

# ROYAUME DE BELGIQUE



SERVICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

## BREVET D'INVENTION

N° 521114

demande déposée le 30 juin 1953 à 11 h.50' ;

brevet octroyé le 30 décembre 1953.

J.M. GHUYSEN, résidant à MICHEROUX.

### PROCEDE DE PREPARATION D'ACTINOMYCÉTINE D'ACTIVITE BACTERIOLYTIQUE ACCRUE.

La présente invention est relative à un procédé de préparation d'actinomycétine d'activité bactériolytique accrue.

5 Ainsi que l'on sait, l'activité bactériolytique de l'actinomycétine, en se manifestant à la fois comme activité dite "colilytique" et comme activité dite "staphylolytique", est de nature complexe. En effet, l'actinomycétine est susceptible de lyser, c.à.d. de clarifier, grâce à son activité colilytique, des suspensions de bactéries gram-négatives, tuées par un chauffage préalable et, grâce à son activité staphylolytique, des suspensions de bactéries gram-positives vivantes, tout en intervenant  
10 d'ailleurs aussi, grâce à ses deux types d'activité, dans la lyse des bactéries gram-positives chauffées.

L'actinomycétine peut être obtenue par culture du *Streptomyces Albus G* dans un milieu peptoné aéré et agité, contenant certains sels minéraux et composé p.ex. comme suit :

15 Peptone	1 %	soit 10 gr/litre
KCl	$7 \times 10^3$ molaire	" 0,52 "
NaNO <sub>3</sub>	$24 \times 10^3$ "	" 2,04 "
K <sup>2</sup> HPO <sub>4</sub>	$6 \times 10^3$ "	" 1,04 "

20 L'utilisation pratique des propriétés bactériolytiques de l'actinomycétine est liée à la cinétique ou évolution de la lyse des substrats sensibles et au taux de production de chacun des deux principes bactériolytiques.

Le taux de production des principes bactériolytiques ainsi que le type de cinétique présenté par la lyse des substrats sensibles dé-

pendent, de façon généralement différente pour les deux principes actifs, des conditions d'incubation du Streptomyces, c.à.d. de la température d'agitation, du degré d'aération, et de la composition (au point de vue tant de la nature que de la concentration) du milieu de culture, en peptones et sels minéraux de base, etc.

C'est ainsi que, par culture dans le milieu précité et à température normale (environ 28°C), la cinétique de la lyse présentée par le principe colilytique correspond à celle d'une réaction pseudomonomoléculaire  $C = \frac{k \cdot x}{t}$  où C = concentration relative en actinomycétine.

t = temps de contact du substrat microbien sensible avec l'actinomycétine,  
x = logarithme du rapport du trouble initial au trouble résultant après un temps d'incubation t  
k = constante.

La production de cette activité douée d'une cinétique "normale" peut cependant facilement être troublée par plusieurs facteurs d'ordre parfois très différent. La cinétique, présentée par le principe colilytique obtenu, peut, en effet, devenir "anormale", étant alors régie par l'équation  $\sqrt{C} = \frac{k \cdot x}{\sqrt{t}}$ .

Parmi ces facteurs perturbateurs, on peut citer, p.ex. pour le milieu de culture de base précité, une élévation de la température d'incubation de 28° à 37°C qui, tout en provoquant un développement plus rapide du mycélium, modifie le type de cinétique de son principe colilytique. D'autres facteurs agissant dans le même sens défavorable sont p.ex. la présence, dans le milieu de culture, soit d'agar-agar, soit de certains ions bivalents.

Contrairement à la cinétique de lyse du principe colilytique, la cinétique de lyse du principe staphylolytique, obéissant à la formule  $\sqrt{C} = \frac{k \cdot x}{t}$ , n'est pas sujette aux effets d'une variation de température, ni à la nature et/ou à la concentration d'ions bivalents, présents ou introduits dans le milieu de culture.

