



Les granules du virus tuberculeux aviaire

<https://hdl.handle.net/1874/299634>

Aug. 192. 1901.

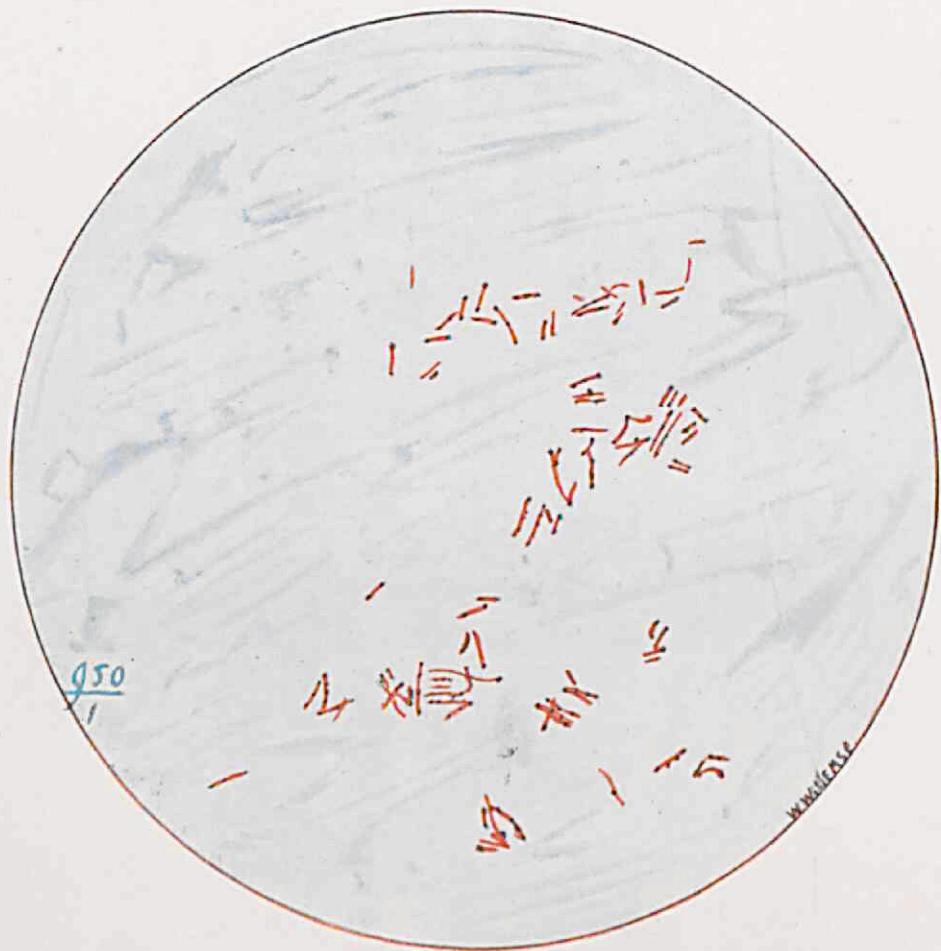
LES GRANULES DU VIRUS TUBERCULEUX AVIAIRE

J. C. H. BROEK

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

s.
cht

LES GRANULES DU VIRUS
TUBERCULEUX AVIAIRE



Culture, obtenue après ensemencement d'une *dizaine de* granules tuberculeux en milieu de BESREDKA—JUPILLE.

Coloration ZIEHL—NEELSEN.

Page 41.

950
mm
ZIEHL-NEELSEN
BESREDKA
JUPILLE

LES GRANULES DU VIRUS TUBERCULEUX AVIAIRE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
JHR. DR. B. C. DE SAVORNIN LOHMAN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER
RECHTSGELEERDHEID VOLGENS BESLUIT
VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FA-
CULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE
VERDEDIGEN OP MAANDAG 22 JUNI 1931
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JULIANA CHRISTINA HENRIETTE BROEK
GEBOREN TE BOVENKARSPERL (N.-H.)

DRUKKERIJ J. VAN BOEKHoven — UTRECHT — 1931

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

Die voorbereiding van die gesprek, dat de voorbereidende vader moet hanteer om voorbereid op belangrijke voorbereiding, houdt mij de voorbereiding, waarlangs vaderschapheid in kinderen moet worden, maar niet teveel vaderschap moet worden te bereiken.

Als voorbereidende voorbereiding moet vaderschap niet Geenweg en Hoogtevelds Oefening, maar een vader moet zichzelf in zijn vaderschap, want dan bereikt hij zijn vaderschap niet "van buiten", maar bereikt hij zijn vaderschap alleen door die vaderschap uit zijn vaderschap te maken, want die vaderschap moet zijn vaderschap en niet alleen een vaderschap.

Als voorbereidende voorbereiding moet vaderschap in die voorbereidende voorbereiding een voorbereidende voorbereiding zijn, en die voorbereidende voorbereiding moet de voorbereidende voorbereiding niet alleen voor de vaderschap, maar ook voor de vaderschap van kinderen, want dan bereikt hij zijn vaderschap niet alleen voor de vaderschap, maar ook voor de vaderschap van kinderen.

Als voorbereidende voorbereiding moet vaderschap in die voorbereidende voorbereiding een voorbereidende voorbereiding zijn, en die voorbereidende voorbereiding moet de voorbereidende voorbereiding niet alleen voor de vaderschap, maar ook voor de vaderschap van kinderen, want dan bereikt hij zijn vaderschap niet alleen voor de vaderschap, maar ook voor de vaderschap van kinderen.

Als voorbereidende voorbereiding moet vaderschap in die voorbereidende voorbereiding een voorbereidende voorbereiding zijn, en die voorbereidende voorbereiding moet de voorbereidende voorbereiding niet alleen voor de vaderschap, maar ook voor de vaderschap van kinderen.

AAN MIJN MOEDER

AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER

De voltooiing van dit proefschrift, dat de formele afsluiting brengt van een veelvuldig en langdurig onderbroken studietijd, biedt mij de gelegenheid, mijn diepe erkentelijkheid te betuigen aan U allen, die mij in staat stelde dit eindpunt te bereiken.

Allereerst geldt mijn dank U beiden, Hooggeleerde DE GRAAFF en Hooggeleerde COHEN, voor het vele wat Gij, als geleerde en als mensch, aan Uw leerlinge hebt gegeven.

Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, Gij waart het, die door Uw levendige colleges mijn belangstelling wekte voor de wereld der microben en mij daarin wegwijs maakte.

Met groote dankbaarheid zie ik terug op den tijd, waarin ik dit onderzoek uitvoerde in dagelijksch contact met U. Niet alleen stondt Gij mij een deel van Uw persoonlijk laboratorium af, mij de beschikking gevend over alle benodigde instrumenten en hulpmiddelen, maar bovendien mocht ik mij al dien tijd in Uw onvermoeide belangstelling verheugen. Ondanks Uw druk-bezette werkkring vondt Gij toch immer tijd, U te verdiepen in de zich gedurende dit onderzoek voordoende problemen, waarin dikwijls Uw kritische en origineele beschouwingswijze licht verschafte.

Dat ik, naast Uw belangstelling, ook Uw warme vriendschap mocht deelachtig worden, heeft deze jaren onvergetelijk voor mij gemaakt.

Hooggeleerde COHEN, diepe dankbaarheid jegens U vervult mij bij de gedachte aan alles, wat Gij voor mij hebt gedaan, in het bijzonder in deze laatste bewogen jaren.

Eerst uitsluitend mijn leermeester, onder wiens leiding het gebied van de physische chemie bijzondere aantrekkelijkheid voor mij verkreeg, toondet Gij U later een vriend, bij wien ik nooit vergeefs om raad kwam vragen. Uw krachtige persoonlijkheid, Uw diepe menschelijkheid zijn mij tot grooten steun geweest in moeilijke tijden.

Met warme genegenheid gedenk ik ook Uw echtgenoote, die tezamen met U mij zooveel aangename uren verschafte.

Hooggeleerde KRUYT, Uw prachtige colleges over Kolloïd-chemie en Phasenleer, waarin Uw scherp verstand zich uitte en Uw sterk-ontwikkelde kritische zin, hebben een onuitwischbare indruk op mij gemaakt. Onvergetelijk blijft mij ook de welwillendheid, waarmee Gij mij steeds tegemoet zijt getreden en de hartelijkheid, mij door Uw echtgenoote bewezen.

Hooggeleerde VAN ROMBURGH, Uw pittige, boeiende colleges over de organische chemie blijven mij steeds een aangename herinnering.

Ook van deze plaats is het mij een behoefte, nogmaals mijn diepe erkentelijkheid te betuigen aan Bestuur en Leden van het Studiefonds Pasteur, die mij in staat stelden, een zoo breede basis te leggen voor mijn vorming als microbioloog.

Hommage respectueux à la Direction de l'Institut Pasteur à Paris pour son accueil bienveillant et sa grande hospitalité.

Monsieur le Professeur LEGROUX, c'est à vous que je dois mon éducation microbiologique et je vous en suis infiniment reconnaissante.

Vos riches connaissances, votre énergie inépuisable et votre esprit de critique m'ont laissé un souvenir ineffaçable.

Zeergeleerde SCHOUTEN, het is dank zij Uw voortreffelijk toestel en Uw micromanipulator-lessen, dat ik het doel van mijn onderzoek bereikte. Dat Gij mij daarbij steeds met raad en daad terzijde stondt, stemt mij tot grote dankbaarheid.

Hooggeleerde HIJMANS VAN DEN BERGH, ten zeerste dank ik U, dat Gij mij tijdens mijn werkzaamheden als Uw

assistente de gelegenheid gaaft, dit proefschrift te beëindigen.

Hooggeleerde OVINK, gaarne betuig ik U mijn dank voor Uw veel-omvattende wijsgeerige colleges, die van groote beteekenis waren voor mijn wetenschappelijke vorming. Ook de Uwe, Zeer geleerde GOEDEWAAGEN, stel ik op hoogen prijs.

Een woord van diepe erkentelijkheid aan hooleeraren, directeuren, assistenten en personeel van de Instituten hier ter stede, die mij op eenigerlei wijze behulpzaam waren, in het bijzonder aan den Heer DE ZEEUW voor zijn voortdurende welwillende hulp bij de dier-experimenten.

Hooggeleerde SCHOORL, U betuig ik mijn dank voor de mij verleende gastvrijheid in Uw Instituut.

Ten zeerste dank ik het personeel van het Pharmaceutisch Laboratorium voor de groote welwillendheid mij betoond, vooral de beide heeren WILLEMSE, die altijd bereid waren, mij te helpen.

Tenslotte de verzekering van mijn oprechte dankbaarheid aan het College van Curatoren en de Wis- en Natuurkundige Faculteit, die mij een Rijks-studiebeurs deden toekomen, wat mijn studie tot het doctoraal examen aanmerkelijk verlichtte.

CHAPITRE I.

INTRODUCTION.

Depuis le 24 mars 1882, date de la découverte par ROBERT KOCH¹⁾ du bacille tuberculeux, un nombre considérable de mémoires ont été publiées sur ce microbe et ses granules.

Les corpuscules réfringents intrabacillaires, signalés déjà par KOCH, sont décrits ensuite par plusieurs auteurs, en particulier par BABES²⁾ (1885), STRAUSS³⁾ (1895) et MUCH⁴⁾ (1908). Pour nos recherches les publications de ce dernier savant ont un intérêt tout spécial, car MUCH s'est occupé surtout des „*granulations Gramophiles*” libres dont il révèle la présence fréquente en cultures, ainsi qu'en certains produits tuberculeux. Pour l'auteur ces granules sont une forme de développement du bacille tuberculeux, capables de reproduire le bâtonnet et doués de virulence.

C'est avec BABES que pour la première fois les *granulations intrabacillaires* ovalaires, observées dans le bacille tuberculeux et aussi dans le bacille lépreux, sont interprétées comme des éléments indépendants et végétatifs; mais cet auteur, pas plus que les autres, ne prouve la réalité de son hypothèse.

Après MUCH c'est surtout FONTÈS⁵⁾ qui, en 1910, attire l'attention sur les granules du virus tuberculeux dans un article qui fut reçu à cette époque avec beaucoup de réserve.

En quelques lignes nous voulons résumer la publication de FONTÈS sur la forme filtrable du bacille tuberculeux, capable d'engendrer la tuberculose chez le cobaye:

Un ganglion caséux est prélevé chez un cobaye inoculé avec un produit tuberculeux humain. Le pus est filtré sur bougie, ce filtrat inoculé aux animaux de laboratoire; ceux-ci présentent une infection légère.

De plus FONTÈS réalise des infections en série, faisant des passages avec les ganglions lymphatiques; il trouve enfin dans le système lymphatique de ces animaux des bacilles typiques acido-résistants, mais en petit nombre.

Cet auteur expliquait le phénomène de la „filtrabilité” du virus tuberculeux en supposant le passage des granules du bacille tuberculeux à travers la bougie.

En 1922, les expériences de FONTÈS ont été reprises et vérifiées, par KIRCHENSTEIN¹⁰¹), puis par VAUDREMER⁶), BEZANÇON⁷), VALTIS⁸), CALMETTE et ses collaborateurs, LUCKSCH⁹), etc.

La plupart de ces expérimentateurs n'ont pas réussi à démontrer la présence de corpuscules visibles dans le filtrat, ou se sont trouvés dans l'impossibilité de discerner entre les granules, provenant du milieu de culture et ceux qui, peut-être, seraient d'origine microbienne.

Cependant l'inoculation de ce filtrat „vide” produit „la tuberculose atypique”, comme CALMETTE a baptisé l'ensemble des phénomènes observés pour la première fois par FONTÈS.

Dans les organes des animaux, inoculés avec le filtrat, CALMETTE et VALTIS, ainsi que plusieurs autres auteurs, signalent toujours la présence de granules alcoolo-acido-résistants ou non.

Remarquons que quelques investigateurs, comme RABINOWITCH¹⁰⁰), VAUDREMER⁶) et LUCKSCH⁹) affirment avoir trouvé des granules dans les filtrats.

C'est ainsi que le problème de la filtrabilité du virus tuberculeux a donné un intérêt nouveau aux recherches sur l'origine et la signification des granules, surtout des granules libres, „granulations Gramophiles de MUCH”.

Dans une série d'expériences que nous voulons décrire en détail, nous nous sommes occupées spécialement des *granules libres du virus tuberculeux aviaire*.

Malgré tout le temps qui y fut consacré, ces expériences ne sont et ne veulent être qu'un début de recherches.

Cependant la conviction que la technique suivie est capable d'apporter un peu de lumière dans le problème dont il s'agit, justifie le fait de publier les résultats, obtenus jusqu'ici, résultats qui ne font qu'agrandir le champ de travail.

CHAPITRE II.

LES STADES DE TRANSITION DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE IN VIVO.

Etude histologique.

Cette partie-ci des recherches fut commencée, il y a quelques années, à Paris sous la direction de Mr. le Professeur LEGROUX, Chef de Service à l'Institut Pasteur.

M. LEGROUX, en étudiant la tuberculose aviaire, avait suivi histologiquement chez le lapin l'évolution de l'infection provoquée par le bacille tuberculeux. Les bacilles se transformaient en granules, puis les bâtonnets réapparaissaient de nouveau et se multipliaient.

L'examen histologique des organes de lapins, injectés avec des bacilles tuberculeux, révèle la présence dans les coupes, colorées d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, de quantités de boules plus ou moins acido-résistantes, et cela surtout dans les premiers jours qui suivent l'infection. Ces corpuscules ($0.1-1\mu$) sont ronds ou allongés et se trouvent aussi bien intra-cellulaires qu'extra-cellulaires.

Quelle est la signification de ces corpuscules?

Quelle est leur origine?

- a. Les dits corpuscules peuvent être *spécifiques des bacilles tuberculeux*. Nous aurions alors affaire à la forme granulaire des bacilles.
- b. Les granulations signalées peuvent être normales ou provenir d'une réaction du protoplasme des cellules, dûe à l'inoculation.

Dans ce cas on pourra les rencontrer dans les coupes d'organes d'animaux non inoculés ou inoculés avec n'importe quel microbe, l'organisme infecté étant sensible au micro-organisme en jeu.

La première hypothèse soulève encore la question suivante: S'agit-il ici des *débris morts* des bacilles inoculés, ou de *bacilles transformés*, plutôt *désintégrés*, à la suite de l'inoculation, *forme végétative*, capable de reproduire le bacille „normal”?

C'est BORREL¹⁰⁾ qui a publié un article sur „l'Etude anatomo-pathologique du processus obtenu par injection veineuse” de bacilles tuberculeux.

Au 2e jour de l'inoculation ce savant signale, dans les „cellules à poussière”, la présence de bacilles ou de leucocytes polynucléaires à différents stades de „destruction”; les planches, jointes à cet article, se rapprochent beaucoup de l'image de nos coupes d'organes. Dans cette étude le sort des „débris bacillaires” n'est pas poursuivi.

En inoculant au lapin, par voie veineuse, une culture virulente de bacilles de la tuberculose aviaire, l'animal meurt en 2 à 3 semaines d'une tuberculose type YERSIN. A l'autopsie comme seul symptôme clinique la rate est hypertrophiée et présente parfois des abcès; on trouve toujours des bacilles tuberculeux dans tous les organes.

Voici les différentes phases de l'évolution de l'animal inoculé.

1°. Réaction intense de l'organisme contre le parasite, lutte dans laquelle l'animal semble d'abord le plus fort; sous l'influence de substances de défense, sécrétées par les cellules, les bacilles sont transformés en partie en corpuscules plus ou moins arrondis qui ont gardé ou non leur acido-résistance (la dimension des corpuscules est de 0.1—1 μ environ).

2°. Par suite des *toxines* toujours présentes dans l'enveloppe ciro-grasseuse des bacilles, la résistance de la cellule attaquée diminue et les bactéries peuvent pulluler. La *transformation* et le *développement des granules* en bacilles „normaux”, amène finalement la mort de l'animal.

Partie expérimentale.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons procédé de la façon suivante:

Une série de lapins fut inoculée par voie veineuse avec 2 cme d'une émulsion dense de bacilles de tuberculose aviaire en eau physiologique.

Pour ces expériences-ci nous nous sommes servis d'une souche très virulente pour le lapin, souche de collection, s'appelant „Aynaud 439” et provenant de volailles d'élevage tuberculeuses.

Les émulsions de bacilles ont été faites en partant de cultures sur pommes de terre glycerinées qui avaient poussé à l'étuve (38° C.) pendant 2 à 4 semaines.

Les lapins inoculés ont été sacrifiés plus ou moins long-temps après l'inoculation; le dernier lapin est mort le 17e jour après l'infection.

Dans cette première série les animaux ont été saignés à la carotide. Tout de suite après la mort, l'autopsie a été faite, la *rate* et le *sommet du poumon gauche* prélevés et fixés dans le liquide de LACASSAGNE ou de BOUIN.

Après l'inoculation par voie veineuse, la circulation sanguine amène d'abord les bacilles au sommet du poumon gauche.

La *rate* a été choisie parce que l'infection cause une grosse réaction tissulaire et que les ferment de cet organe hémopoïétique ont une action considérable sur l'évolution *in vivo* du bacille tuberculeux aviaire.

Le premier lapin fut sacrifié 12 heures après l'inoculation; dans les coupes de *rate*, colorées d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, on ne trouvait que fort peu de bacilles et beaucoup de „boules”, toutes acido-résistantes. Le processus de transformation du bacille tuberculeux dans l'organisme animal s'était donc accompli *moins de 12 heures* après l'injection.

Une nouvelle série de lapins fut inoculée et sacrifiée à différents moments, de 10 minutes jusqu'à 9 heures après l'infection. De ces lapins, tués par élongation de la moelle, on a fixé, outre la rate et les poumons, des fragments de foie, rein, moelle osseuse et le ganglion poplité.

Les témoins suivants furent faits:

- a. *Lapin „neuf”*, pour l'étude comparative des coupes d'organes tuberculeux et celles d'animaux normaux.
- b. Lapins inoculés avec la même émulsion de bacilles, mais après l'avoir chauffée $\frac{1}{2}$ heure à 80° C.; l'ensemencement de ces bactéries fut négatif.
- c. Lapin inoculé avec une culture de *bacilles non acido-résistants*, culture d'Anthracoïdes sur gélose, âgée de 18 heures.
- d. Lapin inoculé avec une souche non-virulente de bacilles tuberculeux (B.C.G.).

Description des Coupes.

