

ETUDE HISTOLOGIQUE DES LESIONS PROVOQUEES PAR
LE BACILLE DE HANSEN ET LE *MYCOBACTERIUM MARIANUM*
SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE DE
L'EMBRYON DE POULET

R. NOEL

Professeur d'Histologie
Faculté de Médecine à Lyon

ET SR. MARIE-SUZANNE

Directrice du Laboratoire de Recherches sur la Lèpre
Facultés Catholiques de Lyon, France

Nous avons étudié parallèlement les effets produits sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, par l'inoculation du Bacille de Hansen et du *Mycobacterium marianum*. Voici quels sont les résultats obtenus.

I. LESIONS DU BACILLE DE HANSEN

Des oeufs, incubés de 6 à 9 jours, ont été inoculés sur la membrane chorio-allantoïdienne selon la méthode de Goodpasture modifiée par l'un de nous. Les bacilles utilisés provenaient de broyats de lépromes prélevés sur 4 malades différents.

Sur 9 séries, formant un total de 120 oeufs inoculés, les embryons n'ont survécu que dans 82 cas. Les prélèvements ont été faits 9 ou 10 jours après l'inoculation. Les membranes ont été fixées par le liquide de Hollande et les préparations colorées par la méthode de Ziehl avec coloration complémentaire des noyaux sur l'hémalun.

A l'examen le point d'inoculation est marqué, macroscopiquement, par une zone épaissie et hypervascularisée. Au microscope, on retrouve là un granulome constitué par des histiocytes contenant des bacilles, quelques cellules lymphocytiformes, quelques éléments rappelant les cellules de Virchow, quelques cellules géantes vacuolisées dans lesquelles on peut voir de rares bacilles bien colorés, et des grains de pigment brun-ocre.

La membrane chorio-allantoïdienne est nettement épaissie, l'épithélium est pluristratifié; on retrouve quelques bacilles en surface ou en cours de migration au travers des strates épithéliales.

Le mésenchyme sous-jacent est semé de petits nodules péricytaires, périvasculaires, où l'on remarque des bacilles plus ou moins nombreux qui semblent altérés; certains sont phagocytés par les histiocytes périthéliaux, d'autres sont libres dans les espaces intercellulaires. Les éosinophiles sont nombreux au voisinage de ces nodules; quelques-uns sont même situés à l'intérieur. D'autres essaient, au contraire, à grande distance, loin du point d'inoculation. Signalons, enfin, de place en place, la présence de petites plaques où les histiocytes réactionnels prennent une vague allure épithélioïde.

En somme, et sans forcer les termes, on peut dire que les bacilles de Hansen, après avoir franchi la barrière épithéliale, se propagent, sous leur forme normale ou plus ou moins altérée, à l'intérieur du mésenchyme.

II. LESIONS DU MYCOBACTERIUM MARIANUM

Dans les mêmes conditions de technique que pour le bacille de Hansen, nous avons inoculé avec le *M. marianum* des oeufs de poule incubés de 6 à 9 jours. 109 oeufs ont été traités avec une émulsion de bacilles cultivés sur Petraghani, dans du sérum physiologique à raison d'une goutte projetée sur la membrane chorio-allantoïdienne, par inoculation.

A l'examen le point d'impact de la goutte est marqué macroscopiquement par un épaississement net de la membrane, autour duquel irradiant des vaisseaux turgescents. Une des membranes prélevées, placées dans un ballon contenant du milieu de Sauton, a donné une culture de bacilles acido-résistants. Les autres membranes ont été fixées au liquide de Hollande et les préparations ont été colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen.

L'examen histologique révèle à le point d'inoculation un granulome formé de nodules histiocytaires chargés de bacilles. L'épithélium est épaissi; on voit quelques bacilles migrer dans ses couches constitutives et atteindre le mésenchyme sous-épithélial où ils semblent être libres.

En dehors du point d'inoculation, et jusqu'à une très grande distance, le mésenchyme est semé de petits amas d'histiocytes bacillifères entourés de lymphocytes. Les bacilles sont bien colorés, apparemment non altérés.

Ces amas sont presque toujours centrés par des vaisseaux. Cette localisation périvasculaire, en quelque sorte élective, laisse supposer que les éléments microbiens sont dispersés par voie sanguine.

Il nous semble utile de souligner ici la vitalité apparente des bacilles, presque toujours en bâtonnets, intensément colorés par la fuchsine. La preuve de cette vitalité peut encore être tirée du fait que la remise en culture, suivie d'un résultat positif, a été possible à partir d'une membrane chorio-allantoïdienne inoculée 9 jours avant.

III. EDIFICATIONS CRISTALLINES RENCONTRÉES

Dans une note déposée à l'Académie des Sciences en 1949 et publiée en 1953, nous avons signalé l'apparition de cristaux à la surface de la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, 8 jours après l'inoculation de bacilles de Stéfansky prélevés sur le rat infecté.

