. 1283-1292.

Collecteur de fractions.

- [10] DESREUX, V., (1949), *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, **68**, 789-806.

Électrophorèse.

- [11] LONGSWORTH, (1946), *Ind. Eng. chem. analytical Ed.*, p. 219.
- [12] TISELIUS (1937), *Bioch. J.*, **31**, 1464.
- [13] SWENSON (1946), *Arkiv för Kemi Mineralogi och Geologi*, Bd 22A. n^o 10.

Constante de diffusion.

- [14] WILLIAMS et CADY (1934), *Chem. Rev.*, **14**, 171.
- [15] NEURATH, 1942, *Chem. Rev.*, **30**, 357.
- [16] L. G. LONGSWORTH (1941), *An. New York Acad. Sci.*, vol. XLI, p. 267.

Étalement en couches minces.

- [17] DIEU, H. (1951), *Maandschrift voor Kindergeneeskunde*, XIX, pp. 293-301.

Courbes de solubilité.

- [18] KUNITZ-NORTHROP (1917), *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **12**, 2.
- [19] KUNITZ (1938), *J. Gen. Physiol.*, **21**, 601.
- [20] HERRIOT, DESREUX et NORTHROP (1940), *J. Gen. Physiol.*, **24**, 213.
- [21] NORTHROP et KUNITZ (1930), *J. Gen. Physiol.*, **13**, 781.

Dosage microbiologique des acides aminés.

- [22] M. S. DUNN et al., *Univ. California Publ. Physiol.* (1949), **8**, 293 ; *J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 653.
- [23] H. E. SAUBERLICH et C. A. BAUMANN, *J. Biol. Chem.* (1949), **177**, 545.

Résultats cliniques.

- [24] CLAIRBOIS et DELCAMBE, L. (1956), *Arch. Intern. Dermatol.*, séance du 4 mars, Bruxelles.
- [25] BLOQUIAU et DELCAMBE, L. (1956), *Arch. Intern. Dermatol.*, séance du 4 mars, Bruxelles.

Électrotitration.

- [26] SIMMS et LEVENE (1926), *J. B. C.*, **70**, 319.

Toxicité.

- [27] BLISS, C. I. (1935), *Ann. Appl. Biol.*, **22**, 134-167.
- [28] BONET-MAURY, P. (1943), *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 400.

Caractéristiques de divers antibiotiques peptidiques.*Coliformine :*

- [29] FREYSCHUSS et al. (1955), *Antibiotics and Chem.*, p. 218-223.

Subtiline :

- [30] HUMFELD, H. et FEUSTEL, I. (1943), *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **54**, 232.

Micrococcine :

- [31] T. L. SU (1948), *Brit. J. Exp. Path.*, **29**, 473.

Bacilysine :

- [32] G. G. F. NEWTON (1949), *Brit. J. Exp. Path.*, **30**, 306.

Circuline :

- [33] MURRAY, F. J. et TETRAULT, P. A. (1948), *Proc. Soc. Am. Bact.*, **2**, 20.

Alvéine :

- [34] GILLIVER and coll. (1949), *Brit. J. Exper. Path.*, **30**, 209.

Fluvomycine :

- [35] CARVAJAL (1953), *Antibiotics and Chem.*, p. 765.

Bacilline :

- [36] FOSTER, J. W. et WOODRUFF, H. B. (1946), *J. Bact.*, **51**, 363.

Cinnamycine :

- [37] DVONGH et al. (1954), *Antibiotics and Chem.*, pp. 1135-1142.

Mycolutéine :

- [38] SCHMITZ et coll. (1955), *Antibiotics and Chem.*, pp. 652-657.

Polymyxine :

- [39] BENEDICT, R. G. and A. F. LANGLYKKE (1947), *J. Bact.*, **54**, 24.

Penatine :

- [40] KOCHOLATY, W. (1942), *J. Bact.*, **44**, 143.

Bacilipine :

- [41] NEWTON, G. G. F. (1949), *Brit. J. Exper. Path.*, **30**, 306.

Bacillomycine :

- [42] LANDY, M. et coll. (1948), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**, 539.

Biocérine :

- [43] GOODLOW, R. J. et coll. (1947), *J. Bact.*, **54**, 268.

Eumycine :

- [44] JOHNSON, E. A. et BURDON, K. L. (1956), *J. Bact.*, **51**, 590.

BARON, A. L., Handbook of antibiotics (Reinhold. Publ., N. Y., 1950).

Lipoïdes bactériens.

- [45] HETTICHE, Z. *Immunitäts* (1934), t. 83, p. 499.

- [46] WELSCH, M., *Journ. Bactér.* (1941), t. 42, p. 801.

- [47] HAYS, E. E., WELLS, I. C. et coll., *Journ. Biol. Chem.*, (1945), t. 159, p. 725.

TABLE DES FIGURES

FIG. 1. — Iturine. Schéma d'extraction	7
FIG. 2. — Différences d'activité antimicrobienne des trois fractions O, N et L	9
FIG. 3. — Développement (par inhibition de la croissance de <i>S. aureus</i>) des chromatogrammes sur papier correspondants aux fractions O, L et N de l'iturine	9
FIG. 4. — Influence de la source d'azote sur la production de la fraction active sur <i>Staphylococcus</i> n° 17	13
FIG. 5. — Influence de la source de carbone sur la production de la fraction active sur <i>Staphylococcus</i> n° 17	14
FIG. 6. — Diamètre des zones d'inhibition sur <i>P. notatum</i> en fonction de la concentration en iturine et de la concentration en germes sensibles	20
FIG. 7. — Courbe d'absorption de l'iturine + CuSO_4 à 550 m μ ..	22
FIG. 8. — Courbe d'absorption à 2780 Å (Spectrophotomètre Unicam)	23
FIG. 9. — Courbe de production en cuve de 225 l avec une aération de 3 vol. d'air/min	29
FIG. 10. — Vue d'ensemble des cuves de fermentation de 225 et 675 litres	29
FIG. 11. — Section filtration	29
FIG. 12. — Colonne d'extraction à contre-courant : vue de face de la partie inférieure avec deux cuves de récolte	37
FIG. 13. — Spectre ultra-violet	42
FIG. 14. — Spectre infra-rouge de l'iturine	42
FIG. 15. — Sédimentation d'une solution d'iturine à 59.780 t/min ..	45
FIG. 16. — Étalement en couches minces : relation entre F et A ..	49
FIG. 17. — Courbes de solubilité	51
FIG. 18. — Courbes d'électrotitration	57
FIG. 19. — Calcul graphique du LD 50 pour la souris	61
FIG. 20. — Comparaison entre les spectres infra-rouges de l'iturine, la cinnamycine et la mycolutéine	67

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction	3
II. Description et caractères de la souche productrice	5
III. Complexité des jus de culture brut	7
IV. Lipoides accompagnant l'iturine	11
V. Préparation de l'iturine purifiée	19
VI. Propriétés physiques de l'iturine	41
VII. Propriétés chimiques de l'iturine	53
VIII. Activités biologiques de l'iturine	59
IX. Caractères permettant de différencier l'iturine des autres antibiotiques peptidiques	65
X. Essais cliniques	68
XI. Conclusion générale	71
XII. Postface	74
BIBLIOGRAPHIE	75
TABLE DES FIGURES	78