Les organes d'une trentaine de lapins ont été prélevés, des coupes ont été faites et colorées d'après plusieurs méthodes.

Après coloration au ZIEHL—NEELSEN une coloration rapide était pratiquée avec une solution assez forte de picroindigo-carmin (30 secondes à 2 minutes). Lavage rapide à l'eau, alcool absolu, xylol, huile de cèdre.

Ces coupes peuvent se décolorer au bout de quelque temps.

De plus la coloration intense des noyaux cellulaires rend plus difficile la recherche des corpuscules signalés. Nous préférions le ZIEHL—NEELSEN simple.

La coloration des coupes d'après MUCH fait apparaître une quantité plus grande de bacilles et de granules. Mais par suite du séjour prolongé de la coupe dans le colorant de MUCH (24 à 48 heures à la température de laboratoire) il peut y avoir formation d'un dépôt plus ou moins grand

du colorant dans le tissus, ce qui rend la recherche des granules difficile ou impossible. Il est possible que ce précipité soit dû à une faute de technique ou à la fixation pratiquée. (Liq. fixateur au sublimé, formule de LACAS-SAGNE ou à l'acide picrique, liq. de BOUIN.)

Finalement on a coloré une série de coupes avec l'hématoxyline (BOERHAAVE).

Dans les recherches ultérieures l'étude histologique de l'infection tuberculeuse a été complètement abandonnée. Nous nous contenterons donc de n'en donner qu'un résumé bref.

Les indications qui suivent le nom de l'organe en question, comme „10 minutes”, „5 jours”, etc. renseignent sur le laps de temps existant entre le moment de l'injection et celui où l'animal a été sacrifié et autopsié, arrêtant ainsi le processus de l'infection à des moments fixes.

Coupes de Rate de Tuberculose aviaire.

Rate, 10 minutes:

Quantité énorme de corpuscules rouges, brunâtres et rouges-violet, isolés aussi bien qu'en amas.

En examinant plusieurs champs microscopiques on ne trouve que quelques rares bacilles tuberculeux.

Rate, 30 minutes:

Grand nombre de corpuscules foncés, arrondis.

Rate, 1 heure:

Quelques rares bacilles ; les corpuscules se trouvent beaucoup plus en amas que dans les coupes précédentes.

Rate, 1 heure ½:

Beaucoup de granules rouges ternes, de dimensions variables, soit en amas, soit alignés par 3 ou 4.

De rares bacilles qui, comme les granules, sont acido-résistants ou non.

Rate, 2 heures:

Quantité considérable de corpuscules, de dimensions très différentes, (des „grains de poussière”); ceux-ci ne sont pas tous acido-résistants.

Entre les rares bacilles il en est qui ont des bouts gonflés, d'autres sont courbés, presque tous très granuleux. Ces formes de transition sont analogues à celles qu'on constate avec les bactéries en contact avec un principe lytique.

Rate, 3 heures:

Plusieurs granules se trouvent à l'intérieur des cellules de la rate.

Rate, 4 heures:

Comme dans la coupe précédente, une partie des corpuscules se trouve à l'intérieur des cellules, tandis que quelques bacilles se trouvent en dehors.

Rate, 6 heures:

Très riche en boules rouges et bleues-foncées.

Rate, 8 heures:

Très riche en granules rouges, fin piqueté rougeâtre.

La plupart des corpuscules se trouvent à l'intérieur des cellules.

Beaucoup de petits grains se trouvent à côté de quelques bacilles qui, très fins, ne sont pas acido-résistants.

Rate, 9 heures:

C'est ici qu'on rencontre aussi des bacilles en amas, quoique rarement.

Rate, 12 heures:

Dans cette coupe on trouve des cellules qui contiennent des corpuscules et de très fins bacilles.

Rate, 24 heures:

La coupe est parsemée de fins corpuscules rouges, à côté de bacilles toujours peu nombreux, non acido-résistants.

Rate, 2 jours:

Beaucoup de corpuscules, grands et petits; de fins bacilles acido-résistants.

Une forme frappante, trouvée quelques fois dans cette coupe-ci comme dans celle de „24 heures” est la suivante:

Boule rouge foncée, allongée pour ainsi dire par un bâtonnet très court, très fin, acido-résistant aussi.

Cette forme en baguette de tambour cassée, nous l'avons rencontrée encore de temps à autre dans des frottis de culture du bacille tuberculeux aviaire.

Il ne s'agit pas ici des formes en massue, décrites par SANDER⁴⁷), NOCARD et ROUX²⁴), KOCH¹), FISCHEL⁴⁶) et d'autres, descriptions concernant toutes des bacilles de longueur normale avec des bouts renflés.

Pour le moment on peut seulement signaler la présence, assez rare du reste, de ces formes dans les dites coupes, en se gardant d'en tirer des conclusions.

Rate, 3 jours:

Une comparaison avec les coupes précédentes ne laisse pas de doute quant à l'augmentation des bacilles qui se trouvent en groupements de 2 ou plus. Il est rare de rencontrer des bacilles isolés.

Plusieurs cellules contiennent et bacilles et granules qui souvent sont extrêmement fins et acido-résistants.

Granules en grande quantité. Les coupes colorées d'après MUCH révèlent des granules (3 ou 4) en dedans des bacilles.

Rate, 5 jours:

Amas importants de bacilles.

Cellules remplies avec des boules et des bacilles de couleur rouge-foncé. Bacilles granuleux.

Rate, 8 jours:

Pullulation de bacilles; amas de bacilles avec, ici et là, des boules acido-résistantes.

En dehors des cellules beaucoup de corpuscules nettement acido-résistants.

Début de formation de cellules géantes, type LANGHANS.

Rate, 11 jours:

Des amas de bacilles avec corpuscules rouges et corpuscules bleus, très souvent se trouvant en dedans des cellules de la rate.

Rate, 14 jours:

Pullulation de bacilles; cellules géantes, bourrées de bacilles.

A côté des nombreux bacilles on observe dans la cellule géante la présence de corpuscules acido-résistants. Sont-ce vraiment des granules?

En tenant compte du fait que toute la cellule est bourrée de bacilles, il est fort logique de supposer que ces „corpuscules”-ci ne soient en réalité que des bacilles coupés.

Par contre pour les corpuscules qu'on trouve dans les coupes qui ne présentent presque pas ou très peu de bacilles, le calcul des probabilités ne permet guère cette superposition.

Soulignons que, même pour les corpuscules signalés dans la cellule géante, notre hypothèse doit forcément rester hypothèse.

Rate, 17 jours:

Bacillose généralisée.

A faible grossissement on peut apprécier le nombre considérable de cellules géantes, tâches rouges dans le tissu de la rate qui montre des foyers nécrotiques.

Coupes de Rate de Lapin normal.

Dans les coupes, colorées au ZIEHL—NEELSEN, comme dans celles de tuberculose aviaire, on rencontre ici et là des petits amas de corpuscules plus ou moins rougeâtres, ramassés dans les cellules ou se trouvant en dehors.

Plusieurs cellules sont colorées diffusément en rouge, et contiennent des corpuscules foncés.

B. Tuberc. aviaire tué ($\frac{1}{2}$ heure à 80° C.).

Rate, 1 jour:

Cellules avec boules d'un rouge-violet, comme chez le lapin normal.

Des corpuscules rouges et foncés, parfois noirâtres.

Beaucoup de „pigment ocre”.

De rares bacilles.

Rate, 5 jours:

Granules rouges et noires, assez nombreux.

Rate, 10 jours:

Cette coupe ne contient presque plus de corps étrangers.

Quelques rares boules acido-résistantes.

Grandes cellules avec grains et boules d'un rouge-violet, comme dans la rate normale.

Bac. Anthracoides.

Rate lapin 10 minutes:

(Toujours la même coloration au ZIEHL—NEELSEN.)

Boules et grains noirs et violets.

Peu de corpuscules rougeâtres (comparer avec la rate normale).

Avant de discuter ces résultats, décrivons encore quelques-unes des coupes du poumon des lapins infectés, sacrifiés dans les premiers jours après l'inoculation.

Coupes de Poumons de tuberculose aviaire.

Poumon, 10 minutes:

Tout d'abord on constate, à part des granules rouges, la présence perpétuelle de bacilles dans le poumon; ce n'est pas qu'on trouve un seul bacille sur plusieurs champs microscopiques qui n'en contiennent pas, comme dans la „rate 10 minutes”, mais chaque partie de la coupe contient des bacilles en petite quantité qui quelquefois se trouvent en dedans des cellules.

En outre on observe les mêmes granules rouges et rouge-violets, décrits pour les coupes de la rate, (voir p. 8).

Poumon, 9 heures:

Des amas de bacilles à signaler. (Comparer avec la description de „rate 9 heures” p. 9).

Plusieurs bacilles se trouvent à l'intérieur des cellules.

Beaucoup de bacilles sont fortement granulés.

Quantité de granules rouges, en amas ou isolés.

Poumon, 12 heures:

Beaucoup de granules acido-résistants.

Bacilles, granuleux en général.

Des corpuscules alignés, foncés, sur corps bacillaire vaguement rouge.

Beaucoup d'amas d'un rouge diffus, composés de bacilles granuleux.

Poumon, 24 heures:

Agglomérats de bacilles, presque tous granuleux, à côté de bacilles homogènes, isolés, acido-résistants.

Poumon, 3 jours:

Bacilles granuleux réunis en petits „foyers”.

Très peu de granules libres.

Poumon, 8 jours:

Pullulation de bacilles acido-résistants.

Formation de cellules géantes.

Presque point de corpuscules rouges.

Bac. Anthracoïdes.

Poumon Lapin 10 minutes:

Beaucoup de corpuscules foncés.

Quelques cellules sont bourrées de bacilles.

Discussion des Coupes.

Comparons d'abord les coupes de rate normale (p. 12) avec celles de lapins, sacrifiés 10 minutes après l'inoculation de bacilles tuberculeux (p. 8).

Dans la rate de l'animal infecté on trouve des cellules, colorées en rouge-pâle et contenant des amas de corpuscules foncés (rougeâtres) qui sont tout à fait comparables avec ce qu'on trouve dans les coupes d'organes (surtout dans les coupes de la rate) du lapin normal.

Il est fort possible que le contenu des cellules décrites soit identique dans les deux cas.

Sont-ce des produits de désintégration des corpuscules du sang? Du „pigment ocre”? De l'hémosidérine?

Je ne saurais y répondre; les histologistes ne sont pas non plus d'accord quant à la signification et l'origine des dits corpuscules.

Cependant une étude approfondie et comparative, après coloration au ZIEHL—NEELSEN, des coupes d'organes tuberculeux avec celles provenant d'animaux sains, fait découvrir une différence, minime mais réelle, entre les corpuscules plus ou moins rougeâtres, dits normaux, et ceux qui doivent être dûs à l'infection.

Car, tandis que les premiers se trouvent dans des cellules, colorées souvent entièrement en rose ou en rouge-

violacé, et sont ternes et plus ou moins foncés de couleur, les derniers sont réfringents, rouges à la lumière transparente, arrondis ou un peu allongés, avec des contours nets, aussi bien dans les cellules qu'en dehors, isolés ou en petits amas de 3, 4 ou plus.

C'est ainsi que nous sommes portées à croire que les granules, signalés dans les coupes en grande abondance, surtout dans les premiers jours qui suivent l'inoculation, dérivent des bacilles tuberculeux.

Nous ne les croyons pas dûs à l'inoculation d'une bactérie en général, car les coupes d'animaux, injectés avec le Bac. anthracoides, (p. 12 et p. 14) ne présentent point ces granules plus ou moins acido-résistants.

Nos expériences avec des bacilles de tuberculose aviaire tués (chauffage d'une demi-heure à 80° C. p. 12). nous font rejeter la supposition que ces corpuscules sont des débris bacillaires morts, des formes de désintégration des bacilles, sans aucune signification pour le processus de la maladie.

Ce sont des produits de „transformation” des bacilles, capables de régénérer des bacilles normaux.

Est-ce que les coupes sont à l'appui de cette théorie?

Coupes de Rate.

1) Tout de suite après l'inoculation jusques et y compris le second jour, on trouve dans les coupes une grande quantité de granules plus ou moins rouges et très peu de bacilles.

2) Du 3^{me} au 8^{me} jour le nombre des bacilles augmente; les granules sont toujours présents, mais moins abondants.

3) A partir du 8^{me} jour on observe la pullulation des bacilles, d'abord au milieu des amas de corpuscules, plus tard on ne les trouve que dans la cellule géante, ou leur forme réelle en grains n'est même pas certaine.

Tout ceci concorde assez bien avec notre hypothèse. Cependant, l'examen des coupes de poumon vient compliquer le problème.

Le poumon agit en tamis ; il contient des bacilles de suite après l'inoculation. L'infection pourrait donc se répandre dans l'organisme en partant du poumon comme foyer, par simple multiplication des bacilles. Cette interprétation de l'infection n'explique nullement ni l'origine, ni la signification des granules plus ou moins acido-résistants des organes ; et même pourrait mettre en jeu toute la signification des granules.

Un autre facteur complique le problème, c'est la „sensibilité individuelle du lapin” pour le bacille tuberculeux.

Cette sensibilité, différente de lapin à lapin, nous empêche de considérer toutes ces coupes de rate comme des images des phases successives de l'infection tuberculeuse chez le lapin.

Pour cela il faudrait pouvoir suivre le sort du bacille tuberculeux dans le même organisme aux différents instants.

Suivant la technique de PFEIFFER un peu modifiée nous avons essayé de produire une „transformation” du bacille tuberculeux en granules dans le péritoine du cobaye sain.

Pour cela nous avons injecté dans le péritoine des quantités variables d'émulsions de bacilles tuberculeux et du sérum d'un lapin infecté avec les mêmes bacilles 14 jours auparavant.

Le liquide péritonéal, obtenu par ponction à certaines intervalles de temps après l'injection, devait nous renseigner sur le sort des bacilles dans le corps de l'animal ; dans ce but des frottis du liquide furent colorés d'après la technique de ZIEHL—NEELSEN.

Le résultat de cette expérience fut décevant.

On avait espéré trouver des leucocytes qui contiendraient, à côté des bacilles, des „granules” acido-résistants

ou non, les deux phases dans la même cellule. Il n'en était rien.

Les bacilles étaient peu phagocytés et on ne trouvait qu'une quantité infime de granules rouges.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, ces expériences n'ont pas été faites avec des bacilles et du sérum anti, comme dans le phénomène classique de PFEIFFER.

Nous avons commencé à préparer du sérum anti-tuberculeux sur le cobaye et sur le lapin. En attendant nous avons répété plusieurs fois l'expérience décrite ci-dessus — toujours sans aucun résultat.

C'est ce résultat complètement négatif qui nous a portées à cette époque-là à abandonner ces essais de „transformation” *in vivo* — à tort, comme l'ont prouvé des expériences ultérieures et des plus satisfaisantes. C'est dans un autre chapitre que nous parlerons de ces derniers résultats.

Ces expériences de „transformation” dans le péritoine du cobaye ne nous avançant point, il ne nous restait, pour étudier le sort du bacille tuberculeux dans le corps animal, qu'un retour aux coupes décrites.

Il n'est pas possible de tirer une conclusion sur la signification des granules en se basant sur les observations, faites dans les coupes, et sur elles seules; il y a trop de sources d'erreur dans l'interprétation des coupes, trop de facteurs inconnus dans l'évolution de la maladie dans l'animal infecté, pour qu'il soit possible de s'appuyer avec force et exclusivement sur ces faibles données.

En outre, comment jamais prouver le rapport de cause à effet entre les granules qu'on observe sur une lame et les bacilles, trouvés sur l'autre?

On pourrait tenter de suivre le sort du bacille — c.à.d. d'un seul bacille — sous le microscope en ensemencant des bacilles tuberculeux dans une culture de tissus. Si l'on pouvait même observer la dite transformation et régéné-

ration du bacille, en passant par le stade granuleux, ce résultat très important, très intéressant, ne prouverait rien pour ce qui est de l'animal infecté.

On aurait seulement le droit de comparer ce qui se passe *in vitro* à ce que l'on suppose *in vivo* et de penser ainsi à une analogie.

Le problème de l'identité de ces deux phénomènes ne peut être résolu *in vitro*.

Aussi avons-nous suspendu ces recherches pour quelque temps.

Cependant la question de la forme granulaire du bacille tuberculeux nous intéressant, nous avons cherché les preuves certaines de sa réalisation en abordant le sujet d'un côté tout différent, et cette fois-ci avec plus de succès.

CHAPITRE III.

LES STADES DE TRANSITION IN VITRO DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE.

Pour prouver le passage de bacille en granules et vice versa, il s'agit de voir se développer, en culture et dans l'organisme, des granules en partant d'un seul bacille ou de quelques bacilles; et d'autre part il faut arriver à une culture de bacilles, *in vitro* et *in vivo*, en partant d'un unique granule ou de quelques granules.

Nous nous sommes servies de la technique de SCHOUTEN¹¹⁾ pour la culture unicellulaire, réalisée en 1899 par son micromanipulateur qui à cette époque introduisait un élément nouveau et très important dans les études biologiques et microbiologiques, permettant l'isolation des êtres microscopiques, individus par individus.

Description de l'Appareil.

L'appareil est composé de deux statifs, montés sur une plaque de fer; entre ces deux statifs, porteurs d'instruments (voir fig. 1), on place le microscope qui n'est pas fixé sur le pied de l'appareil, ce qui permet d'exécuter des petits déplacements pendant le travail.

C'est à l'aide d'instruments en verre — anses, pointes ou micro-bistouris — que l'on peut arriver facilement à isoler, percer ou couper sous le microscope toutes sortes de micro-organismes.

Le mouvement dans les 3 directions de l'espace est assuré par trois vis (fig. 2: A, B et C) et le ressort courbe K.

C'est ainsi qu'avec l'aiguille, fixée dans le porte-instrument M avec un peu d'argile plastique, on peut obtenir les déplacements que voici:

- 1) Par la vis A des mouvements d'avant ou en arrière dans le plan horizontal.
- 2) Par les vis B et C des mouvements dans le plan vertical.

Les petits mouvements brusques peuvent être exécutés dans le plan vertical avec l'instrument d'isolement. Ce mouvement est commandé par le cylindre F qui permet de soulever la tige L ou de la faire descendre; dans le premier cas l'extrémité de l'aiguille descend brusquement, dans le dernier elle monte et revient en place.

On se sert de cette technique pour isoler des protozoaires qu'on enlève par une descente rapide de l'anse dans la goutte de milieu où ils se trouvent.

De même on se sert de ces mouvements brusques pour rincer les instruments usagés dans une goutte de liquide stérile.

Toutes les manipulations sont accomplies en goutte pendante, dans une „chambre humide” — chambre d'isolement — placée sur la platine mobile du microscope.

Le diamètre intérieur de la chambre d'isolement (14×14 mm) est un peu inférieur à celui de la lamelle qui porte les gouttes pendantes (18×18 mm).

La paroi antérieure et la paroi postérieure, parallèles à l'axe de l'aiguille, sont formées par des cubes de verre, hauts de 3 mm et collés sur la lame porte-objet qui forme la base de la chambre.

Ces deux cubes de verre que sépare une distance de 14 mm, sont reliés entre eux par deux bandes de mica, posées sur ces deux parois de verre; une cuve est ainsi formée (14×14 mm).