Quant aux taux de production des principes tant colilytique que staphylolytique, ils dépendent fortement des conditions expérimentales de référence, telles la température d'incubation, la concentration des électrolytes constitutifs du milieu de base, la présence d'ions étrangers en tant qu'impuretés du milieu de culture, ou y introduits délibérément, les modalités d'ensemencement, d'agitation, d'aération etc.

Pour les deux principes bactériolytiques, le taux de production est notamment abaissé, dans un certain intervalle, par une élévation de la température au delà d'une certaine limite.

Or, on a constaté que la présence de cations bivalents, dans le milieu de culture, peut exercer des effets considérables, généralement spécifiques et même antagonistes (pour deux cations différents), sur la production des principes bactériolytiques et le type de cinétique présenté par ceux-ci lors de la lyse des substrats microbiens sensibles.

La cinétique de la lyse présentée par le principe colilytique est rendue anormale par addition, aux concentrations comprises entre  $10^5$  et  $10^2$  molaires, des cations  $Cu^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Fe^{++}$  pour une température d'incubation de 28°C, de  $Ca^{++}$  à 32°C, de  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  entre 32° et 36°C, alors qu'elle reste normale, même entre 36° et 38°C, si le milieu renferme une certaine quantité de  $Co^{++}$ . Ces mêmes cations, sauf le  $Zn^{++}$ , n'influencent pas la cinétique de la lyse du principe staphylolytique obtenue.

Dans le cas de la production du principe colilytique, le cation  $Co^{++}$ , agit donc comme protecteur vis-à-vis d'une élévation de la température, cette protection pouvant se manifester même vis-à-vis d'autres cations bivalents ( $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ) p.ex. ou d'autres substances (agar-agar), susceptibles d'induire, en son absence, une activité colilytique anormale.

En présence p.ex. de cations  $Mg^{++}$  ( $15,10^5$  molaire) et de  $Fe^{++}$  ( $8.10^{-7}$  molaire), l'activité colilytique obtenue est anormale après incubation à  $32^{\circ}C$ . En supprimant le fer ou en remplaçant une quantité déterminée de magnésium (p.ex.  $10^{-4}$  molaire) par une quantité correspondante de cobalt, on restaure non seulement la production d'une activité colilytique normale, mais, dans le cas d'addition de cobalt, on maintient même normale cette activité jusqu'à la température d'incubation de  $37^{\circ}C$ .

Un effet de protection analogue est observé, p.ex. vis-à-vis de l'agar-agar, qui, additionné à la concentration de  $2/10.000$  à un milieu de culture renfermant le cation  $Mg^{++}$  à la concentration  $500 \times 10^{-5}$  molaire, induit, à une température d'incubation de  $27^{\circ}C$ , la production d'une activité colilytique anormale.

Ce rôle perturbateur est annihilé par addition supplémentaire de  $Co^{++}$ , à la concentration de  $10^{-4}$  molaire, le principe colilytique présentant alors de nouveau une cinétique normale.

Au point de vue pratique, il s'ensuit donc de ces constatations que l'addition de  $Co^{++}$ , à concentration appropriée, permet de maintenir normale la cinétique présentée par le principe colilytique obtenue, même dans le cas d'une élévation anormale de la température d'incubation au delà de p.ex.  $28^{\circ}C$  environ et/ou de la présence de cations bivalents perturbateurs, dans le milieu de culture en tant qu'impuretés apportées p.ex. par les réactifs, cette addition de  $Co^{++}$  n'exerçant pas d'effet nuisible vis-à-vis de la cinétique présentée par le principe staphylolytique.

Bien que dépendant fortement des conditions expérimentales de référence, ainsi qu'il a été indiqué ci-dessus, les taux de production des principes colilytiques et staphylolytique sont cependant influencés aussi par la présence de cations bivalents.

Pour le principe colilytique, ce taux, entre  $27$  et  $37^{\circ}C$ , est d'autant plus faible que la température d'incubation est plus élevée et cela même en présence de cations bivalents assurant, à température plus élevée, l'obtention d'une activité du type normal.