Par les ouvertures, réalisées ainsi sous les deux bandes

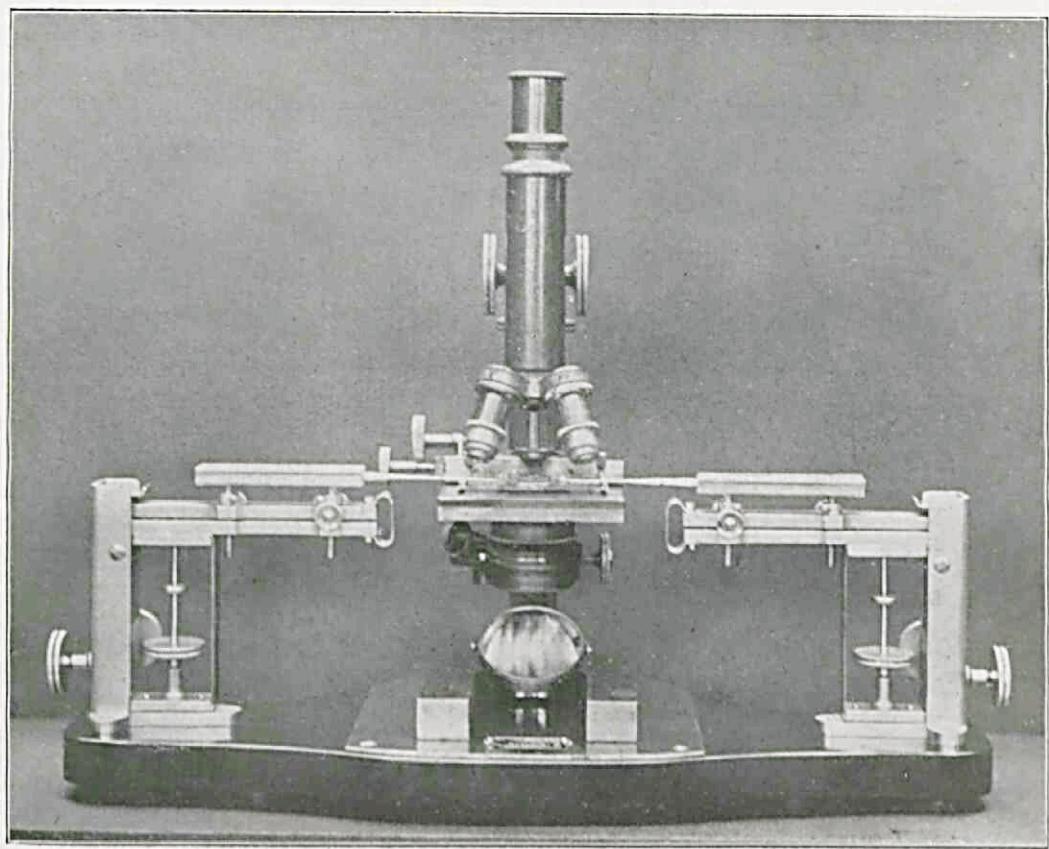


Fig. 1.

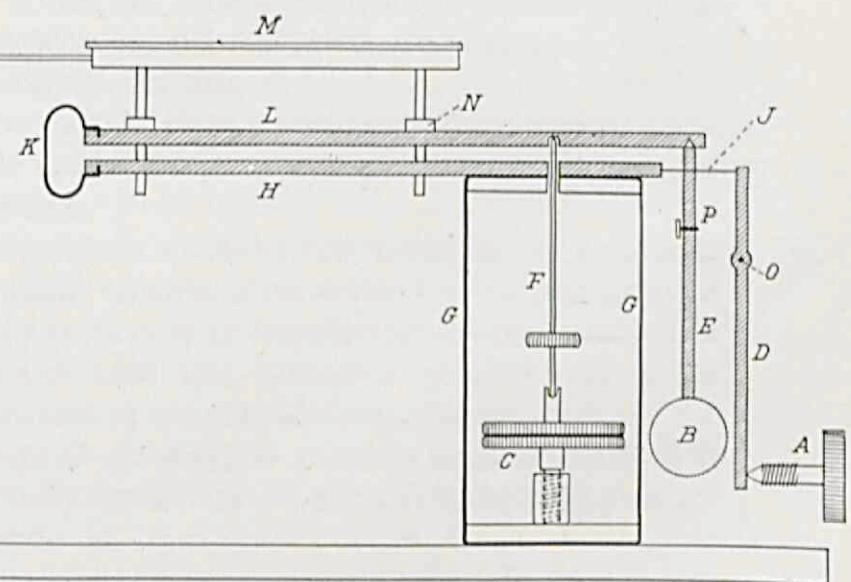


Fig. 2.

de mica, on peut introduire, à gauche et à droite, les instruments choisis pour l'isolement.

Dès que l'instrumentation est en place, les ouvertures latérales sont fermées avec une goutte d'une graisse demi-fluide (— mélange d'huile de paraffine et de vaseline —) qu'on introduit, de chaque côté, entre la bande de mica et la base de la chambre; les deux parois latérales demi-solides permettent le déplacement des instruments, tout en isolant l'intérieur de la chambre de l'atmosphère ambiante.

Pour former le toit de la cuve, limitée en avant et en arrière par les cubes de verre, latéralement par les parois demi-solides, on dépose la lamelle, préparée d'avance, pourvue de gouttes pendantes et dont les bords sont enduits d'une mince couche de graisse.

La micromanipulation des bacilles tuberculeux et des granules est suivie avec l'immersion à l'huile (1/16) et l'oculaire No. III, système optique dont la puissance est de 950 X.

La préparation de la lamelle comprend plusieurs temps:

a) En général on commence par graisser très légèrement la lamelle en frottant sa surface avec une quantité minime de trilaurine. Grâce à cette précaution on peut déposer contre la lamelle des gouttes pendantes très serrées; elles ne confluent pas.

L'obtention de très fines gouttelettes d'eau, égales entre elles est très facile: De la vapeur d'eau est condensée sur la lamelle grasse.

Nos isolements de granules ont toujours été pratiqués sur des éléments vivants, noncolorés (— comme tous les isolements du reste —), la lamelle n'étant pas enduite de graisse, évitant ainsi une confusion possible entre les particules grasses et les granules microbiens.

b) La lamelle est essuyée avec un linge très fin afin d'enlever l'exces de graisse, puis stérilisée par passage dans la flamme.

c) La lamelle stérilisée est placée, face grasse en bas, sur une épaisse plaque métallique, limitant une ouverture rectangulaire de même dimension que celle de la chambre humide et qu'on peut fermer et ouvrir rapidement au moyen d'un morceau de verre, collé au dessous de la plaque métallique.

C'est par l'ouverture inférieure qu'on dépose aseptiquement les gouttes pendantes sur la surface grasse de la lamelle:

Une goutte contenant le matériel dont on veut faire l'isolement, des gouttes de liquide stérile pour rincer les instruments, des gouttes de milieu de culture qui vont recevoir les micro-organismes isolés pour les essais de culture, etc.

C'est à ce moment-là que les instruments nécessaires pour la micromanipulation sont choisis et stérilisés avant d'être fixés sur l'appareil.

Sauf pour des manipulations très grossières ou préparatoires, où l'on peut se servir d'une anse en platine de 100μ de diamètre, on emploie des instruments en verre qui ne supportent pas la stérilisation à la flamme. Pour ceux-ci on procède de la manière suivante:

L'aiguille est passée dans l'éther pour enlever la graisse; puis dans l'acide sulfurique concentré, l'ammoniaque concentrée et finalement dans de l'eau physiologique stérile.

En quelques secondes l'instrument stérile est introduit dans la chambre d'isolement et mis au centre du champ microscopique (à faible grossissement). La lamelle préparée est collée sur la face supérieure des parois de la chambre d'isolement, les ouvertures latérales sont fermées avec le mélange demi-solide. L'appareil est prêt à fonctionner.

Pour nos recherches nous avons employé six instruments différents que nous voulons rapidement passer en revue:

1) Une anse en verre elliptique, ayant un diamètre intérieur de $8 \times 16\mu$, avec laquelle on effectue l'isolement

des bactéries; en touchant la lamelle avec l'extrémité de l'anse, contenant le micro-organisme isolé dans un peu de liquide et en descendant l'instrument aussitôt après, le contenu de l'anse reste en gouttelette fine contre la lamelle.

2) Une anse en verre plus grosse, d'un diamètre intérieur de 70μ .

Pour nos recherches nous nous sommes servis de cette anse pour répandre le contenu de la goutte avec le matériel à isoler (bacilles ou granules) en longues stries sur la lamelle, afin de faciliter l'isolement. En pratiquant ainsi les différents objets à prélever sont à de grandes distances les uns des autres, ce qui permet d'isoler, avec une certitude parfaite, un seul objet à la fois.

Après cette opération les corps microbiens se trouvent collés contre le verre, entourés d'une quantité minime d'eau de condensation; grâce à ce détail de technique on ne risque pas d'être victime de l'illusion optique, très fréquente en grosses gouttes pendantes et qui consiste à prendre pour un granule ce qui est en réalité un bacille, dont l'axe est perpendiculaire à la surface de la lamelle.

De même nous avons suivi cette technique pour préparer notre champ de travail pour la microdissection des bacilles.

3) Une pointe en verre longue et fine de $\frac{1}{2}-1\mu$ de diamètre.

Elle servira pour isoler des bacilles en plaçant la pointe entre lamelle et bacille; le bacille reste collé, par adhésion, contre la pointe et peut être transporté là, où l'on désire l'avoir.

4) Une pointe en verre plus grosse, dont l'extrémité seule a un μ de diamètre, ce qui la rend beaucoup moins fragile que la pointe No. 3.

Cette pointe est un instrument très précieux. Elle sert à transporter aux bords des gouttes de milieu de culture les bacilles isolés par l'anse No. 1 et déposés par celle-ci près de ces gouttes.

Pour nos expériences cette pointe nous a rendu des services importants pendant l'isolement des granules du bacille tuberculeux:

Sur la lamelle préparée on a déposé quelques gouttes de macération de viande peptonée gélatinée. Avec la pointe No. 4 on pénètre dans cette goutte de gélatine et en prélève une petite parcelle à l'extrémité de la pointe.

A l'aide de la gélatine on arrive à isoler un seul granule ou plusieurs granules à la fois, en pressant légèrement la gouttelette de gélatine contre l'objet choisi qui, restant collé sur la pointe, peut être transporté là, où l'on veut l'avoir.

5) Une anse en platine, notre plus gros instrument, est constituée par un fil de 0.1 mm d'épaisseur; le diamètre intérieur de l'anse est 0.1 mm.

Ce n'est que rarement que nous nous sommes servies de cette anse, trop grosse pour la micromanipulation des objets dont il s'agit ici.

De plus nous avons constaté à plusieurs reprises l'influence nuisible du platine sur certains micro-organismes.

Les protozoaires, isolés à l'aide de l'anse de platine, perdent leur mobilité et meurent bientôt. Ajoutons tout de suite que le Docteur SCHOUTEN avait remarqué ces faits au début de ses expériences et construit pour cette raison l'anse en verre No. 2 qui sert à l'isolement des protozoaires.

Afin d'éviter l'action oligodynamique que nous croyons très importante dans le traitement individuel des micro-organismes, nous ne nous sommes servies que bien rarement de l'anse de platine.

6) Un micro-bistouri en verre; le tranchant polygonal est obtenu par refroidissement brusque d'un très fin fil de verre.

Le contour tranchant de cet éclat de verre sert comme instrument de microdissection, pour couper les bactéries, les hyphes de champignons, les cellules, etc.

Tous ces instruments peuvent servir des années de suite et ceci est un grand avantage du micromanipulateur de SCHOUTEN en comparaison des micromanipulateurs, construits par la suite et qui nécessitent des pipettes qu'il faut remplacer à chaque expérience.

Technique d'Ensemencement.

Avec les objets obtenus et isolés au moyen des instruments décrits, on a tenté des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Pour les essais de culture *in vitro* nous nous sommes servies de deux techniques différentes :

- a) Culture sur lamelle, en goutte pendante (technique de SCHOUTEN).
- b) Culture en milieu nutritif, réparti en tubes.
- a) Culture sur lamelle.

Pour les cultures en goutte pendante on procède de la façon suivante :

Sur la lamelle, contenant le matériel dont on veut isoler des bacilles ou des granules, on dépose des gouttes de différents milieux de culture, dans lesquels on veut tenter de cultiver le micro-organisme en question.

L'objet, isolé avec l'anse en verre ou avec la pointe No. 4 (p. 23) est déposé à l'aide de ces instruments tout près d'une goutte du milieu de culture de choix.

Puis, avec la grosse pointe en verre, l'objet est traîné doucement jusqu'au bord de la goutte du milieu nutritif.

Dans la plupart des cas nous avons déposé six gouttes de milieu nutritif sur la lamelle, ce qui permet de tenter six essais de culture à la fois.

L'isolement terminé, la lamelle est enlevée de la chambre d'isolement, mise comme couvercle sur les parois d'une petite chambre humide et portée à l'étuve (38—39° C.).

La chambre humide ou „chambre de culture” est constituée par un rectangle métallique qui, déposé sur une

lame porte-objet, forme une cuve dont le diamètre est de 14 mm.

Ce rectangle métallique est fixé sur la lame porte-objet au moyen de cire à cacheter. C'est avec un peu de vaseline que la lamelle, portant les gouttes pendantes avec les objets à cultiver, est collée sur la face supérieure des 4 parois de la chambre.

Une gouttelette d'eau est déposée sur le fond de la chambre, pour éviter la dessiccation des gouttes de culture.

Pour empêcher le décollement de la lamelle par la vaporisation de l'eau à l'étuve à 38° C., SCHOUTEN a muni sa chambre humide d'une valve de sûreté; une petite ouverture, pratiquée à la base d'un des parois métalliques, est fermée par une gouttelette d'huile. Grâce à ce „tampon mobile” il y a un réglage automatique du volume de la chambre.

C'est avec l'objectif à immersion que l'on peut suivre le développement de ces cultures unicellulaires en plaçant la chambre humide sur la platine mobile.

La température relativement élevée, favorable au développement des bacilles aviaires, s'est montrée très désavantageuse pour les essais de culture en gouttes pendantes.

La culture du bacille tuberculeux étant très lente, ces chambres humides doivent être conservées plusieurs semaines de suite à l'étuve à 38° C.; elles risquent ainsi de perdre par dessiccation plusieurs gouttes ensemencées ou même la totalité.

Plusieurs essais de culture ont été rendus ainsi sans valeur.

b) Culture en milieu nutritif réparti en tubes.

Pour les raisons indiquées nous avons préféré tenter des cultures en tube.

Les cellules isolées (granules, bacilles ou fragments de bacilles) sont enlevées de la lamelle au moyen de la grosse pointe de verre, munie à son extrémité d'une petite boule de gélatine (voir p. 24).

Puis la lamelle est remplacée par une autre lamelle stérile, pourvue d'une grosse goutte pendante de gélatine. La pointe de verre est remontée, porteuse de l'élément isolé, jusqu'à la surface inférieure de la goutte de gélatine où l'on nettoie l'extrémité de la pointe.

A ce moment la manipulation devient plus aisée, au moyen d'une petite spatule de platine aux bords tranchants ; insinuée entre la lamelle et la base de la goutte de gélatine, on transporte celle-ci avec tout ce qu'elle contient dans un tube de culture ou dans l'animal.

ETUDE DE LA CULTURE.

Nous avons isolé et déposé dans un milieu nutritif des séries d'un seul bacille et de quelques bacilles, aussi bien que d'un granule et de quelques granules.

Transition du Bacille en Granules.

L'isolement des bacilles tuberculeux aviaires a été effectué le plus souvent à partir de cultures pures en milieu nutritif ; quelques-uns ont été pratiqués en partant de produits tuberculeux, émulsions d'organes de lapins tuberculeux, crachats, etc. Car la micromanipulation permet l'isolement non seulement d'une unité bactérienne dans une culture pure, mais aussi la séparation rapide d'une bactérie dans un produit souillé.

Un article de KAHN et TORREY¹²⁾, deux expérimentateurs américains, parut au début de nos expériences ; ils avaient étudié la transition du bacille en granules, évolution observée en culture unicellulaire (appareil de Chambers) pour le bacille tuberculeux humain.

Au bout de 3 jours environ, ils constataient la décom-

position du bacille en 4 corpuscules ovalaires alcoolo-acido résistants; puis de nouveau il y avait segmentation de ces fragments, processus donnant naissance à des formes diplococciques (0.1 à 0.4 μ) qui à leur tour se dissolvaient en corpuscules encore plus petits, plus ou moins arrondis, toujours non acido-résistants.

Ces granules ne représentaient pas encore la phase terminale de la désintégration du bacille, car ils donnaient naissance à des „grains de poussière” à la limite de la visibilité.

Nous avons, nous aussi, observé en culture et *in vivo*, la transition du bacille tuberculeux aviaire en granules, et cela microscopiquement et macroscopiquement.

Une culture unibacillaire en goutte pendante (bouillon de viande glyceriné, milieu de BESREDKA—JUPILLE, etc.) nous a fait apprécier, au bout de quelques jours, l'apparition de plusieurs lignes de segmentation transversale dans le corps bacillaire.

Nous n'avons pas réussi à suivre la désintégration complète du bacille, comme elle a été décrite par KAHN et TORREY, sauf dans un seul cas assez curieux pour le mentionner.

Il s'agissait d'un bacille qui, après isolement avait été ensemencé au bord d'une goutte pendante de gélatine au bouillon de viande.

Quatre jours après l'ensemencement on constate la présence de deux granules polaires. Dans les premiers jours suivants, l'aspect du bacille reste le même; puis le bacille disparaît. Quelques semaines après, l'examen microscopique de la goutte de gélatine révèle la présence d'une masse de granules fins et réfringents; à l'aide de la micro-pointe on peut apprécier la consistance glaireuse de cette masse. Les essais de culture en partant de ces corpuscules réfringents n'ont pas abouti; il est impossible d'en tirer de conclusions.

Signalons toutefois en rapport avec cette observation, que très souvent en examinant à l'objectif à immersion (1/16) des frottis de cultures jeunes de bacilles tuberculeux dans une source de lumière électrique très forte (150 bougies), nous avons retrouvé ces masses réfringentes, glaireuses; en les manipulant sous le microscope, avec la pointe en verre, nous avons constaté qu'elles renfermaient des granules de dimensions variables, ainsi que d'extrêmement fins bâtonnets.

Les mêmes observations ont été faites pour des cultures très jeunes du Bacille du Colon.

Toutes ces remarques n'apportent qu'un certain appui à l'hypothèse de la désintégration bacillaire.

Il en est tout autrement des constatations suivantes:

Ayantensemencé un seul bacille tuberculeux aviaire dans le milieu de BESREDKA—JUPILLE, nous avons obtenu une culture abondante à partir du dixième jour; les passages de cette culture sur différents milieux ont toujours donné des cultures riches, dans lesquelles, à côté des bacilles d'aspect normaux, on a trouvé régulièrement des granules (coloration des frottis par la méthode de FONTÈS).

Ces granules ne peuvent être que d'origine bacillaire.

Cette expérience refute l'opinion de certains auteurs pour lesquels les granules libres dans les cultures de bacilles tuberculeux ne seraient que des souillures, des formes symbiotiques de ce bacille.

On a pu noter la décomposition des bacilles en granules dans la lyse expérimentale en péritoine de lapin, expérience dont nous parlerons plus loin.

EVOLUTION DE GRANULES EN BACILLES.

Les granules proviennent:

- A) D'isolement en partant de cultures suffisamment riches en granules.

B) De microdissection de bacilles granuleux.

C) De la lyse des bacilles dans l'organisme animal.

Ces trois séries d'expériences seront décrites et discutées successivement.

ad A. **Granules de Cultures.**

Il est assez rare de tomber sur des cultures du bacille tuberculeux aviaire qui ne renferment point de granules libres, mais beaucoup d'entre elles sont très pauvres en corps granulaires, de sorte qu'elles ne conviennent pas pour l'isolement de ces éléments avec le micromanipulateur; trop de temps serait perdu à les rechercher.

Nous avons cherché quels étaient les milieux les plus favorables à la formation des granules. La quantité de granules libres dans les différents milieux a été appréciée après coloration des frottis selon les méthodes de ZIEHL—NEELSEN, de FONTÈS et de GRAM—MUCH.

Cette étude a décelé la présence très fréquente de granules Gramophiles dans les cultures suivantes de tuberculose aviaire:

- a) Voiles jeunes sur milieu de SAUTON (7—16 jours à 38° C.).
- b) Cultures plus ou moins âgées sur milieu de LUBENAU (21 jours; 1, 2, 6 mois).
- c) Cultures plus ou moins âgées sur milieu de PÉTRAGNANI¹³) (18 jours; 1—10 mois).
- d) Cultures sur pomme de terre glycerinée alcaline ($p_H = 7.6$; glycerinée à 4 p. 100).
- e) Les granules sont plus nombreux encore sur pomme de terre glycerinée acide ($p_H = 6.6$); remarquons que le type aviaire pousse plus rapidement et, au début, plus richement sur pomme de terre acide que sur celle qui est légèrement alcaline.
- f) Cultures en bouillon simple acide ($p_H = 6.6$; à 50

cent. cube de bouillon de viande on ajoute dix gouttes d'une solution d'acide lactique à 1 p. 100).

Les granules sont surtout nombreux après un séjour à l'étuve à 45° C. Dans ces cultures on trouve, à part des granules et des bâtonnets normaux, des formes géantes granuleuses et des formes ramifiées.

g) Cultures en bouillon glyceriné alcalin ($p_H = 7.6$) ou acide ($p_H = 6.6$; 2 p. 100 de glycérine).

h) Cultures en bouillon simple, additionné de 0.15 p. 1000 de bichromate de potassium.

i) Cultures en milieu de BESREDKA—JUPILLE, âgées de 2 à 4 semaines.

(Ce n'est qu'au début que nous avons effectué des isolements en partant de telles cultures; puis nous les avons abandonnées, le milieu n'étant pas limpide et contenant de nombreux corpuscules qui masquent la forme granulaire du bacille tuberculeux à isoler.)

k) Cultures en bouillon de foie, après un séjour de 8—14 jours à 38° C.

Expériences.

1) Les granules isolés de différentes cultures du bacille tuberculeux aviaire ont été ensemencés au début des expériences en goutte pendante et cultivés en chambre humide (voir p. 25) à 38° C.

Sur de nombreuses expériences, une seule a réussi; nous voulons la décrire en détail:

Avec la grosse pointe de verre (No. 4) nous avons isolé selon la technique, exposée page 24, plusieurs granules en partant d'une culture de tuberculose aviaire de 14 jours en milieu de BESREDKA—JUPILLE.

Ces granules ont été ensemencés sur la même lamelle dans des gouttes de gélatine au bouillon de viande et dans des gouttes de milieu de BESREDKA—JUPILLE, additionné de gélatine (12 %).

Au bout de 3 semaines à 38° C., on a pu constater une culture granuleuse dans une goutte de gélatine au bouillon de viande, ensemencée avec quelques granules. Ayant prélevé des particules de cette masse granuleuse, nous les avons ensemencés dans des tubes de bouillon de viande et en milieu de BESREDKA—JUPILLE.

Après une semaine de séjour à l'étuve (38° C.), l'examen microscopique des tubes ensemencés — frottis, colorés d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN — a démontré la présence de bâtonnets et de granules alcoolo-acido-résistants.

Malheureusement une absence forcée de plusieurs mois a interrompu cette série d'expériences par dessiccation et perte des tubes ensemencés. Néanmoins nous avons pu constater avec la culture en goutte pendant la *transition de granules en bacilles acido-résistants*.

2) Notre attention étant attirée par la technique de WRIGHT¹⁴⁾, culture du bacille tuberculeux en goutte pendante de sang, nous l'avons essayée.

Plusieurs gouttes pendantes de sang — sang humain, sang de lapin — ont été ensemencées, en chambre humide, à 38° C. Jamais nous n'avons obtenu de culture.

3) Pour les raisons, indiquées au début de ce chapitre, nous avons préféré tenter la culture de granules en tubes de milieu nutritif.

Nous servant toujours de la goutte de gélatine comme moyen de transport, des granules ont été ensemencés et cultivés à 38° C. dans les milieux suivants:

Bouillon glyceriné alcalin.

“ “ acide.

“ simple alcalin.

“ “ acide.

Pomme de terre glycerinée alcaline.

“ “ “ acide.

Gélose glycerinée alcaline.

Eau peptonée glycerinée (à 4 p. 100).

Lait glyceriné (à 4 p. 100).

Milieu de PéTRAGNANI.

„ „ BESREDKA—JUPILLE.

„ „ BESREDKA—CALMETTE—VALTIS¹⁵).

„ „ SAUTON.

L'examen des tubes a eu lieu :

- à l'état vivant (goutte pendante).
- à l'état vivant, après coloration vitale au bleu de NIL (sulfate).
- après fixation et coloration selon les méthodes de ZIEHL—NEELSEN, de FONTÈS ou de GRAM—MUCH.

Résultats: Dans plusieurs des tubes ensemencés nous avons pu constater un départ de culture, donc *transition des granules en bacilles*.

La dite observation a été faite dans des tubes de différents milieux: Bouillon glyceriné alcalin; pomme de terre glycerinée alcaline; lait glyceriné; milieu de BESREDKA—CALMETTE—VALTIS.

Le nombre de granules ensemencés dans ces tubes a toujours été très petit, variant d'un seul granule jusqu'à 5 granules.

Dans la plupart des cas on pouvait apprécier un départ de culture 6 à 12 jours après l'ensemencement, se traduisant par un dépôt grumeleux, floconneux au fond du tube et, très souvent, un trouble très léger dans le liquide surnageant; dans certains cas ce trouble montait du fond du tube le long des parois. — Notons ici que sur la paroi d'un de ces tubes, recouverte de „grains de poussière”, on voyait apparaître au bout de quelques semaines des tâches rondes, vides, nettement contournées, comme on peut voir dans le phénomène de lyse. —

Les tubes ensemencés n'ont donné qu'un début de culture, sans qu'il y ait jamais passage de cet état de culture embryonnaire jusqu'à des cultures normalement riches.

Très souvent la coloration vitale au bleu de NIL a déjà décelé la présence de très fins bâtonnets dans les tubes ensemencés, au moment où la coloration d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN ne donnait pas encore un résultat positif.

Pour cette coloration nous avons suivi la technique de HOLLANDE et Mlle CREMIEUX¹⁶⁾ que voici :

Sur une lame porte-objet on mélange une goutte de culture avec une goutte d'une solution de sulfate de bleu de NIL à 0.2 p. 100, laissant ce mélange au contact de l'air pendant 1 minute. La goutte est ensuite recouverte d'une lamelle et examinée sous le microscope.

Une telle coloration fait apparaître les bacilles non-colorés avec un contenu granuleux bleu-pâle ou bleu-foncé; d'autres ne présentent pas de contenu coloré mais l'enveloppe est d'un bleu-pâle. — Les granules sont d'un bleu-pâle ou d'un bleu-foncé. —

La culture sur pomme de terre glycerinée alcaline, ensemencée avec 5 granules de tuberculose aviaire, n'a donné qu'une culture microscopique.

Dans les frottis, faits avec la surface du milieu et colorés d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, on a trouvé après un mois de séjour à l'étuve plusieurs amas de bâtonnets alcoolo-acido-résistants, ainsi que des bacilles rouges isolés, très souvent situés sur un fond bleu de „grains de poussière” qui contenait en outre des fins bâtonnets bleus et rouges et peu colorés.

On n'a jamais pu obtenir des cultures-filles en partant des cultures, mentionnées ci-dessus.

ad B. **Granules, obtenus par microdissection de bacilles granuleux.**

Cette expérience, un peu plus compliquée que les précédentes, comprend deux manipulations :

1. La *microdissection* des bacilles.
2. *L'isolement et l'ensemencement des fragments de bacilles.*

Pour cette expérimentation, on introduit deux instruments dans la chambre d'isolement sous le microscope: D'un côté le micro-bistouri et de l'autre la grosse pointe de verre, ayant soin de les placer de façon à ce qu'ils ne puissent se toucher.

L'éclairage fort permet de discerner sans peine des granules dans la plupart des bacilles; ce sont ceux qui se trouvent près des pôles qui sont les plus visibles. Après un peu d'exercice on arrive bientôt à couper le bacille en deux ou trois parties, ne renfermant chacune qu'un seul granule. Cette opération faite, on se sert de la pointe de verre, munie d'une petite boule de gélatine, pour rassembler les fragments de bacille sur cet instrument.

A cette phase de l'expérience on peut manipuler avec les fragments de bacille et les ensemencer selon la technique, décrite à la page 24, soit *in vivo*, soit *in vitro*.

Expériences.

Cette micromanipulation exigeant beaucoup de temps, les circonstances ne nous ont pas permis de pousser très loin ces expériences. Aussi nous n'avons pu ensemencer que 3 tubes de milieu de culture (milieu de BESREDKA—JUPILLE et bouillon de viande) avec des fragments de bacilles; dans aucun de ces tubes nous n'avons pu constater la moindre culture.

Ces expériences encore peu nombreuses ne nous permettent que de tirer une *conclusion provisoire*: Les granules, obtenus par microdissection du bacille, ne semblent pas capables de reproduire le bacille normal.

Les observations suivantes, faites pendant l'isolement et la microdissection de différents microbes (Bacille du

Colon, bacille tuberculeux et autres) sont à l'appui de notre hypothèse que des bacilles mutilés ou disséqués ne sont plus capables de se reproduire.

Pour l'isolement du bacille du Colon p.e. il faut avoir grand soin de ne pas trop traîner le bacille isolé sur la lamelle ou de ne pas appuyer trop avec l'instrument; jamais nous n'avons réussi la culture en partant d'un bacille, légèrement „maltraité" ou, à plus forte raison, d'un bacille mutilé.

(Pour expliquer le fait que le Bacille du Colon ne pousse plus quand il est maltraité, SCHOUTEN suppose qu'en traînant le bacille sur la lamelle, celui-ci perd ses cils et en même temps une partie de son protoplasme; cette hypothèse devrait être vérifiée en expérimentant avec des bacilles mobiles et immobiles.)

Les instruments du micromanipulateur nous permettant de *toucher* les microbes, nous avons pu recueillir des observations sur certaines propriétés du corps microbien qui forcément échappent à l'observation pendant les manipulations microbiologiques habituelles.

C'est ainsi qu'on peut noter l'élasticité ou la fragilité du corps bacillaire en question.

Nous avons remarqué, en manipulant avec la grosse pointe de verre, la fragilité extrême du Bact. Bulgaricum (— bacille du Yoghurt —) qu'on ne peut presque pas toucher sans qu'il se casse en plusieurs morceaux.

Le Bacille du Colon, moins fragile, est pourtant très sensible à un traitement brutal qui le rend aussitôt incapable de se reproduire.

Par contre le bacille tuberculeux est beaucoup plus flexible, moins fragile, plus élastique que le Bacille Bulgare et le Bacille du Colon.

Pendant la microdissection du bacille tuberculeux, nous avons eu l'occasion d'observer quelquefois un phénomène intéressant et non-expliqué jusqu'ici:

Les bacilles, répandus sur la lamelle en gouttelettes très petites (— collés par adhésion contre le verre —), sont immobiles. En coupant le bacille en morceaux, *d'un seul trait*, les fragments obtenus sont également immobiles.

Or, un autre phénomène se produit lorsqu'on sectionne *incomplètement* le bacille. Les deux fragments, unis encore par une très mince bande de protoplasme ou de substance ciro-graisséeuse, exécutent des petits mouvements brusques, tournants, pivotants; quelques minutes après la microdissection ces mouvements diminuent et se terminent bientôt.

Une autre fois, en disséquant un bacille qui se trouvait dans une fine gouttelette, ne contenant que ce bacille, nous avons vu apparaître à plusieurs endroits dans le liquide de petits corpuscules réfringents: Ces corpuscules ne sortaient pas déjà *formés* des fragments du bacille et pourtant ces fragments ont dû donner naissance à ces corpuscules réfringents.

S'agirait-il peut-être d'un contenu plus ou moins liquide du bacille, se vidant, après microdissection, dans le liquide environnant et passant là, par coagulation ou autre, en état demi-solide sous forme de corpuscules réfringents?

Ce fait donne lieu à supposer la présence réelle d'une *membrane*, entourant le contenu plus ou moins liquide du bacille tuberculeux.

De plus, cette observation mentionnée fortifie notre doute sur la possibilité *qu'auraient les fragments* de bacilles de régénérer des bâtonnets; car la dissection du bacille lui cause un dommage important et provoque la perte de substance protoplasmique bacillaire. Il est fort improbable que le corps ainsi mutilé et partiellement vidé arrive tout de même à reproduire des bacilles.

Peu de temps après avoir constaté ce phénomène — qu'on ne peut pas toujours reproduire du reste — nous avons trouvé dans la littérature la description d'observations, faites pendant la microdissection de différents

microbes et qui nous ont frappées par leur conformité aux nôtres.

Il s'agit d'une publication de WAMOSCHER et STOECKLIN¹⁷⁾ qui ont expérimenté avec le micromanipulateur de PETERFI.

Ces auteurs ont fait exactement la même observation en disséquant certains microbes (Bacille du Colon, bacille paratyphique, bacille dysentérique, etc.) que celle que nous venons de décrire pour les fragments du bacille tuberculeux.

En disséquant *rapidement*, ces auteurs voient apparaître, dans le liquide environnant, des granules très petits (— à la limite de la visibilité avec un système optique très puissant —) et réfringents, disparaissant bientôt. — Ces investigateurs donnent des photographies très bien réussies de ce phénomène, étudié sur fond noir. — Ils décrivent encore pour certains microbes l'apparition d'un „tampon”, se formant à l'extrémité blessée du bacille.

Leurs essais de culture en partant de fragments de microbes ou de microbes mutilés, n'ont jamais réussi, pas plus que ceux de SCHOUTEN et de nous-mêmes.

Il serait intéressant de poursuivre ces expériences, de grande importance pour le problème de la filtrabilité du bacille tuberculeux; de telles observations, recueillies sur une grande quantité de matériel tuberculeux, permettraient de vérifier ou de rejeter l'hypothèse que des *fragments*, „Splitter”, de ce bacille, passant à travers la bougie, seraient capables de régénérer des bacilles typiques, *in vitro* et *in vivo*.

ad C. Granules, obtenus par lyse expérimentale des bacilles.

Dans le chapitre II, nous avons décrit des expériences, faites dans le péritoine de cobayes neufs avec des bacilles de la tuberculose aviaire, essais abandonnés à cette époque-

là et dont les résultats avaient été complètement négatifs.

Répétant ces expériences dans d'autres conditions, nous avons réussi la reproduction du phénomène de PFEIFFER et obtenu ainsi la désintégration du bacille en granules.

Des lapins, préparés par voie veineuse avec des bacilles tuberculeux aviaires, reçoivent dans le péritoine ce même bacille tuberculeux dix jours plus tard. (Culture sur milieu de PÉTRAGNANI, contenant très peu de granules.)

L'étude microscopique du liquide péritonéal, prélevé par ponction successive dès la deuxième minute jusqu'à trois heures, 24 heures et 3 jours après l'inoculation péritonéale donne les résultats suivants (Coloration de ZIEHL—NEELSEN et de FONTÈS) :

Après 30 minutes apparition, à côté des bacilles libres ou phagocytés, de granules isolés.

De plus en plus les bacilles se gonflent, se vident, se dissolvent en amas ou chaînettes de granules, tandis que le nombre de granules libres devient de plus en plus nombreux.

Vingt-quatre heures après l'injection intrapéritonéale on trouve encore des granules en abondance et à l'autopsie du lapin qui a succombé le troisième jour après l'injection, on trouve le même aspect du liquide péritonéal.

Expériences.

Des *granules* ont été isolés en partant du liquide péritonéal, obtenu par ponction 2^h15, 3 heures et 3 jours après l'injection de l'émulsion bactérienne.

Ces granules ont été ensemencés en tubes de culture d'après la technique, décrite page 27 :

dans du lait glyceriné à 4 p. 100,

en milieu de BESREDKA—JUPILLE,

en milieu de BESREDKA—CALMETTE—VALTIS,

en milieu de SAUTON.

A part l'ensemencement, fait dans le lait, les granules

ont été ensemencés *en surface* des milieux en se servant de la technique, donnée par C. COURMONT; de très minces plaques de liège stérilisées sont ajoutées à ces milieux avant la stérilisation.

Les granules isolés, rassemblés dans une goutte de gélatine, sont déposés sur le support de liège avec la petite pelle de platine, manipulation très facile à exécuter si l'on prend soin de chauffer à 30° C. le tube à ensemencer; la goutte de gélatine fond dans le liquide au-dessus de la plaque de liège.

Des tubes ensemencés, gardés à l'étuve à 38° C., les premiers examens microscopiques ont été faits au bout de 2 et 3 semaines.

Les tubes de milieu de BESREDKA—JUPILLE et de BESREDKA—CALMETTE—VALTIS, ensemencés avec *une dizaine de granules* de bacilles tuberculeux, révèlent dans les frottis, colorés d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, un départ de culture; on peut constater dans ces tubes la présence de très peu de bâtonnets, nettement alcoolo-acido-résistants.

Dans les tubes de lait glyceriné on n'a pas trouvé des bacilles à ce moment-là. Les frottis colorés démontrent parfois la présence de *corpuscules rouges*, mais ceux-ci pouvant provenir des matières protéiques du lait, cette trouvaille n'a point d'intérêt et ces essais de culture ont été considérés négatifs.

Pourtant, *deux mois* après l'ensemencement on a constaté avec certitude la présence de *bacilles alcoolo-acido-résistants* dans un des tubes de lait glyceriné. Il s'agit d'un tube, ensemencé avec *un granule*, isolé du liquide péritonéal d'un lapin, injecté 3 heures auparavant avec une émulsion de bacilles tuberculeux.

Sur les frottis de la dite culture en lait glyceriné, colorés selon la méthode de ZIEHL—NEELSEN, on a trouvé *des bacilles alcoolo-acido-résistants et des granules*.

Le plus beau résultat est obtenu en milieu de BESREDKA — JUPILLE, où l'ensemencement *d'une dizaine de granules* sur une plaquette de liège a donné deux fois une culture dans laquelle l'examen microscopique a démontré des amas de *bacilles tuberculeux* typiques, granuleux souvent et alcoolo-acido-résistants. L'une et l'autre de ces propriétés sont à apprécier dans le dessin ci-joint, en face du titre. (Immersion à l'huile 1/16; oculair No. III; grossissement total du système optique 950x.)

Dans les expériences décrites ci-dessus on a parcouru *le cycle vital complet* du bacille tuberculeux:

Bacilles → granules → bacilles.

CHAPITRE IV.

LES STADES DE TRANSITION DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE IN VIVO.

Etude expérimentale.

La réalité du passage du bacille en granules et vice versa *in vitro* ne nous faisant aucun doute, nous nous sommes demandées si cette même transition avait lieu *in vivo* et si ces granules étaient doués de virulence pour les animaux d'expérience.

Technique.

La gélatine a toujours servi de véhicule pour le transport des granules isolés; la technique fut celle de SCHOUTEN pour l'infection de cobayes avec un seul bacille et quelques bacilles tuberculeux. (Description détaillée page 27). Dans cette expérimentation c'est la spatule de platine qui sert à enlever sur la lamelle la goutte de gélatine avec les éléments isolés.

Modes d'Inoculation.

Les éléments isolés ont été administrés aux animaux par quatre voies:

1. Par voie intraganglionnaire.
2. Par voie digestive.
3. Par voie sous-cutanée.
4. Par voie veineuse.

Successivement nous voulons décrire ces quatre séries d'expériences et leurs résultats.

ad 1. Inoculation par voie intraganglionnaire.

Dans la dernière publication de CALMETTE et VALTIS¹⁸⁾ les auteurs annoncent avoir réussi de nouveau la culture

in vivo de bacilles tuberculeux en partant de *filtrats* de matériel tuberculeux. Pour cette expérience ils se sont servis de la technique d'inoculation de NINNI¹⁹), injection directe du filtrat dans le système ganglionnaire.

Appliquant cette technique à nos expériences avec des éléments isolés (bacilles ou granules), nous avons inoculé une série de cobayes dans les *ganglions cervicaux*.

Chez les cobayes l'opération est simple, surtout chez les jeunes animaux, dont les ganglions en question sont assez volumineux.

Après avoir disséqué et incisé un ganglion cervical, on fait fondre dans cette incision une gouttelette de gélatine, contenant les éléments isolés; puis la plaie cervicale est refermée.

Cette opération déjà effectuée sur une douzaine de cobayes, a toujours bien réussi, sans jamais donner lieu à des infections secondaires.

Essai de Technique.

Afin de vérifier l'efficacité de ce nouveau mode d'inoculation, nous avons inoculé dans le ganglion cervical droit d'un cobaye une goutte de gélatine, contenant très peu de bacilles tuberculeux du type *bovin*.

A partir du neuvième jour environ on pouvait constater un début de tuméfaction du ganglion injecté.

Un mois après l'inoculation on a prélevé le ganglion, devenu très volumineux et contenant des bacilles tuberculeux typiques en abondance.

Seize semaines après l'inoculation le cobaye meurt; à l'autopsie on constate une tuberculose généralisée typique: Tuméfaction et caséification des ganglions lymphatiques.

Foyers tuberculeux dans les poumons, dans le foie et dans la rate. La rate est énorme.

Présence de bacilles tuberculeux dans tous les organes.

Cette expérience nous a démontré la valeur de la technique d'inoculation de NINNI pour d'aussi *petites* quantités de matériel infectant.

Pour les expériences qui vont suivre n'oublions toutefois pas que pour les raisons, expliquées dans le chapitre III, nous nous sommes toujours servies du bacille tuberculeux *aviaire*, auquel le cobaye n'est pas très sensible.