Un cation bivalent déterminé provoque une production maximum du principe colilytique à une concentration optimum qui, suivant les cas, varie entre  $10^{-5}$  et  $10^{-2}$  molaire, cet optimum de concentration dépendant lui-même de la concentration des électrolytes contenus dans le milieu de culture, ainsi qu'éventuellement de la présence simultanée d'un autre cation bivalent. Ce dernier cas se présente notamment p.ex. pour une association de cations  $Co^{++}$  à la concentration de  $10^{-4}$  molaire et de  $Mg^{++}$  à des concentrations variant entre  $0$  et  $10^{-2}$  molaire, où l'on constate d'après le tableau ci-dessous, que la concentration optimale en  $Mg^{++}$  est 5 fois plus élevée en absence qu'en présence de  $Co^{++}$ .

Unités colilytiques par cm<sup>3</sup> produites à 28°C dans un milieu de culture contenant des cations Co<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup>.

	Concentration Mg <sup>++</sup>	Concentration Co <sup>++</sup>	
		0	10 <sup>-4</sup> molaire
5	-	-	-
	10 <sup>-2</sup> molaire	400 unités/cm <sup>3</sup>	390 unités/cm <sup>3</sup>
	5 x 10 <sup>-3</sup> "	430 "	400 "
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> "	400 "	420 "
	10 <sup>-3</sup> "	280 "	430 "
10	10 <sup>-4</sup> "	240 "	340 "
	0 "	240 "	340 "

15 En ce qui concerne plus particulièrement encore le cobalt, il a été constaté aussi qu'à concentration appropriée, seul, ou en association avec d'autres cations et notamment avec le Mg<sup>++</sup>, il assure une reproductibilité satisfaisante du titre colilytique de l'actinomycétine qui, à 28°C, se situe entre 350 et 450 unités/cm<sup>3</sup> (alors que, dans un milieu exempt de cobalt, le titre obtenu peut varier considérablement et de façon apparemment incontrôlable d'une expérience à l'autre, tout en ne dépassant jamais celui obtenu en présence de Co<sup>++</sup>).

20 La production du principe staphylolytique est freinée par une élévation de la température d'incubation jusqu'à 37°C, mais peut être exaltée, à concentration appropriées, et suivant les conditions expérimentales, par tous les cations précités, sauf par le Ca<sup>++</sup>, soit donc par Fe<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> et Co<sup>++</sup> et, tout comme pour le principe colilytique, la concentration optimale en un cation déterminé, permettant l'obtention d'un titre staphylolytique optimum, dépend d'une part de la concentration totale en électrolytes du milieu de base et de la présence simultanée éventuelle d'autres cations bivalents, d'autre part.

30 Utilisé isolément, le magnésium p.ex. présente un optimum de production entre 250 et 500 x 10<sup>-5</sup> molaire, alors qu'associé avec le cobalt de concentration 10<sup>-4</sup> molaire, il manifeste l'optimum déjà vers la concentration de 100 x 10<sup>-5</sup> molaire.

Unités staphylolytiques par cm<sup>3</sup> produites à 28°C dans un milieu de culture contenant des cations Co<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup>.

	Concentration Mg <sup>++</sup>	Concentration Co <sup>++</sup>	
		0	10 <sup>-4</sup> molaire
35	-	-	-
	0 x 10 <sup>-5</sup> molaire	200	250
	100 "	325	750
40	250 "	800	800
	500 "	800	800
	1000 "	650	800

5 En ce qui concerne le taux de production du principe staphylo-lytique, le cobalt, suivant sa propre concentration et celle d'autres cations éventuellement présents, peut se comporter comme un agent fortement exaltant, ou, au contraire inactif. Quelles que soient, par contre, les conditions expérimentales de référence, un ajustement approprié du milieu en cations  $Mg^{++}$  s'est toujours montré capable d'augmenter fortement le rendement en principe staphylo-lytique et, en association, ou non, avec le cobalt, ce cation permet l'obtention régulière d'actinomycétine titrant entre 750 et 950 unités staphylo-lytiques par  $cm^3$ .