Nous espérons poursuivre ces expériences en employant la même technique chez le *lapin* et aussi en manipulant avec des souches bovines et humaines.

Notre technique actuelle d'isolement rend très difficile des inoculations, comparables avec les plus faibles quantités qu'on injecte en général; le nombre d'éléments maximum que nous avons inoculé à l'animal dans une goutte de gélatine a été de 16.

On pourrait, il est vrai, inoculer des quantités beaucoup plus grandes à l'animal en faisant plusieurs isolements de suite et en introduisant plusieurs gouttes de gélatine dans l'organisme, dont chacune contient 10 à 15 éléments isolés.

Mais la réalisation de ce programme rencontrant beaucoup d'obstacles, nous avons dû y renoncer jusqu'ici, espérant l'exécuter une autre fois.

Nous nous sommes donc contentées d'inoculer un très petit nombre de bacilles ou de granules.

Expériences.

Cobaye 595. Inoculé le 11 sept. 1930 avec 7 granules de tuberculose aviaire dans le *ganglion cervical gauche*. Le 15 sept. '30, donc 4 jours après l'inoculation, on prélève le ganglion cervical gauche qui présente un aspect normal.

Dans les *frottis* de cet organe, colorés selon la méthode de ZIEHL—NEELSEN et celle de FONTÈS, on n'a trouvé ni bacilles, ni granules.

Il est fort probable que ce résultat négatif est dû au prélèvement trop précoce du ganglion infecté.

Les expériences *in vivo* de VALTIS, SAENZ et VAN DEINSE²⁰), faites avec les *filtrats* de matériel tuberculeux, donnent cependant des résultats *positifs* (c.à.d. présence de bacilles tuberculeux dans certains organes des animaux injectés), lorsqu'on sacrifie l'animal infecté de 4 à 20 jours après l'inoculation, et des résultats *négatifs* (absence de bacilles acido-résistants), lorsque l'animal est gardé en observation pendant des mois; nous avons donc prélevé au bout de 4 jours.

Cobaye 600. Inoculé le 11 sept. '30 avec 5 granules de tuberculose aviaire dans le *ganglion cervical droit*.

A partir du 20 sept. légère infiltration dure au lieu d'inoculation.

Le 20 octobre (4 semaines 1/2 après l'inoculation) l'animal est sacrifié par saignée.

A l'autopsie rien à signaler.

Dans les *frottis* du ganglion infecté et de la rate, colorés selon la méthode de ZIEHL—NEELSEN et de FONTÈS, nous n'avons pas trouvé des bacilles nets; dans les préparations de FONTÈS on a constaté des granules rouges et d'autres Gramophiles, mais pas des bacilles distincts.

Cobaye 637. Inoculé le 24 oct. '30 avec 8 bacilles de tuberculose aviaire dans le *ganglion cervical droit*.

Le 12 déc. (6 semaines après l'inoculation) l'animal est sacrifié.

Autopsie: Le ganglion infecté est légèrement augmenté de volume.

La rate est un peu hypertrophiée.

Rate, incluse en paraffine, coupes faites et colorées d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, de GIESON, et avec l'hématoxyline-éosine.

L'examen microscopique des coupes a donné un résultat négatif au point de vue tuberculose.

Par erreur cette série d'expériences a été interrompue.

Cobaye 638. Inoculé le 24 oct. '30 avec 8 granules de tuberculose aviaire dans le *ganglion cervical droit*. Le 12 déc. (6 semaines après l'inoculation) l'animal est sacrifié.

Autopsie: Le ganglion infecté est très peu augmenté. La rate, d'aspect grumeleux, semble normale et non hypertrophiée.

Comme pour le cobaye 637 on pratique des coupes de la rate, qu'on colore d'après les méthodes mentionnées ci-dessus.

L'examen microscopique des coupes de rate n'a montré rien d'anormal.

I. *Cobaye 222.* (1er passage du virus (?) du cobaye 638) : Le 16 déc. '30 on inocule du matériel du cobaye 638 au cobaye 222.

- a. Injection dans le *ganglion cervical gauche* de 0.1 cent. cube d'une suspension dense de la *rate* en eau physiologique.
- b. Injection dans le *péritoine* de 0.5 cent. cube de cette même suspension.

Le 5 mars 1931 (11 semaines $\frac{1}{2}$ après l'inoculation) le cobaye 222 est sacrifié (saignée).

Autopsie: Pneumonie.

Tuméfaction des ganglions cervicaux ; le ganglion cervical *gauche* inoculé est plus volumineux que le *ganglion droit*.

Tuméfaction très prononcée des ganglions lymphatiques *trachéo-bronchiques*.

Tuméfaction très nette des ganglions axillaires.

Avec les organes du cobaye 222 on fait des *passages*.

II¹. Cobaye 187. Poids 530 gr. (2me Passage du virus (?) du cobaye 638) :

Inoculé le 6 mars '31 avec du matériel, provenant du cobaye 222.

- a. Injection dans le *ganglion cervical droit* de 0.05 cent. cube d'une suspension dense de la *rate* du cobaye 222 en eau physiologique.
- b. Injection dans le *péritoine* de 0.1 cent. cube d'une suspension louche en eau physiologique du *ganglion cervical gauche*.

II². Cobaye 186. Poids 586 gr.

Inoculé le 6 mars '31 avec du matériel, provenant du cobaye 222.

- a. Injection dans le *ganglion cervical gauche*, de 0.05 cent. cube d'une suspension épaisse en eau physiologique de la *rate*.
- b. Injection dans le *péritoine* de 0.1 cent. cube d'une suspension louche du *ganglion cervical gauche* en eau physiologique.

(Cobaye 186 et cobaye 187 sont donc infectés avec le même matériel; second passage sur des cobayes.)

Second passage du virus du cobaye 638 sur des *lapins*:

Lapin 232: Inoculé le 6 mars '31, par voie veineuse, avec 1.5 cent. cube d'une suspension louche en eau physiologique du *ganglion cervical gauche* du cobaye 222.

Lapin 233: Inoculé le 6 mars '31, par voie veineuse, avec 1 cent. cube d'une suspension louche en eau physiologique de la *rate* du cobaye 222.

Cobaye 652: Inoculé le 24 nov. '30 avec 10 *granules* de tuberculose aviaire dans le *ganglion cervical droit*.

Provenance des granules: Culture de tuberculose aviaire de 3 mois sur le milieu de PÉTRAGNANI.

Le 13 février 1931 (11 semaines 1/2 après l'inoculation) le cobaye est sacrifié.

Autopsie: (voir photo, fig. 3).

Tuméfaction et caséification du ganglion cervical droit (point d'inoculation).

Tuméfaction légère des ganglions inguinaux.

Ganglions axillaires non-tuméfiés.

Rate: Aspect grumeleux multicoloré.

Poumons: Dans les deux sommets l'examen *macroscopique* a révélé la présence de proliférations, plutôt que de tubercules. Présence de quelques cavernes.

A l'examen *microscopique* de coupes une *bronchopneumonie* chronique avec des proliférations du tissu. Sur la photographie on peut apprécier la différence entre la dimension du *ganglion cervical infecté* et l'autre; de même on voit l'aspect très spécial d'un des sommets de poumon.

Examen microscopique des organes du cobaye 652.

Dans les *frottis* des différents organes — poumons, ganglions, rate —, colorés selon les méthodes de ZIEHL—NEELSEN et de FONTÈS, on trouve des *granules* plus ou moins alcoolo-acido-résistants et de rarissimes *bacilles* rouges, Grampositifs.

Procédé à l'antiformine.

Aux organes — ganglions, poumons, rate —, émulsionnés avec de l'eau physiologique, on ajoute de l'antiformine à 24 p. 100; après un contact de 18 heures à la température du laboratoire, les émulsions sont centrifugées en tubes stériles.

Du sédiment, lavé plusieurs fois à l'eau stérile, des frottis sont faits et colorés selon les méthodes de ZIEHL—NEELSEN et de FONTÈS.

Résultat: Par ce procédé on a mis en évidence *de nombreux bâtonnets alcoolo-acido-résistants et Grampositifs* dans ces organes.

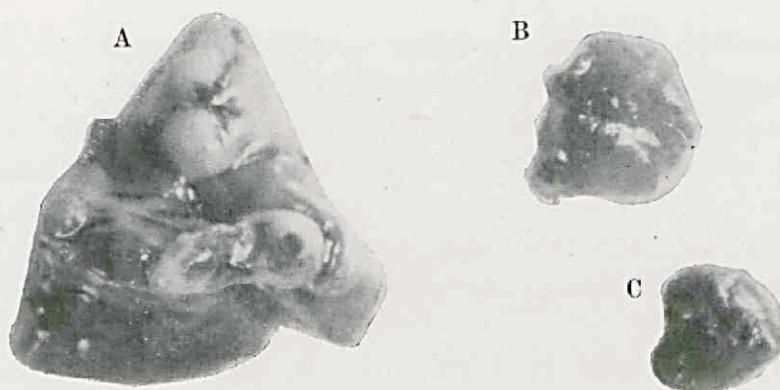


Fig. 3.

Cobaye 652. (p. 48), inoculé avec 10 granules de tuberculose aviaire.

A Sommet de poumon; prolifération du tissu pulmonaire.

B Ganglion cervical droit (place de l'inoculation).

C Ganglion cervical gauche.



Fig. 4.

Cobaye 652. Culture de bacilles tuberculeux sur le milieu de LOEWENSTEIN en partant des ganglions (p. 49).

Coloration FONTÈS.

Des émulsions d'organes, traitées pendant quelques heures avec l'antiformine à 12 p. 100, des *ensemencements* ont été faits sur différents milieux (milieu de PéTRAGNANI, de BESREDKA—JUPILLE, de LOEWENSTEIN²¹), bouillon de viande alcalin, gélose simple).

Au bout de 2 mois il y a un trouble léger dans les tubes de bouillon de viande, ensemencés avec du matériel, provenant du ganglion cervical droit.

Des frottis du culot de centrifugation, colorés d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, montrent la présence de très rares bacilles rouges et de quelques granules rouges.

Par contre les frottis, colorés selon FONTÈS, montrent la présence de *multiples bacilles granuleux, typiques, Gramophiles*.

Même résultat avec le début de culture, constaté sur le milieu de LOEWENSTEIN, en partant du poumon, de la rate et des ganglions (voir photo, fig. 4).

On essaie la virulence de ces bacilles, obtenus par passage de 10 granules par le cobaye, pour les animaux de laboratoire. —

Il ne s'agit donc pas de bacilles paratuberculeux, qui poussent très facilement sur les milieux habituels. En outre l'antiformine a un pouvoir lytique très prononcé sur les bacilles pseudo-tuberculeux.

Entre les bacilles, présents dans les organes, on trouve des fins bâtonnets grêles, longs, granuleux ou homogènes, à côté de bâtonnets plus courts, granuleux, plus épais.

Tous ces bacilles sont rigoureusement alcoolο-acido-résistants et restent rouges même après décoloration très prolongée (24 heures) dans un mélange d'alcool et d'acide chlorhydrique (100 cent. cube d'alcool à 96 p. 100 avec 5 cent. cubes d'acide chlorhydrique à 25 p. 100).

Coloration au bleu de méthylène ne révèle pas la présence de bacilles.

Coloration selon la méthode de FONTÈS renseigne sur le caractère Grampositif des bâtonnets.

Passage du Virus du Cobaye 652.

Lapin 880—881: Inoculé le 14 février 1931, sous la peau, avec une suspension épaisse en eau physiologique de la rate du cobaye 652.

Lapin 882—883: Inoculé le 14 février 1931, sous la peau et dans la veine de l'oreille, avec une suspension louche en eau physiologique du ganglion cervical droit du cobaye 652.

Cobaye 653: Inoculé le 24 novembre 1930 avec 10 bacilles tuberculeux aviaires dans le ganglion cervical droit. Provenance des bacilles: Culture de tuberculose aviaire de 3 mois sur milieu de PÉTRAGNANI.

Le 13 février 1931 (11 semaines $\frac{1}{2}$ après l'inoculation) le cobaye est sacrifié.

Autopsie: Les deux ganglions cervicaux sont d'aspect normaux et identiques, non-tuméfiés.

Tuméfaction légère des ganglions trachéo-bronchiques. La rate est d'aspect grumeleux.

Examen microscopique des organes.

Dans les frottis des organes du cobaye 653, colorés selon les méthodes de ZIEHL—NEELSEN et de FONTÈS, on ne trouve pas de bacilles.

Après traitement des organes avec l'antiformine, l'examen du culot de centrifugation n'a pas non plus révélé la présence de bâtonnets alcoolo-acido-résistants.

Encemencé en bouillon de viande alcalin, on a obtenu, au bout de 2 mois, un départ de culture de bacilles granuleux, Gramophiles, en partant de la rate et du ganglion cervical droit du cobaye.

Il n'a pas été fait de passages.

ad 2. **Inoculation par voie digestive.**

D'après les différents auteurs il semblerait que l'infection tuberculeuse spontanée des volailles puisse se produire par voie digestive.

Aussi avons-nous essayé d'infecter deux jeunes coqs par cette voie avec des *granules* de tuberculose aviaire.

Les granules isolés sont rassemblés dans une goutte de gélatine; celle-ci est incluse dans une pilule de pain, qu'on fait avaler à l'animal.

Expériences.

Coq 119 (âgé de 2 mois) : Le 20 sept. '30 on lui a administré *plusieurs granules* (une douzaine environ) de tuberculose aviaire.

La croissance semble d'abord normale; il mange bien. Toutefois au début de février 1931, il reste blotti au fond de sa cage, apathique; sa crête devient rose-pâle, son plumage perd sa couleur. Il maigrit visiblement et ne peut presque plus se tenir sur ses pattes. Les pattes sont déformées.

Le 7 mars 1931 (6 mois après l'inoculation) le coq 119 est sacrifié.

Autopsie: Animal maigre.

Déformation du sternum.

Les organes sont d'aspect normal. Plusieurs ganglions sont *durs*. — Rachitisme.

L'examen microscopique des différents organes n'a pas révélé la présence de bâtonnets.

Il n'a pas été fait de passages.

Coq 134 (âgé de 2 mois) :

1. Le 24 sept. '30 reçoit par voie digestive une *dizaine de granules* de tuberculose aviaire.
2. Le 27 sept. '30 de nouveau une *dizaine de granules* de tuberculose aviaire.
3. Le 29 sept. '30 le coq reçoit une troisième dose d'une *dizaine de granules* de tuberculose aviaire.

Mai 1931: Se développe très bien.

ad 3. **Inoculation par voie sous-cutanée.**

Le lapin étant un animal réceptif à la tuberculose aviaire, nous nous en sommes servies.

Nous n'avons pas appliqué la technique de NINNI, p. 43, le lapin s'infectant secondairement plus facilement.

C'est ainsi que dans ces premières expériences le matériel a été inoculé *par voie sous-cutanée*.

Technique.

Sur le dos du lapin, rasé et désinfecté, on fait une scari-
fication dans le derme avec un vaccino-style. Dans l'inci-
sion, on introduit une goutte de gélatine, contenant le
matériel infectant; la peau incisée est refermée avec du
collodion.

Lapin 209: Inoculé le 13 octobre 1930 avec 8 bacilles de
tuberculose aviaire.

Le 8me jour, petite induration locale qui diminue et
disparaît au bout de 3 semaines.

Lapin 208: Inoculé le 13 octobre 1930 avec 8 granules
de tuberculose aviaire.

Légère induration locale à partir du 8me jour environ.
Au bout de 2 semaines cette induration persiste encore
au moment où celle, provoquée avec la même quantité
de bacilles chez le lapin 209, a déjà beaucoup diminuée.
Puis cette réaction locale diminue et au bout d'un
mois elle a disparu.

La même observation a été faite par VAUDREMER, en
inoculant le filtrat d'une culture de bacilles tuberculeux
au cobaye. „Les cultures involuées, obtenues après fil-
tration, produisent des indurations locales lorsqu'on les
inocule sous la peau du cobaye. Ces indurations se dévelop-
pent en 8 jours environ et disparaissent en 3 semaines.

Elles ne déterminent pas de tuberculose généralisée chez l'animal."

Le 1er novembre 1930 on inocule de nouveau *une dizaine de granules* à ce même lapin.

Dans les premiers jours qui suivent cette seconde inoculation, il y a une très faible réaction locale; pas d'induration persistante.

Lapin 215: Inoculé le 8 novembre 1930 avec une goutte de gélatine, contenant 16 *fragments* de bacilles de tuberculose aviaire (p. 35).

Légère induration locale qui persiste durant quelques semaines, pour disparaître ensuite.

ad 4. **Inoculation par voie veineuse.**

Dans le 3me chapitre (p. 41) nous avons décrit les résultats positifs d'essais de culture en milieu de BESREDKA—JUPILLE, ensemencés avec *quelques granules*, obtenus par lyse expérimentale des bacilles.

Dans ces tubes, ensemencés le 5 octobre 1930 avec des *granules* de tuberculose aviaire, il n'y avait qu'une culture peu abondante de bâtonnets typiques (voir la planche) au début de décembre 1930.

Espérant obtenir une culture plus riche qu'on pourrait inoculer à l'animal, nous avons gardé ces tubes de BESREDKA—JUPILLE à l'étuve (38° C.) plusieurs mois de suite, mais ceci sans résultat.

Au bout de 3 mois on les a retirés de l'étuve et gardés à la température du laboratoire. Les cultures n'ont jamais été repiquables.

Nous avons inoculé au lapin une de ces vieilles cultures en milieu de BESREDKA—JUPILLE.

Remarquons que les bacilles de tuberculose aviaire peuvent garder longtemps leur virulence et leur vitalité; c'est ainsi qu'une culture de tuberculose aviaire sur milieu de PÉTRAGNANI, âgée de 14 mois, à son premier passage sur ce milieu, tuait le lapin en 15 jours.

Lapin 234: Inoculé le 7 mars 1931 par voie veineuse avec 2 cent. cubes de la culture, décrite ci-dessus.

Mai 1931: L'animal maigrit.

CHAPITRE V.

SUR LA BIOLOGIE DU BACILLE TUBERCULEUX.

Le problème de la signification des granulations du bacille tuberculeux a pris naissance au moment-même de la découverte du bâtonnet.

ROBERT KOCH¹⁾ a décrit l'aspect granuleux du bacille après coloration au bleu de méthylène alcalin; les espaces non-colorés dans le bâtonnet bleu représenteraient des *spores*, grâce auxquelles le bacille tuberculeux garderait sa virulence.

Plus tard il a abandonné l'hypothèse des spores.

En 1886 EHRLICH²²⁾ décrit *les corpuscules ovales*, observés dans certains bacilles; BABÈS²⁾ publie un article sur des corps ovalaires, granules métachromatiques dans le bâtonnet qui, d'après lui, seraient doués de vitalité. Puis STRAUSS³⁾ en 1895 aborde le même sujet.

Les parties réfringentes, observées dans le bacille de la tuberculose, sont alternativement intitulées *spores*, *vacuoles*, *dépôts de substances nutritives*, *produits de dégénérescence*.

Trois opinions prédominent donc; certains décrivent les dits corpuscules comme des *spores*, d'autres refusent au Bac. tuberculeux la propriété de sporulation, d'autres enfin se déclarent incapables de fixer actuellement la nature exacte de ces corps réfringents.

A part DEYCKE²³⁾ la plupart des auteurs admettent l'identité des *granules intrabacillaires* et des *granules libres* dans les cultures ou dans le matériel de provenance tuberculeuse. Il en suit qu'il y a de différentes opinions sur les

granules libres, comme nous en avons signalé pour les corpuscules intrabacillaires.

Nous ne pouvons donner ici qu'une énumération rapide et forcément incomplète d'une partie de la littérature très vaste, parue à ce sujet.

Après KOCH ce sont NOCARD et ROUX²⁴⁾ qui, se basant sur certaines propriétés de coloration, ont considéré comme prouvée la nature sporulée des corpuscules intrabacillaires.

Puis c'est SPENGLER²⁵⁾ qui d'abord, en 1905, prend ses „Splitter” pour des formes d'involution du bacille tuberculeux, dont la vitalité et la virulence ont diminué; cependant, deux ans après (1907)²⁶⁾ il tend de *prouver* la propriété de sporulation du bacille tuberculeux bovin.

VON BETEGH²⁷⁾ veut que ses „spores” qu'il identifie avec les granules de MUCH et les „Splitter” de SPENGLER, aient une valeur diagnostique; KRONBERGER²⁸⁾ et FUCHS—WOLFRING²⁹⁾ sont du même avis.

A son tour KNOLL³⁰⁾ défend la propriété de sporulation du bacille tuberculeux en démolissant l'ancienne définition des *spores*.

Les „spores” du Bac. tuberculeux n'étant pas thermorésistantes et n'ayant point de membrane, KNOLL rejette ces deux propriétés des vraies spores comme des „requisitoires théoriques”; selon lui ces „spores” seraient capables de régénérer le bacille tuberculeux.

Avant KNOLL cette hypothèse du rôle régénératif des „spores” se trouve déjà chez FONTÈS⁵⁾, comme nous l'avons exposée en chapitre I (p. 2); dans ses publications ultérieures (1925)³¹⁾ FONTÈS attribue le rôle important de régénérescence aux granules de maintes espèces microbienues.

De nombreux investigateurs ont soutenu d'arguments divers la nature sporulée du bacille tuberculeux, tel BALMER et FRÄNZEL³²⁾, MARPMANN³³⁾, NEGRI³⁴⁾, BEZANÇON et PHILIBERT³⁵⁾, SMITH, WHERRY, GAVINA, KAST³⁶⁾, etc.

L'opinion inverse a été avancée et défendue avec tout autant d'ardeur.

Plusieurs auteurs ont cherché à prouver la parenté du bacille tuberculeux avec les champignons. METCHNIKOFF³⁷), tout en avouant que le problème des „spores” du bacille tuberculeux n'ait pas encore de résolution, envisageait les petits granules comme pouvant représenter des formes de résistance. D'après lui le bacille tuberculeux appartient aux Sclérothricètes.

Pour BABÈS et LEVADITI³⁸) le bacille tuberculeux est parenté aux Actinomycètes, opinion que l'on retrouve chez COPPEN JONES³⁹), NEUKIRCH⁴⁰), FRIEDRICH⁴¹), LUBARSCH⁴²), SCHULTZE⁴³), LÉVY⁴⁴), E. KLEIN⁴⁵), FISCHEL⁴⁶), SANDER⁴⁷). FISCHEL, plus tard, BRUNS⁴⁸), suppose que le bacille tuberculeux est la forme parasitaire d'un organisme filiforme d'origine saprophyte.

D'autres auteurs, comme BAUMGARTEN⁴⁹), CORNET et MEYER⁵⁰) considèrent le bacille granuleux et les granules libres comme produits de dégénérescence, ainsi que GEIPEL⁵¹), WOLFF⁵²), WEISS⁵³), BERGEL⁵⁴), VON BEHRING⁵⁵).

Pour plusieurs savants les corpuscules réfringents représentent les parties les plus résistantes des bacilles qui sont encore intactes, le reste des corps bacillaires n'étant que des débris de bacilles, incapables de se reproduire. Cette opinion se trouve chez VON BEHRING⁵⁵), KRUSE et LIEBERMEISTER⁵⁶).

Les granules représentent des *formes de résistance*, „Dauerformen”: telle est l'opinion la plus admise depuis 1907.

MUCH⁴), dès 1907, défend l'hypothèse de la forme végétative, forme de résistance virulente, capable de reproduire le bâtonnet typique et de causer ainsi, dans l'organisme, une infection tuberculeuse.

Cet article a suscité des publications pro ou anti-MUCH

en abondance. Parmi ceux qui partagent l'opinion de MUCH nous voyons WIRTHS⁵⁷), SCHOTTMÜLLER⁵⁸), SCHULZ⁵⁹), ROSENBLATT⁶⁰), WEHRLI et KNOLL⁶¹); par contre BITTROLFF et MOMOSE⁶²) dénient l'existence des granules de MUCH, tandis qu'ARONSON⁶³), déclarant d'avoir constaté la solubilité des „granules de MUCH” dans le trichloréthylène (— ce qui prouverait qu'il ne s'agit pas de corps protéiques, mais d'une véritable cire —), rejette également „la thèse de l'école hambourgeoise (MUCH, WEISS, DEYCKE)”. —

LICHTENHAHN⁶⁴) parle d'une forme de résistance virulente du bacille tuberculeux qui ressemble beaucoup aux spores, sans être identique à ces formes-là; cette opinion se retrouve beaucoup plus tard chez LUCKSCH⁹) et HOFFMANN⁶⁵): „Dauerformen”.

FONTÈS baptise les granules „gonides”, terme employé déjà par COHN, ALMQUIST⁶⁶) (— „conides” —), LÖHNIS⁶⁷) et d'autres pour un mode particulier de reproduction.

Enfin un certain nombre d'investigateurs, tout en discutant le problème des granules du bacille tuberculeux, se gardent de prononcer une opinion ferme sur le rôle et la signification de ces corpuscules. Tel RAVETTLAT et PLA Y ARMENGOL⁶⁸), GOTSCHLICH⁶⁹), CALMETTE⁷⁰), V. D. LEE⁷¹), A. KLEIN⁷²) et d'autres. —

En parlant de la coloration du bacille tuberculeux, CALMETTE⁷⁰) s'exprime ainsi (p. 12):

„La coloration les fait apparaître plus épais parce que leur enveloppe protoplasmique fixe avec beaucoup d'intensité la teinture, quoique d'une façon inégale, de sorte que certaines parties du bacille restent transparentes, tandis que d'autres deviennent tout à fait opaques. Les parties transparentes ressemblent à des granules que l'on a considérés comme des *spores* (C. SPENGLER), mais on sait aujourd'hui qu'ils ne sont autre chose que de petites masses

de substance protoplasmique ayant les caractères des lipoïdes (granules Gramophiles de MUCH)."

Et plus loin (p. 13) :

„Le bacille tuberculeux, du moins dans son état de vie parasitaire, et aussi dans les cultures en milieux artificiels, ne se reproduit pas par sporulation, mais par allongement et division transversale des bâtonnets."

En 1926 cet auteur admet que le bacille de KOCH représente *un stade avancé de l'évolution* du virus tuberculeux et probablement une forme de résistance du micro-organisme.

Les recherches de KAHN et TORREY¹²⁾ sur le développement du bacille tuberculeux humain, dont nous avons parlé page 27, confirment cette opinion.

Parmi les investigateurs, il en est qui nient l'existence des granules de MUCH, mais à tort; car depuis MUCH plusieurs auteurs ont prouvé leur existence dans les cultures et dans du matériel tuberculeux, comme HAGEDORN et FREIE (voir A. KLEIN)⁷²⁾, par coloration successive du même champ microscopique selon ZIEHL et selon GRAM—MUCH ou FONTÈS.

Il était plus difficile de prouver la *signification* de ces corpuscules.

De nombreux investigateurs ont supposé une relation assez étroite entre les bacilles et les granules, fondée dans la biologie-même du bâtonnet.

En 1907 MUCH constate, dans certains produits tuberculeux (pus d'abcès froid, crachats, organes), l'absence de bacilles alcoolo-acido-résistants, tandis que le *passage* de ces produits par l'animal et leur *culture* sur milieu nutritif sont positifs. Ces produits tuberculeux, colorés d'après la méthode modifiée de GRAM — procédé de MUCH — révèlent la présence de bâtonnets et de granules Gramophiles libres, en chaînettes ou en amas.

Inspiré par ces observations MUCH déclare que les

granules représentent la forme granulaire du virus tuberculeux, forme indépendante et plus résistante que le bacille qu'il est capable de régénérer.

Ses recherches le poussent à admettre trois stades de développement pour le bacille tuberculeux :

1. Le bâtonnet alcoolo-acido-résistant.
2. Le bâtonnet non alcoolo-acido-résistant.
3. Les granules.

C'est un cycle, car MUCH annonce encore avoir réussi, une fois, l'obtention d'une culture de bacilles tuberculeux typiques en partant de granules Gramophiles.

Il s'agit de l'expérience suivante :

Dans du *lait* de vache, immunisée (?) contre la tuberculose, additionné d'eau oxygénée, MUCH ensemence 5 mgr d'une culture jeune (14 jours) de tuberculose bovine sur gélose; les tubes encemencés sont portés à l'étuve à 37° C.

La coloration d'après la méthode de ZIEHL et d'après la méthode de GRAM montrait à l'ensemencement de nombreux bâtonnets alcoolo-acido-résistants et Gramophiles.

Au bout de 24 heures à 37° C. le nombre de bacilles alcoolo-acido-résistants a diminué; on constate la désintégration des bacilles en chaînettes de granules.

Encore 24 heures plus tard la coloration au ZIEHL ne révèle plus de corps microbiens; la coloration selon GRAM fait apprécier la présence de très peu de granules extrêmement fins.

A ce moment MUCH ajoute de la glycérine aux tubes de lait (4 p. 100) et les remet à l'étuve.

Au bout de 48 heures à 37° C. les frottis, colorés au ZIEHL, donnent un résultat négatif. La coloration selon GRAM ne montre plus de granules, mais des bâtonnets très fins.

Inoculation au cobaye de la culture qui ne contenait plus d'éléments colorables d'après la méthode de ZIEHL, mais seulement d'après la méthode de MUCH — des granules

Gramophiles, provoquait chez cet animal une tuberculose typique. —

Se basant sur ces observations, MUCH conclut à la *virulence* des *granules* et leur propriété de régénérer le bacille typique, ce qui inclut le développement du bacille tuberculeux en trois stades.

Il n'est pas étonnant que MUCH n'ait pu convaincre ses adversaires de la réalité de son hypothèse, car ses expériences, loin de justifier les conclusions importantes de MUCH, manquent de rigueur et ne peuvent figurer de preuves dans le problème des granules.

MUCH a commis l'erreur qu'on retrouve chez beaucoup d'autres expérimentateurs et qui consiste à juger sur l'absence ou la présence de bacilles alcoolo-acido-résistants en se basant sur l'examen microscopique de frottis colorés. Un produit tuberculeux peut contenir un nombre considérable de bacilles tuberculeux, sans que l'examen microscopique des frottis découvre leur présence. Dans un article de A. KLEIN⁷²⁾ sur la polymorphie du bacille tuberculeux on trouve mentionné des recherches de L. LANGE⁷³⁾ à ce sujet; cet auteur a observé et calculé qu'un organe peut contenir quelques 100.000 de bacilles, sans que l'examen d'un frottis de cet organe en révèle la présence, par suite de la répartition très inégale des bacilles dans les différentes parties de l'organe et la quantité minime de matériel, avec laquelle on prépare les frottis.

Rien ne justifie la conclusion de MUCH que le lait ensemençé qu'il a inoculé au cobaye, ne contenait que des granules et point de bacilles.

Un grand nombre d'investigateurs a cherché à résoudre le problème des granules, problème important et intéressant, dont KOCH⁷⁴⁾ dit déjà :

„Depuis le début de mes recherches j'ai prêté beaucoup d'attention à ce problème à cause des publications sur la

décomposition de bacilles en formes micrococciques et sur la transformation de microcoques en bâtonnets; suivant le fait que ces expériences seront vérifiées ou non, nous aurons des conceptions très différentes sur les bactéries. Il s'agit donc d'un problème essentiel qu'il faut chercher à résoudre . . . , résolution à laquelle chacun doit contribuer selon ses forces."

Comme MUCH d'autres auteurs pensent avoir constaté le passage des granules en bacilles et vice versa. Citons WIRTHS⁵⁷), MARPMANN³³), MAFFUCCI⁷⁵, ROSENBLATT⁶⁰), LICHTENHAHN⁶⁴), SCHULZ⁵⁹), ENDERLEIN⁷⁶), LUCKSCH⁹), VAUDREMER⁶), RAVETTLAT et PLA Y ARMENGOL⁶⁸), SWEANY⁷⁷); aucun d'eux n'a apporté la preuve rigoureuse de ces transitions, plusieurs ont commis l'erreur de MUCH.

Cependant SPENGLER²⁵) a réalisé l'expérience suivante qui, si elle était vérifiée, pourrait servir de preuve de cette transition: Étalant un crachat tuberculeux sur un milieu nutritif, il en suit le développement au microscope. Il observe la formation d'amas de „Splitter”, là, où il n'y en avait point d'abord; il voit apparaître des bâtonnets sur des endroits qui auparavant ne présentaient que des Splitter.

Avec SPENGLER nous croyons que la preuve spécifique de la nature des granules se trouve dans le *contrôle au microscope* des éléments ensemencés.

C'est la même pensée qui a conduit KAHN et TORREY¹²) à suivre le développement du bacille tuberculeux humain sous le microscope, en culture unicellulaire.

Comme nous l'avons rapporté page 28, ces auteurs ont observé la transition du bacille en granules, suivie de la réapparition de très fins bâtonnets non acido-résistants qui finalement évoluaient vers des bacilles alcoolo-acido-résistants typiques. Ce cycle de développement constitue la première preuve certaine que le bacille tuberculeux passe

— ou, plutôt, passe dans certains circonstances — par une phase granuleuse avant d'acquérir la forme „normale” de bâtonnet.

Les auteurs décrivent la désintégration du bacille en „grains de poussière” et ce sont ces corpuscules infiniment petits qui donnent naissance à de très fins bâtonnets.

Leurs expériences ne renseignent point sur les granules *libres*, présents en culture ou en produits tuberculeux, les „granules de MUCH” dont la grandeur est de même ordre que celle des corpuscules intrabacillaires.

Quelle est leur signification ?

Dans le but de trouver une réponse à cette question nous avons commencé nos expériences avec le micromanipulateur de SCHOUTEN en 1929, peu avant la publication des deux auteurs américains.

Le résultat de nos recherches, décrit dans les chapitres précédents, comprend donc la confirmation des conclusions de KAHN et TORREY sur la transition du bacille tuberculeux en granules. En outre nous avons réussi à démontrer la transition des granules — „granules de MUCH” *) — en bacilles alcoolo-acido-résistants, *in vitro*; nous pensons que ce passage a lieu aussi *in vivo*. Ces dernières expériences jusqu'à présent peu nombreuses, ne nous permettent pas encore une opinion ferme à ce sujet, pas plus qu'une conclusion finale sur la *virulence* des granules.

Sur une forme filtrable du virus tuberculeux.

Les deux formes du virus tuberculeux que nous venons de décrire — bâtonnets et granules — mises à part, une troisième forme de ce même virus est soulevée; c'est la forme filtrable, découverte et décrite par FONTÈS⁵⁾ en 1910.

*) Comme tous les isolements des granules ont été pratiqués à l'état vivant, non-coloré, il est impossible de savoir si les granules isolés sont tous Gramophiles et non acido-résistants.

Nous avons déjà parlé de cette découverte au chapitre I, page 2 et de la réserve avec laquelle fut reçu cette forme mystérieusement invisible et non-cultivable sur les milieux nutritifs habituels. Trouvant dans les filtrats des corpuscules, FONTÈS envisageait la possibilité du passage à travers les bougies des granulations Gramophiles.

Depuis la confirmation des expériences de FONTÈS par VAUDREMER⁶), VALTIS⁸), etc. plusieurs investigateurs n'ont jamais pu trouver de corpuscules dans les filtrats, tout en constatant leur action après inoculation à l'animal. Ce sont ceux-là qui admettent dans les filtrats la présence d'une forme invisible, un „ultravirus tuberculeux”, comme CALMETTE et ses collaborateurs l'ont appelé.

C'est dans une publication de CALMETTE et VALTIS¹⁸) qu'on trouve la définition suivante de l'ultravirus tuberculeux:

„Eléments virulents invisibles, filtrables à travers les bougies de porcelaine poreuse, présents dans les crachats des phtisiques, dans le pus caséux des tuberculeux, dans les produits de broyage d'organes tuberculeux, dans le sang circulant, dans diverses humeurs ou exsudats des malades, et aussi dans les voiles jeunes des cultures de bacilles de KOCH en divers milieux artificiels.”

Nombreux sont les investigateurs qui sont convaincus de la réalité du virus filtrable du bacille tuberculeux — plus nombreux encore leurs adversaires.

Ceux-ci, n'arrivant pas à causer une tuberculose atypique chez le cobaye par inoculation avec du filtrat de matériel tuberculeux, rejettent l'existence du virus filtrable. Ils expliquent les résultats positifs, obtenus avec le filtrat par divers auteurs, en supposant le passage d'un seul bacille ou de quelques bacilles à travers les pores de la bougie. Pourtant les inoculations d'une unité bacillaire ou de quelques bacilles provoquent une tuberculose *typique* chez l'animal, comme l'a démontré V. D. LEE⁷¹). Ces arguments

ne pouvant convaincre les adversaires de l'ultravirus, il reste aux partisans de la théorie du virus filtrable à apporter des preuves rigoureuses de leur hypothèse.

La définition de l'ultravirus comporte l'hypothèse d'éléments *invisibles* et filtrables; certains expérimentateurs ont constaté, dans le filtrat de matériel tuberculeux, la présence de *granules*.

Dans les cultures très jeunes du bacille tuberculeux sur milieu de PÉTROFF, on trouve de très fins corpuscules non acido-résistants qui sont plus petits que le virus filtrable de la péripneumonie bovine. (Voir VAN DEINSE⁷⁸).

Entre les granules libres il en est d'après LUCKSCH⁹) qui sont plus petits que les spores du téton; de ces corpuscules-ci l'auteur dit qu'ils se trouvent tout juste à la limite de la filtrabilité sur bougie CHAMBERLAND L 3, ce qui permet de supposer le passage des granules tuberculeux à travers la bougie.

A ces quelques observations on pourrait ajouter plusieurs autres qui expliquent la réapparition de l'hypothèse suivante:

La forme filtrable du virus tuberculeux serait-elle identique à la forme granulaire? ou:

Les granulations Gramophiles sont-elles filtrables sur bougie en porcelaine?

C'était, nous l'avons déjà mentionné, l'hypothèse de FONTÈS en 1910.

A l'heure actuelle rien ne nous permet encore de porter un jugement définitif sur la valeur de cette hypothèse.

Nous abstenant de toute conclusion sur leur signification, nous voulons citer ici quelques analogies, constatées en comparant certaines propriétés du „virus filtrable” avec celles des granules.

En juin 1930 CALMETTE, VALTIS et SAENZ¹⁵) ont publié un article où ils écrivent avoir réussi la culture du filtrat tuberculeux *in vitro*, en milieu de BESREDKA modifié.

Le départ de culture est après 9 jours environ ; la couleur du milieu devient *jaune pâle orangé*. Coloration au Bleu BORREL révèle la présence de granulations et d'éléments bacillaires qui ne prennent ni le ZIEHL, ni le GRAM.

Ensuite (page 653) ces auteurs écrivent : „Jusqu'au trentième jour la culture s'enrichit en bacilles, puis ceux-ci cessent de se multiplier. Nous n'avons pas encore réussi à obtenir des cultures-filles sur notre milieu, non plus que sur les milieux usuels”. —

Pour nos cultures en partant d'une dizaine de granules nous avons obtenu le départ de la culture au bout d'un mois environ.

Trois semaines après l'ensemencement le milieu modifié de BESREDKA a viré à *l'orange-brunâtre*.

A partir de 2 mois après l'ensemencement nous n'avons pas observé une augmentation de la culture très faible.

Nos gouttes pendantes de cultures d'éléments granulaires présentent parfois, à l'état vivant, plusieurs très fins bâtonnets et des granules, tandis qu'on n'arrive pas à démontrer leur présence par coloration par le ZIEHL ou selon FONTÈS.

Jamais nous n'avons réussi à obtenir de cultures-filles. —

Ces difficultés de culture trouvent-elles leur cause dans une vitalité moindre des granules ou n'avons-nous pas encore réussi à créer les conditions, favorables à cette culture? A l'heure actuelle nous ne sommes point capables de répondre à ces questions. —

CALMETTE et VALTIS, ainsi que plusieurs autres expérimentateurs, ont très souvent obtenu leur „virus filtrable” en filtrant sur bougie des voiles *jeunes* (6 jours) de cultures du bacille tuberculeux.

Comme matériel pour l'isolement des granules nous avons très souvent choisi des cultures *jeunes* du bacille tuberculeux (5—8 jours) sur milieu de SAUTON⁷⁹) ou en

macération de viande acide, ces cultures étant très riches en granules.

En 1914 BEZANÇON et PHILIBERT⁸⁰⁾ décrivent la structure des voiles jeunes; ils distinguent trois parties dans les voiles de culture du bacille tuberculeux: La substance cyanophile; les bacilles acido-résistants; les corpuscules chromophiles et libres.