10 Ces données expérimentales montrent l'effet favorable et spécifique que l'incorporation simultanée de cations  $Co^{++}$  et  $Mg^{++}$ , aux milieux de culture, peut exercer sur le taux de production des principes colilytiques et staphylo-lytique.

15 Et en considérant, le rôle joué par ces deux cations dans l'obtention des principes bactériolytiques doués d'une activité lytique normale, on conçoit qu'on ait recours, suivant l'invention à l'incorporation, aux milieux de culture du Streptomyces Albus, G, des deux cations en concentrations et proportions déterminées.

20 A cet effet, le procédé de préparation par incubation, est conduit, p.ex. de la façon suivante :

Une solution nutritive aqueuse, contenant dans 100 litres, p.ex. 1000 gr de peptone, 200 gr de  $NaNO_3$ , 50 gr de KCl et 100 gr de  $K^2HPO_4$  est additionnée de 3 gr de  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  et 75 gr de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

25 Après stérilisation, cette solution,ensemencée au taux de 2%, au moyen d'une culture microbienne agée de 36 à 48 heures, est soumise à l'incubation à la température de 28°C environ pendant 60 à 80 heures, tout en étant aérée et vivement agitée constamment. L'actinomycétine résultant de ce traitement titre couramment 350 à 350 unités colilytiques et 750 à 950 unités staphylo-lytiques par  $cm^3$  (contre p.ex. 240 et 200 unités environ respectivement dans un milieu exempt des cations  $Co^{++}$  et  $Mg^{++}$ ).

30 Ce mode opératoire n'est évidemment pas exclusif ou limitatif et il doit être entendu que les concentrations en cobalt et magnésium ajoutés à titre d'agents promoteurs, peuvent et doivent même varier dans d'assez larges limites, selon les conditions d'aération et d'agitation, et la nature et la concentration de la peptone utilisée, la composition et la concentration des électrolytes de base, etc.

35 Mais quelles que soient, dans des limites raisonnables, les conditions opératoires adoptées, la présence, dans le milieu de culture, de  $Co^{++}$  et  $Mg^{++}$  en proportion et concentrations appropriées, accélère, exalte et stabilise la production des principes colilytique et staphylo-lytique de l'actinomycétine produite.

45 Le cobalt, en assurant l'obtention d'une activité colilytique présentant une cinétique de lyse normale, entrave les effets contraires d'une élévation anormale de la température ou de la présence de traces, soit d'autres cations bivalents, soit de substances quelconques susceptibles d'induire une activité colilytique anormale. Soit seul, soit associé au magnésium, il exalte, en outre, de façon régulière, la production du principe colilytique, ce qui permet la préparation d'actinomycétine de titre colilytique élevé.

50 Le magnésium, en étant, sinon essentiel, tout au moins extrêmement favorable à la production du principe staphylo-lytique, permet de son côté, la préparation d'actinomycétine de titre staphylo-lytique élevé.

Du fait, que, tout au moins partiellement, il peut, sans altération du titre staphylo-lytique, être remplacé par du cobalt, on a la pos-

sibilité, moyennant un ajustement approprié du milieu en cations  $Mg^{++}$  et  $Co^{++}$ , d'assurer, à une température d'incubation de 28°C environ, le meilleur rendement des deux principes bactériolytiques de l'actinomycétine.

R E S U M E.

5 L'invention a pour objet un procédé de préparation d'actino-  
mycétine d'activité bactériolytique, tant colilytique que staphylolytique  
accrue, par culture du *Streptomyces Albus G*, dans un milieu peptoné, aéré  
et agité, de composition saline appropriée, connue en soi, ce procédé étant  
IO caractérisé en ce que, pour effectuer l'incubation, on ajoute au milieu de  
culture des sels de magnésium et de cobalt dont les cations sont bivalents,  
et dont les concentrations se situent, de préférence, entre  $10^{-3}$  et  $10^{-2}$   
molaire pour le magnésium et entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  molaire pour le cobalt.

P. Pon. J.M. GHUYSEN,  
Mandataire : E. FISCHER.