Plusieurs expérimentateurs — comme MARMOREK⁸¹⁾, LEGROUX et MAGROU⁸²⁾, NÈGRE, BOQUET et VALTIS⁸³⁾ — ont décrit cette même hétérogénéité des cultures jeunes du bacille tuberculeux, où les bâtonnets typiques se trouvent souvent entourés d'une substance bleue, fibrillaire et membraniforme, et qui contient aussi des granules libres.

C'est de là qu'est née l'hypothèse du lien de génération entre les 3 éléments des voiles: La substance cyanophile donne naissance aux granules et ceux-ci à leur tour se transforment en bâtonnets typiques.

Nous venons de démontrer qu'en effet le granule peut reproduire le bacille.

Est-ce une *mode de reproduction normale* pour le bacille tuberculeux?

Dans son livre intitulé „L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux” CALMETTE s'exprime ainsi: „Le bacille tuberculeux, du moins dans son état de vie parasitaire, et aussi dans les cultures en milieux artificiels, ne se reproduit pas par sporulation, mais par allongement et division transversale des bâtonnets”, p. 13 (3me éd.).

La vérification des expériences de FONTÈS, les publications de plus en plus nombreuses sur l'évolution de l'ultravirüs de différents microbes, les recherches de KAHN et TORREY, les observations, recueillies sur plusieurs espèces de micro-organismes, la coïncidence remarquable entre

l'abondance de granules dans une culture et sa propriété d'être „filtrable” — tous ces faits, pour n'en citer que ceux-ci, ont rallié à cette hypothèse de très nombreux auteurs. Cependant parmi les microbiologistes il en restera toujours qui, devant une forme anormale du microbe en jeu, la jugeront comme forme *d'involution* ou de dégénérescence, ou comme *souillure*, et de sorte sans intérêt.

Par contre pour beaucoup d'autres ces formes „atypiques” sont devenues de grande valeur et ont été étudiées surtout depuis FONTÈS.

En 1912 LEHMANN et NEUMANN⁸⁴⁾ déclarent: „La théorie de l'invariabilité absolue des microbes qui était encore un dogme il y a une vingtaine d'années, ne trouve presque plus de partisans actuellement”. — Ils admettent donc la *variabilité* de la forme microbienne.

C'est HORT qui, en 1916, attaque la seconde partie du dogme de COHN et attire l'attention sur la possibilité qu'ont les microbes de se multiplier autrement que par division transversale. — Viennent encore LÖHNIS⁶⁷⁾, MELLON, ALMQUIST⁶⁶⁾, ENDERLEIN⁷⁶⁾, LIESKE, HADLEY⁸⁵⁾, etc. avec leurs hypothèses sur les formes „atypiques” comme stades dans le développement du microbe, leur „cycle évolutif” dans lequel la forme „normale” ne représente qu'une phase.

Ces idées ne sont point originelles. EHLER, en 1884, étudiant l'anthrax, décrit 2 cycles de développement de ce microbe et FERRAN⁸⁶⁾ (1897) parle d'un „cycle vital” du bacille tuberculeux. Puis, ce sont E. KLEIN⁸⁷⁾ (1890) et METCHNIKOFF³⁷⁾ qui déclarent que le bacille tuberculeux ne représente point de phase terminale, mais rien qu'un stade dans le cycle de développement du bacille.

En 1930 CALMETTE⁸⁸⁾ publie un article, terminant par ces mots:

„Il faut désormais admettre que le bacille découvert en 1882 par ROBERT KOCH représente seulement un des stades

d'évolution et une forme de résistance du virus tuberculeux."

Pour quelle raison cette opinion n'est-elle pas à l'heure actuelle universellement admise? Il nous semble que les monomorphistes ont été trop orthodoxes, trop exclusifs en n'attribuant d'intérêt qu'aux formes „normales” des microbes, c'est-à-dire à ces formes qui, par nos techniques spéciales de laboratoire, de culture autant que d'examen microscopique, prévalent sur les autres formes qui n'en sont pas moins réelles.

Dans cet ordre d'idées nous nous permettons de souligner encore, comme tant d'observateurs, la grande importance que peut avoir l'étude des microbes *en état vivant* dans une source de lumière très forte, la coloration étant un procédé plus ou moins brutal qui fait ressortir certaines particularités des microbes aux dépens d'autres, peut-être aussi importantes.

La faute des pléomorphistes est d'accumuler hypothèse sur hypothèse, sans donner des preuves pour celle, qui sert de base à leur „cycle évolutif”, à savoir la transition d'une forme dans l'autre.

Citons à titre d'exemple la théorie inutilement complexe de ENDERLEIN⁷⁶⁾ sur la reproduction sexuelle des microbes, où il introduit des centaines de termes neufs pour l'édification d'une hypothèse purement philosophique et théorique.

Reprendons maintenant la question suivante: Le bacille tuberculeux se reproduit-il *normalement* en passant par le stade granuleux?

Il est impossible actuellement de répondre d'une façon définitive à cette question. Toutefois, s'il est permis de prononcer une opinion provisoire, nous sommes inclinées à douter du stade granulaire comme stade *normal* de reproduction; en voici les raisons:

- a. On obtient en partant des granules difficilement des cultures lentes et peu abondantes.
- b. Les bacilles, obtenus à partir des éléments filtrables ou des granules, ne sont point repiquables.
- c. Les bacilles, obtenus en partant de la „forme filtrable” ou de granules ne sont plus tuberculigènes; ils sont avirulents et ne retrouvent leurs propriétés typiques qu’après passages successifs sur l’animal, et cela seulement dans une parties des cas.

Que peut-on répondre à ces objections?

- a. Nous ne connaissons point les conditions favorables à une transition rapide des granules en bâtonnets.
- b. et c. Le bacille tuberculeux peut avoir plusieurs modes de reproduction.

Les expériences de KAHN et TORREY et de nous-mêmes prouvent la possibilité de la reproduction par les granules.

Mais nous n’avons *aucune preuve* d’une autre reproduction du bacille, allongement et division transversale ou longitudinale.

La signification des différents modes de reproduction se pose pour tous les microbes.

Nous voulons mentionner une expérience, effectuée avec le Bacille du Colon:

Les cultures jeunes de ce microbe (2 à 4 heures à 37° C.) en macération de viande peptonée contiennent de nombreux *granules*.

Avec le micromanipulateur nous avons isolé, deux fois de suite, trois granules que nous avons ensemencés en macération de viande peptonée; ces tubes sont portés à l’étuve (37° C.).

Les deux premiers jours qui suivent l’ensemencement l’examen des tubes, microscopiquement et macroscopiquement, est sans résultat. Mais après un séjour de 72 heures à l’étuve (37° C.) il y a un trouble très léger dans les tubes ensemencés.

L'examen microscopique en goutte pendante montre la présence d'extrêmement fins bâtonnets et de granules réfringents. L'examen de frottis, colorés d'après GRAM et au bleu de méthylène, est sans résultat.

A partir du 4me jour la culture n'a plus augmenté. On n'a jamais pu la repiquer.

Pour le Bacille du Colon la reproduction par scission transversale est un fait généralement reconnu. Que signifient alors ces granules dans les cultures et leur transition, — lente et limitée, il est vrai — en bâtonnets?

Peut-être nous reconnaîtrons la réalité de ce qu'a prédit HADLEY⁸⁵⁾:

„The truth we shall eventually come to, however, is that the free-living microorganism is potentially a kaleidoscopic thing, in which the power of responding successfully to a changing environment by alteration in body state, both morphologic and biochemical — and even by self-destruction, if need be, in order to generate another and more stable type — stands as its one most important attribute.”

[„La vérité à laquelle nous parviendrons un jour, c'est que le micro-organisme est un être kaléidoscopique en puissance, dont un des attributs les plus importants est son pouvoir de répondre avec succès à un changement du milieu par une altération morphologique et biochimique dans la disposition du corps — et même, s'il y a lieu, par une destruction de soi-même, afin de régénérer un type différent et plus stable.”.]

Pour nous la forme granulaire du virus tuberculeux présente une forme de résistance, „Dauerform”, du bacille tuberculeux, chargé d'assurer la survie du virus dans des circonstances désavantageuses pour le développement des bâtonnets.

Nos observations sur les *coupes* d'organes de lapins tuberculeux sont à l'appui de cette hypothèse, ainsi que les résultats de la lyse expérimentale dans le péritoine du lapin.

(C'est au chapitre II que nous avons discuté l'examen des coupes d'organes tuberculeux; la lyse expérimentale est décrite p. 39.)

Le résultat positif de nos essais de culture avec des granules, isolés du liquide péritonéal du lapin, injecté quelques heures auparavant dans le péritoine avec des bacilles tuberculeux, a démontré la vitalité de ces granules et leur propriété de reproduire les bâtonnets.

Les coupes d'organes tuberculeux et les frottis du liquide péritonéal permettent d'apprécier la lutte du bacille tuberculeux et de son hôte, dont le stade granulaire est le résultat.

Quelle est la signification de cette transition?

La bactériolyse est un des modes de défense de l'organisme contre les microbes, lesquels, par suite des réactions humorales et cellulaires, sont désintégrés en fragments morts et par là rendus inoffensifs, telle est l'opinion généralement admise.

Nos cultures de bâtonnets acido-résistants ont démontré pour le bacille tuberculeux la réalité de ce qu'avaient supposé METCHNIKOFF et CANTACUZÈNE⁸⁹⁾ pour le vibron cholérique, à savoir que les produits granulaires de la bactériolyse ne sont point des débris *morts* du microbe, mais des formes vivantes, capables de reproduire la forme „normale”.

HADLEY⁸⁵⁾ a exprimé ainsi son hypothèse sur le résultat de la lyse:

„We must come to the conclusion that there is considerable difference between the apparent *lysis* of living cells and their actual death; for, in such instances, there may be involved merely a transformation into another living form with which we are only slightly acquainted.”

[„Nous devons admettre qu'il y a une différence considérable entre la *lyse* apparente des cellules vivantes et leur mort réelle; car dans ces circonstances il peut s'agir simplement d'une transformation en une autre forme vivante que nous ne connaissons que très peu”.]

Pour HADLEY cette transformation du bâtonnet en granules, cette „dissociation microbienne” est un moyen de défense de l'hôte, car sous sa forme granulaire le micro-organisme serait plus facile à phagocytter.

Dans nos expériences il n'y avait que très peu de granules phagocytés, la plupart étant libres, même 3 jours après l'injection dans le péritoine.

Trois jours après l'injection des bacilles dans le péritoine du lapin les granules qui en dérivent ont gardé encore leur vitalité.

Aussi doit-on envisager deux hypothèses:

1°. La transformation serait une victoire de l'organisme sur le germe infectant.

2°. Le bacille, se transformant en granules, résisterait mieux sous cette forme à la lutte de l'organisme.

Une série d'expériences *in vivo* doit répondre à ces questions, entamées par plusieurs auteurs, comme FONTÈS, RAVETLLAT et PLA Y ARMENGOL⁶⁸), MELLON⁹⁰), GINS et KARWACKI; nous y reviendrons.

Si l'on envisage la forme granulaire comme une „forme de résistance” du virus tuberculeux, il est difficile d'expliquer la grande quantité de granules des cultures *jeunes* dans certains milieux (milieu de SAUTON).

CALMETTE et ses collaborateurs, ainsi que d'autres auteurs, donnent cette présence comme un stade de développement entre le virus filtrable et le bâtonnet typique.

Nous préférons „expliquer” l'abondance de granules dans des cultures jeunes — comme l'a faite FONTÈS — en rappelant que le transport de microbes dans un milieu neuf cause la *lyse* d'un grand nombre d'entre eux.

La transition des bacilles tuberculeux en granules dans l'organisme animal dans les premiers moments qui suivent l'injection peut être ramenée à la même cause.

Bacilles granuleux et granules dans le matériel tuberculeux.

C'est dans du matériel tuberculeux (— pus d'abcès froid, organes de bovidés tuberculeux, etc. —) que MUCH a démontré la présence de granules, de chaînettes de granules et de bacilles granuleux, formes qui toutes sont non acidorésistantes; en outre on a attaché beaucoup d'intérêt aux granules et aux bacilles granuleux des crachats de tuberculeux, voulant savoir si ces formes ont une valeur de diagnostic ou de pronostic.

De nombreux expérimentateurs ont signalé ces éléments atypiques dans les crachats et ont cherché à en tirer des conclusions.

C'est surtout dans des cas de tuberculose *chronique* pulmonaire que les crachats contiennent beaucoup de formes granuleuses; ces malades se trouvent dans un stade peu évolutif de la maladie, leur température et leur poids sont peu modifiés.

Mais l'accord ne s'est pas fait sur la signification des formes granuleuses des crachats tuberculeux.

MUCH n'est pas convaincu du pronostic favorable des cas de tuberculose pulmonaire, dont les crachats présentent des granules Gramophiles; pour SCHULZ⁵⁹⁾ et SPENGLER²⁶⁾ un tel état microbien indique une amélioration clinique.

Quant aux bacilles granuleux, la plupart des investigateurs les considèrent comme des formes d'involution, de dégénérescence, peu virulentes; tel GEIPEL⁵¹⁾, LUCKSCH⁹⁾, LUBINSKY⁹²⁾, BAUMGARTEN⁴⁹⁾.

L'opinion inverse est défendue e.a. par BALMER et FRÄNZEL³²⁾, LAND⁹³⁾ et GORHAM⁹⁴⁾, pour qui le bacille granuleux est très virulent et se trouve surtout dans les processus aigus et fébriles.

Pour LICHTENHAHN⁶⁴⁾ la recherche des granules est très importante, surtout dans des circonstances qui ne permettent pas de passage sur l'animal. — La présence de

granules permettrait de diagnostiquer de bonne heure la tuberculose, d'après LICHTENHAHN.

Chez des malades, traités longtemps avec la tuberculine, FONTÈS⁹⁵⁾ constate l'absence fréquente de bacilles alcoolo-acido-résistants, tandis qu'il y a presque toujours beaucoup de granulations; ce matériel, injecté au cobaye, provoque une tuberculose.

La même observation est faite pour le pus d'abcès froid, et FONTÈS conclut:

„Ich glaube, hieraus schliessen zu müssen, dass die granuläre Form, wenn auch vielleicht nicht eine charakteristische Resistenzform, so doch zum mindesten eine Form von der grössten Widerstandsfähigkeit ist, welche der Tuberkelbacillus annehmen kann.”

[„Je crois pouvoir conclure de ces faits que la forme granulaire, n'étant peut-être pas une forme de résistance caractéristique, présente néanmoins une des formes les plus résistantes que le bacille tuberculeux puisse revêtir”.]

Ces contradictions exigent des expériences systématiques sur la virulence des formes granuleuses.

Les nôtres n'ayant porté que sur le bacille tuberculeux aviaire, bâtonnet très granuleux d'habitude, nous ne pouvons avoir une opinion sur ce problème.

Indiquons seulement quelques observations, faites à ce sujet:

Les cultures très virulentes pour le lapin, provoquant la mort en 15 jours après inoculation veineuse, étaient composées de bacilles très granuleux et de granules libres.

Les cultures, riches en bacilles granuleux, contenaient toujours également beaucoup de granules. —

Dans certains cas de tuberculose, l'abondance de granules Gramophiles dans les crachats avec absence de bâtonnets pourrait peut-être s'expliquer ainsi:

Cette flore spéciale devrait être considérée comme le résultat d'un équilibre entre l'organisme et le microbe,

lutte où ce dernier n'est pas détruit, mais transformé en état de granules, vivants et capables de reproduire le bâtonnet dans des circonstances plus favorables.

En 1928 LUDWIG LANGE⁹⁶⁾ déclare:

„Der bislang eingenommene ablehnende Standpunkt bezüglich der MUCHschen Formen des Tuberkelbazillus kann nicht mehr aufrecht erhalten werden.”

[„On ne peut plus défendre l'opinion, admise depuis longtemps qui nie l'existence des formes de MUCH du bacille tuberculeux.”]

On ne doute plus de la réalité des formes décrites par MUCH, mais on n'est toujours pas plus instruit de leur virulence et de leur rôle dans la pathogénie tuberculeuse.

Il nous semble que la technique dont nous nous sommes servies pour ces expériences puisse finalement nous renseigner à ce sujet.

Pour l'interprétation des formes atypiques du virus tuberculeux on a émis de nombreuses hypothèses, dont nous voulons relever quelques-unes.

RAVETLLAT et PLA Y ARMENGOL⁶⁸⁾ de Barcelone déclarent:

„Nos investigations nous ont conduits à une conception différente de la bactéries de la tuberculose et avec cela à une nouvelle conception de la maladie.”

Et plus loin: „.... nous soutenons que la bactéries de la tuberculose dans l'organisme et dans le virus naturel se présente sous 3 formes différentes qui ont influence dans l'évolution du procès.” — Ces 3 formes, réversibles entre elles, sont:

1. La bactéries d'attaque, un coccus, non acido-résistant.
2. La bactéries intermédiaire ou forme de transition. Cette forme comprend: La phase germinative du bacille de KOCH dans les cultures; les granules de MUCH; les corpuscules intracellulaires du caséum et de quelques sérosités tuberculeuses.

3. Le bacille de KOCH ou forme de résistance.

En décrivant la bactérie d'attaque les auteurs disent:

„La bactérie que nous venons de décrire ne ressemble en rien à celle que l'on considère comme la cause de la tuberculose. Nonobstant cette bactérie a été vue dans les lésions ou dans le virus tuberculeux naturel, e.a. par KOCH, GAFFKY ⁹⁷), COURMONT, MALASSEZ et VIGNAL, MUCH, RIST, KINDBERG et ROLLAND ⁹⁸), BEZANÇON et DE SERBONNES; mais croyant le problème bactériologique de la tuberculose résolu, c'est à peine s'ils lui ont donné de l'importance, supposant que son existence représente un rare accident et la considérant comme une étrange association microbienne ou comme le produit de la désintégration du bacille de KOCH.

Pourquoi donc la considérons-nous comme une des formes de la bactérie de la tuberculose? Parce qu'on la trouve toujours dans toutes les lésions actives de la maladie ou on peut l'en obtenir; par sa réversibilité avec les autres formes, et parce que dans des conditions spéciales, elle reproduit la maladie.”

Ils finissent leur article par ces mots-ci:

„Cette conception permet d'expliquer une longue série de faits bien observés qui restaient sans explication possible d'après la doctrine du bacille de KOCH comme unique forme de la bactérie de la tuberculose et en outre elle ouvre des nouveaux horizons pour une étude meilleure et plus efficace (pathogénique, clinique, prophylactique) de la maladie.”

Nous ne pouvons partager qu'en partie l'opinion des expérimentateurs cités qui, d'après nous, vont trop loin dans leurs conclusions sur le rôle des différentes formes du virus tuberculeux; leurs expériences, décrites en détail, demandent à être reprises, vérifiées et interprétées de nouveau. —

Dans ses publications sur la „Pluralité des types bacil-

laïres dans les cultures tuberculeuses" et la „Mutation du bacille tuberculeux dans le liquide des pleurésies tuberculeuses" KARWACKI⁹¹) émet l'opinion que nous ne possédons pas actuellement de cultures tuberculeuses „pures", constituées par une seule race, par un seul type antigénique, mais qu'elles présentent un mélange de divers types antigéniques de bacilles tuberculeux.

En cultivant le bacille tuberculeux dans des liquides pleurétiques il a souvent observé une dissociation morphologique de la culture ensemencée: „Une petite partie des bacilles gardaient leur acido-résistance, tandis que le reste subissait une mutation en cocci ou bâtonnets privés d'acido-résistance".

Ces observations sont tout à fait superposables aux nôtres dans le phénomène de la lyse expérimentale dans le péritoine du lapin tuberculeux.

Les „mutations", obtenues avec une quantité de liquides de pleurésies tuberculeuses, justifient pour KARWACKI ces conclusions:

„Il existe une certaine relation entre le caractère clinique d'une pleurésie et le pouvoir transformant du liquide. Ce pouvoir transformant est grand surtout dans les cas de pleurésies aiguës."

„La mutation possède donc une certaine valeur pour le pronostic, facilement compréhensible, en admettant que la rétrocession du processus pleural dépend dans une certaine mesure de la mutation du virus en une forme privée d'acido-résistance, plus facile à digérer et à détruire."

Plus loin encore:

„Mes recherches confirment l'existence du pouvoir bactériolytique dans des épanchements tuberculeux sans préciser encore sa nature intime. Ce fait possède certainement quelque valeur pour la question de l'immunité tuberculeuse, si obscure et si embrouillée."

KARWACKI termine son premier article par cette phrase:

„En résumé, mes études sur les anticorps contenus dans les épanchements tuberculeux suggèrent l'idée que le virus tuberculeux, contenu dans des cultures de Bacilles tuberculeux, est complexe.”

Comme nous l'avons expliqué plus haut, nos observations nous portent à considérer la forme granulaire comme forme de résistance, ce qui est l'inverse de l'hypothèse de KARWACKI.

Des expériences ultérieures doivent vérifier l'hypothèse de KARWACKI dans laquelle les différentes formes du virus tuberculeux seraient des différentes types antigéniques.

Un an après, HADLEY⁸⁵⁾ publie un article sur la dissociation microbienne, où il défend la théorie du cycle évolutif des microbes contre l'exclusivisme des bactériologistes orthodoxes avec leur dogme de monomorphisme.

En ce qui concerne le bacille tuberculeux cet investigateur prédit:

„Although we at present have little knowledge regarding dissociative reactions in the tubercle bacillus, it cannot be doubted that here, as in other types of infection, the eventual discovery of different forms of culture will sometime play an important part in problems of prophylaxis and therapeutics.”

[„Malgré le fait qu'à présent nous ne savons que très peu sur les réactions de dissociation du bacille tuberculeux, il n'y a pas de doute que la découverte de formes de culture différentes joue un jour un rôle important dans les problèmes de la prophylaxie et de la thérapeutique”.]

Rappelant les expériences de KARWACKI et de GRIFFITH (1923) sur les anticorps bactériotropiques, dont l'action pourrait être expliquée par une précipitation de la dissociation microbienne *in vivo*, HADLEY fait la remarque suivante:

„If this view of the matter should eventually prove to be true, it is possible that the aim of much therapeutic endeavour might undergo significant modification. At the

present time we often seek to destroy microorganisms which have established an infection in the blood or tissues and we have become accustomed to measure the expected efficiency of the destructive agents by ascertaining their germicidal power *in vitro*; we look for the killing power of the substance and trust that the effect in the body may be on the same order. It might be the outcome of such a new conception as I have outlined above, that we should strive not so much to destroy directly the microbes infecting the blood or tissues, as to stimulate dissociation *in vivo*; and so permit the organisms to work out their own destruction while aided by the phagocytes."

[„Si cette manière de voir serait démontrée d'être juste, il est possible que le but de beaucoup d'essais thérapeutiques soit modifié radicalement. Actuellement nous tâchons souvent de détruire les micro-organismes qui ont causé une infection dans le sang ou dans les tissus et nous avons pris l'habitude de déterminer l'action des substances destructives en vérifiant leur pouvoir germicide *in vitro*; nous contrôlons le pouvoir tuant des substances et supposons que l'effet dans le corps soit du même ordre.

Une conception nouvelle comme celle, dont j'ai parlé plus haut, pourrait effectuer que notre but serait moins de détruire les microbes infectants directement, mais plutôt une stimulation de la dissociation microbienne *in vivo*; de cette façon on permettrait les micro-organismes de collaborer à leur propre destruction, aidés par les phagocytes.”]

On ne peut discuter sur la valeur de cette hypothèse avant d'avoir vérifié, si vraiment la transformation du microbe dans l'organisme marque la victoire de la défense organique sur le microbe; nos observations sur le bacille tuberculeux sont plutôt à l'appui de l'opinion inverse.

MORTON KAHN⁹⁹) décrit un cycle de développement du bacille tuberculeux, tout en admettant que peut-être le cycle évolutif du bacille tuberculeux ne puisse être réalisé qu'en certains milieux artificiels et avec certaines souches et non dans le corps animal.

Finalement, convaincu de la réalité des différentes formes atypiques du virus tuberculeux, KAHN avertit:

„L'absence de bacilles acido-résistants colorables ne doit pas exclure la possibilité de l'existence d'une infection tuberculeuse. L'importance de l'inoculation à l'animal se trouve ainsi accrue.”

Ajoutons à ce conseil celui de rechercher des formes du virus tuberculeux sur des frottis qui sont colorés, non seulement d'après la méthode de ZIEHL—NEELSEN, mais encore selon celle de GRAM—MUCH ou, mieux, celle de FONTÈS.

Nous voulons citer quelques passages d'un article de CALMETTE et VALTIS¹⁸), paru en juin 1930.

p. 656: „Il faut désormais admettre que la tuberculose.... ne représente que la forme chronique ou la phase terminale d'une infection réalisée d'abord par un ultravirüs dont les éléments présentent un cycle d'évolution très spéciale.”

Et plus loin, discernant entre „granulémie prébacillaire” et „bacillose” :

„On réservera alors le terme de tuberculose, ou mieux de bacillose, aux infections généralisées ou localisées que caractérise la formation de nodules tuberculeux ou tubercules, et qui évoluent ordinairement avec une allure chronique.

Depuis longtemps déjà BAUMGARTEN, et plus récemment E. SERGENT, avaient pressenti l'existence d'une „étape prébacillaire virulente” précédant les localisations tuberculeuses. Or celles-ci ne sont, en réalité, que le dernier acte d'un drame dont le prologue a été une infection générale lymphatique ou sanguine réalisée soit par l'ultravirüs, soit par les formes d'abord granuliques, puis bacillaires qui en dérivent.”

Nous espérons avoir un peu contribué par nos recherches à la révélation de l'intrigue du drame de la tuberculose, tout en nous rendant compte de la multiplicité des problèmes qu'il reste à élucider.

RESUME.

Des expériences sont décrites qui ont démontré la présence probable d'une forme granulaire du bacille tuberculeux aviaire dans les tissus de lapins, inoculés par voie veineuse avec des cultures de ce bacille.

L'examen des coupes d'organes nous a inspirées à poursuivre nos recherches sur les granules en appliquant la technique de la culture unicellulaire.

Nous avons réussi de prouver la transition de granules en bacilles et vice versa, et cela aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

SUMMARY.

A series of experiments were described, which demonstrated the probable existence of a granular phase of the avian tubercle bacillus in the tissue of rabbits, inoculated in the veins with cultures of this bacillus.

The study of the sections of the organs led us to continue our research on the granules by applying the single-cell technic.

We succeeded in proving the transition of granules into bacilli and vice versa and this *in vitro* as well as *in vivo*.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

1. ROBERT KOCH : Mitteil. Kaiserl. Gesundh. amte, Bd. **2**, 1884.
2. BABES : in CORNILLE et BABES : Les Bactéries. 3me Ed., p. 382.
3. STRAUSS : La Tuberculose et son Bacille, p. 168. Paris. 1895.
4. MUCH : Beitr. z. Klinik d. Tuberk., t. **8**, (1907).
5. FONTÈS : Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, 1910^{II}, fasc. II, p. 141.
6. VAUDREMER : Paris Méd., I, p. 26 (1924).
7. BEZANÇON et PHILIBERT : Presse Méd., t. **34**, p. 33.
8. VALTIS : Soc. de Biol. 1924, p. 19 et p. 1130.
Ann. Inst. Pasteur, p. 453 (1924).
9. LUCKSCH : Centr. Bakt. Parasitenk. I. Abt. Orig. t. **117**, p. 1.
10. BORREL : Ann. Inst. Pasteur, t. VII, p. 595 (1892).
11. SCHOUTEN : Handel. Natuur- en Geneesk. Congres, Haarlem 1899.
Z. wiss. Microsc. u. f. Microsc. Techniek, Bd. **22**, p. 10 (1905).
12. KAHN et TORREY : Am. Review of Tuberc., t. **18**, p. 815 (1928).
13. PETRAGNANI : Bull. Inst. Sieroterapico Milanese, fasc. 3, juin 1926.
14. WRIGHT : The Lancet, 1924^I, p. 218.
15. CALMETTE et VALTIS : Ann. Inst. Pasteur, t. XLIV, p. 629, 1930.
16. HOLLANDE et CRÉMIEUX : Compt. rend. Soc. Biol., t. **98**, 1928^I, p. 1379.
17. WAMOSCHER et STOECKLIN : Centr. Bakt. Orig. t. **104**, 1927, p. 86.
18. CALMETTE et VALTIS : Ann. Inst. Pasteur, t. **44**, 1930, p. 629.
19. NINNI : Compt. rend. Acad. Sc., **190**, 1930, p. 597.
20. VAN DEINSE : Compt. rend. Soc. Biol., 25 mai 1929.
Ned. Tijdschr. Geneesk., t. **74**, p. 1596 (1930).
21. LOEWENSTEIN : Deutsche med. Wochenschr. **24**, p. 1010. (1930).
22. EHRLICH : Charitee-Ann., t. XI. (1886).
23. DEYCKE : Münch. med. Wochenschr. **12**, (1910).
24. NOCARD et ROUX : Ann. Inst. Pasteur, t. I (1887).
25. SPENGLER : Z. Hyg. u. Infekt. krankh., t. **49**, p. 541, (1905).
26. SPENGLER : Deutsch. med. Wochenschr. p. 337. (1907).
27. VON BETEGH : Centr. Bakt., t. **49**, p. 461.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

28. KRONBERGER : Beitr. Klinik d. Tuberkulose, t. **16**,
29. FUCHS-WOLFRING : Beitr. Klinik d. Tuberkulose, t. **9**, t. **10**.
30. KNOLL : Corresp. bl. f. Schweizer Aerzte, 1911, No. 2, p. 49.
Beitr. Klinik d. Tuberkulose, t. **15**, fasc. 2 (1910).
31. FONTÈS : Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, t. **18**, fasc. I, p. 163.
32. BALMER et FRÄNTZEL : Berl. Klin. Wochenschr., 1882, No. 45.
33. MARPMANN : Centr. Bakt. Orig. **14**, 229 (1893).
34. NEGRI : J. Micrographie, VIII^e année, No. 6.
35. BEZANÇON et PHILIBERT : Presse Méd., t. **34**, p. 33.
36. KAST : Schweiz. med. Woch., No. 2, 1929.
37. METCHNIKOFF : Virchow's Arch., t. **113**, p. 1888.
38. BABES et LEVADITI : Arch. méd. exp. et d'anat. pathol. 1897, No. 6.
39. COPPEN JONES : Centr. Bakt., t. **17**, 1895.
40. NEUKIRCH : Thèse, Strassburg, 1902.
41. FRIEDRICH : Deutsche med. Woch. schr. 1897, No. 41.
42. LUBARSCH : Z. Hyg. u. Infekt. krankh., t. **31**, 1899.
43. SCHULTZE : Z. Hyg. u. Infekt. krankh., t. **31**, 1899.
44. LEVÝ : Centr. Bakt., t. **26**, No. 1.
Centr. Bakt., t. **33**, 1902.
45. E. KLEIN : Centr. Bakt. t. **7**, No. 25 (1890).
46. FISCHEL : Unters. über die Morphologie und Biologie des Tuberkulose-erreger. Wien, 1893.
47. SANDER : Arch. Hyg., t. **16**, 1893.
48. BRÜNS : Centr. Bakt., t. **17**, 1895.
49. BAUMGARTEN : Z. klin. Med. VI, 1883, p. 61.
Centr. klin. Med. 1884, No. 22.
50. CORNET et MEYER : in Kolle u. Wasserman's Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen, 1903, Bd. II.
51. GEIPEL : Münch. med. Woch. 1909.
52. WOLFF : Münch. med. Woch. 1909, No. 45.
53. WEISS : Münch. med. Woch. 1909, No. 9.,
Berl. klin. Woch., 1909, No. 47.
Berl. klin., Woch., 1909, No. 40.
54. BERGEL : Beitr. Klinik d. Tuberkulose, t. **38**.
55. VON BEHRING : Tuberkulosis, t. **6**, 1907.
56. LIEBERMEISTER : Deutsche med. Woch. 1909.
57. WIRTHS : Münch. med. Woch. 1908, p. 1687.
58. SCHOTTMÜLLER : Münch. med. Woch. 1908, p. 2564.
59. SCHULZ : Deutsche med. Woch. 1909.
60. ROSENBLATT : Münch. med. Woch. 1909, No. 40.
61. WEHRLI et KNOLL : Beitr. Klinik d. Tuberkulose, t. **14**.
62. BITTROLFF et MOMOSE : Deutsche med. Woch., 1912, p. 16.
63. ARONSON : Berl. klin. Woch. No. **35**, 1910, p. 1617.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

64. LICHTENHAHN : Corresp. bl. f. Schweizer Aerzte, 1910, No. 33, p. 1109.
65. HOFFMANN : Z. Krankh. forschg. **7**, (1929).
66. ALMQVIST : J. Infect. Dis. 1922, **31**, p. 483.
67. LÖHNIS : Centr. Bakt. 2. Abt., t. **56**, 529 (1922).
68. RAVETLLAT et PLA Y ARMENGOL : Publicaciones del Instituto Ravetllat-Pla, Barcelona, No. 2, Mai 1924.
69. GOTTSCHLICH : Die Verbreitung der Tuberkelbacillen im Staub von Räumen mit starkem Menschenverkehr. — Breslau 1903. Centr. Bact. Orig. **93¹**, 2 (1924).
70. CALMETTE : L'infection bacillaire et la Tuberculose chez l'Homme et chez les Animaux. 3me Ed. Masson, Paris.
71. v. d. LEE : Thèse, Utrecht 1928.
72. A. KLEIN : Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1929, I, No. 13, p. 1562.
73. L. LANGE : Centr. Tbk. forschg. **30**, fasc. 3/4, 1928.
74. KOCH in : NAEGELE : Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten und der Gesundheitspflege. München, 1877.
75. MAFFUCCI : Z. Hyg. u. Infekt. Krankh., t. **11**, p. 445.
76. ENDERLEIN : Bakterien-Zyklogenie, 1905.
77. SWEANY : Am. Review of Tuberc., t. **18**, p. 630 (1928).
78. VAN DEINSE : Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1930, t. **74**, No. 13, p. 1596.
79. SAUTON : Compt. rend. 1912, 155, 1860.
80. BEZANÇON et PHILIBERT : Soc. Etudes scient. sur la Tuberculose, 12 mars 1914. (t. **32**).
81. MAMOREK : Berl. klin. Woch. 1907, **44**, 18.
82. LEGROUX et MAGROU : Ann. Inst. Pasteur, t. **34**, 417, 1920.
83. NÈGRE, BOQUET et VALTIS : Ann. Inst. Pasteur, t. **44**, No. 3, p. 247.
84. LEHMANN et NEUMANN : Bakteriol. Diagnostik (1912).
85. HADLEY : J. Infect. Dis. **40**, No. 1, 1927, p. 1.
86. FERRAN : Compt. rend., 11 oct. 1897.
87. E. KLEIN : Centr. Bakt. 1890, t. **7**, No. 25, p. 793.
88. CALMETTE : Presse méd., 19 mars 1930.
(METCHNIKOFF : Ann. Inst. Pasteur, t. **9**, 1895, p. 433.)
89. (CANTACUZÈNE : Ann. Inst. Pasteur, t. **12**, 1898, p. 273.)
90. MELLON : J. of Bact., t. **11**, 1926, p. 203.
91. KARWACKI : Compt. rend. Soc. Biol., t. **99**, p.p. 1150, 1152.
KARWACKI : Compt. rend. Soc. Biol., t. **99**, p.p. 1171, 1173.
92. LUBINSKY : Centr. Bakt. I. Orig. t. **91**, p.p. 372 et 464, (1924).
93. LAND : Thèse, Leiden 1906.
94. GORHAM : Centr. Bakt. t. **31**, p. 304 (1902).

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

95. FONTÈS : Centr. Bakt. Orig., t. **49**, p. 317.
96. L. LANGE : Centr. Tbk. forschg. **30**, fasc. 3/4, 1928.
97. GAFFKY : Mitteil. Kaiserl. Gesundh. amte, Berlin 1881, p. 127.
98. RIST, KINDBERG et ROLLAND : Ann. de méd. I, p.p. 310, 375.
RIST, KINDBERG et ROLLAND : Ann. de méd. II, p. 13.
99. KAHN : Ann. Inst. Pasteur, t. **44**, 1930, p. 259.
100. RABINOWITCH : Z. Tuberkulose, t. **52**, 18 (1928).
101. KIRCHENSTEIN : Travaux Labor. Microbiol. Univ. Latvie, No. 2, 1923.

TABLE DES MATIÈRES.

	Page
PRÉFACE	IX
CHAPITRE I.	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE II.	
LES STADES DE TRANSITION DU BACILLE TUBERCULEUX	
AVIAIRE IN VIVO. ETUDE HISTOLOGIQUE	4
Partie expérimentale	6
<i>Description des Coupes</i>	7
Coupes de Rate de Tuberc. aviaire	8
Coupes de Rate de Lapin normal	12
B. Tuberc. aviaire tué	12
Bac. Anthracoïdes (rate)	12
Coupes de Poumons de tuberc. aviaire	13
Bac. Anthracoïdes (poumon)	14
<i>Discussion des Coupes</i>	14
Coupes de Rate	15
Coupes de Poumon	16
,,Phénomène de PFEIFFER"	16
CHAPITRE III.	
LES STADES DE TRANSITION DU BACILLE TUBERCULEUX	
AVIAIRE IN VITRO	19
<i>Description de l'Appareil</i>	19
<i>Description des Instruments</i>	22

1.5816

STELLINGEN.

- I. Ten onrechte meenen SERVER KIAMIL en RASSIM AALI met hun proeven over den invloed van verwarming op serum de omzetting albumine \leftrightarrow globuline verwezenlijkt te hebben.

C. R. Soc. Biol. **98**, 1419.

- II. Daar nog steeds niet afdoende bewezen is, dat inderdaad het werkzame bestanddeel van chloor-kalk een gemengd zout van zoutzuur en onder-chlorigzuur zou zijn, is het voorbarig, deze formule reeds nu op te nemen in de leerboeken voor de school.

- III. De opvatting van PRINGSHEIM, dat amyrum een polymerisatie-product van trisacchariden zou zijn, is te verkiezen boven KARRER's anhydro-maltose type.

H. PRINGSHEIM: Die Polysaccharide.
P. KARRER: Polymere Kohlenhydrate.

- IV. Het is waarschijnlijker, dat galkleurstof ontstaat door eenvoudige omzettingen van het haemineskelet, dan door wederopbouw uit de totaal afgebroken kleurstofcomponenten van het haemoglobine.

- V. De gronden, welke HANSEN aanvoert voor de opstelling van zijn formules voor tetrahydro-alanitolacton, zijn aan bedenkingen onderhevig.

Ber. **64**, 67 (1931).

- VI. De therapeutische waarde van Ferrum pulveratum is groter dan die van Ferrum reductum. (Ned. Pharmacopee, Ed. V).

Pharm. Weekbl. **67**, 1051.

- VII. Bij het zoeken naar tuberkelbacillen in verdacht tuberculeus materiaal verdient het aanbeveling, naast de ZIEHL-NEELSEN kleuring ook die volgens FONTÈS toe te passen.
- VIII. Het is voorloopig niet gewenscht, de B.C.G.-enting anders dan in de uiterste gevallen toe te passen; men wachte met eventuële uitbreiding van het aantal entingen tot men beschikt over een voldoende hoeveelheid dwingend-gunstige gegevens hieromtrent van volwassenen, die in hun eerste levensjaren met dit vaccin werden behandeld.
- IX. De techniek van LUCKSCH voor het aantoonen van filtreerbare vormen van den tuberkelbacil is niet onberispelijk en dientengevolge verwerpelijk.
- Centr. Bakt. Parasitenk. I Abt. Orig. 117, 1.
- X. Ter vermindering van misverstand verdient het aanbeveling, de term „*microbiologie*” in te voeren voor de leer der microben.
- GILTNER: *Microbiology*.
- XI. De uitspraak, dat de tuberkelbacil zich vermenigvuldigt door verlenging van de staafjes met opvolgende dwarsdeeling, berust niet op waarnemingen.
- CALMETTE: *L'infection bacillaire et la Tuberculose chez l'Homme et chez les Animaux*.
- XII. Het is voor den meergevorderden chemicus gewenscht, zich wijsgeerig op zijn studie-object te bezinnen.
- XIII. Terecht beweert GOEDEWAAGEN:
„De chemische eigenschap is slechts het symbool van een tijdelijk-causale relatie, van een proces.”
(p. 92).
- Dr. T. GOEDEWAAGEN: *Summa contra Metaphysicos*.
- XIV. Ook in de chemische inductie is de deductie voorondersteld.