En 1953, avec un certain nombre de collaborateurs, phsiciens et chimistes, nous avons constaté que des faits analogues se produisent après inoculation, dans les mêmes conditions, soit, d'un broyat de nodule lépreux récemment prélevé sur un malade, soit, d'une émulsion de culture de *M. marianum* (souche Chauviré).

On voit souvent, apparaître macroscopiquement à la surface de la membrane chorio-allantoïdienne du poulet, 8 jours après l'inoculation du bacille de Hansen, ou du *M. marianum*, comme du Stéfansky, de petits amas

de matière blanchâtre, pouvant atteindre la grosseur d'une tête d'épingle, amas isolés ou confluent et essaimant sur toute la surface de la membrane. Ces amas se montrent formés, aux forts grossissements, par des cristaux de couleur jaunâtre. Ces édifications cristallines sont insolubles dans les fixateurs usuels.

Les essais de production en dehors de l'oeuf sont restés négatifs. Par contre, l'ensemencement de ces cristaux sur du blanc d'oeuf mis à la glacière à 2°, pendant 12 heures, puis à l'étuve à 37° pendant une semaine, avant d'être gardé à la température ambiante pendant un mois, a permis d'obtenir une propagation de cristaux dans tout le milieu. Ces formations cristallines ont été rencontrées dans 37,4 pour cent des oeufs inoculés avec le Hansen, 32,4 pour cent des oeufs inoculés avec le Stéfansky, 34 pour cent des oeufs inoculés avec le *M. marianum*.

Des recherches de différents ordres ont été poursuivies sur ces cristaux. Nous en donnons ici les premiers résultats.

Etude cristallographique.—L'examen au microscope polarisant, des échantillons obtenus dans les cultures, semble aboutir à la conclusion que ces cristaux appartiennent à une espèce cristalline, peut-être orthorhombique. Ils sont optiquement négatifs; l'angle des axes optiques est voisin de 60°; les indices sont compris entre, 1,515 et 1,560.

Etude chimique.—L'analyse élémentaire, de la partie organique effectuée sur des cristaux soigneusement isolés a donné: C = 30,87%; H = 3,83% N = 24,08%. Les pourcentages théoriques correspondant à C_6H_5N , pour cette partie organique, sont respectivement: C = 30,88%; H = 3,89%; N = 24,01%. Le résidu à la calcination (cendres) représente 11,7% du poids des cristaux. Une première étude spectrale indique, de façon certaine, la présence de calcium.

Stabilité thermique.—Examinés au microscope à platine chauffante Kofler jusqu'à 350°C, les cristaux demeurent pratiquement inchangés jusque 250°C; ils se ternissent ensuite légèrement sans déformation sensible et sans fondre.

Il est, jusqu'à présent, prématuré de donner d'après ces seules observations des indications précises sur la nature chimique de ces cristaux, non plus qu'une hypothèse sur le mécanisme de leur formation. Lorsque nous aurons pu en séparer des quantités suffisamment importantes à l'état pur, nous espérons pouvoir leur appliquer des techniques d'identifications plus complètes permettant de les décrire avec certitude.

CONCLUSIONS

Inoculé sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet, le bacille de Hansen provoque des lésions sensiblement identiques à celles produites par le *M. marianum*. Dans les deux cas, les bacilles pénètrent au travers de l'épithélium et se répandent dans le mésenchyme, jusqu'à une très grande distance, inclus dans de petits amas d'histiocytes bacillifères, amas presque toujours centrés par des vaisseaux. En ce qui concerne le *M. marianum*, la preuve de sa vitalité a pu être démontrée par la remise en culture, à partir d'une membrane chorio-allantoïdienne, inoculée depuis 9 jours.

Dans un certain nombre de cas, les membranes inoculées avec le *M.*

marianum, comme celles inoculées par le Hansen ou par le Stéfansky, se recouvrent de petits amas de cristaux mélangés à des bacilles plus ou moins altérés. On peut les ensemercer dans certaines conditions sur du blanc d'oeuf et obtenir ainsi une augmentation considérable de leur nombre. Ces cristaux ont fait l'objet d'une étude physico-chimique encore incomplète.

ABSTRACT

The authors first describe lesions produced in the chorio-allantoic membrane of chicken embryos by the inoculation of leprosy bacilli obtained from patients, and then the essentially similar lesions resulting from similar inoculations with suspensions of cultures of *M. marianum*. In both cases the bacilli pass through the epithelium and spread in the mesenchyme for considerable distances. They are found included in small masses of histiocytes, which are almost always centered by blood vessels. With respect to the viability of the marianum bacilli, that can be demonstrated by subcultures from chorio-allantoic membranes inoculated nine days previously.

In a certain number of instances, membranes inoculated with the mycobacteria that have been used (the Hansen, Stefansky, and marianum bacilli) have become covered with small masses of crystals mixed with more or less altered bacilli. Under certain conditions these crystals, seeded on egg white, show a considerable increase in numbers. These crystals have been made the subject of a physico-chemical study which is not yet complete.

BIBLIOGRAPHIE

1. MARIE-SUZANNE, SR. Culture du bacille de Stéfansky sur embryon de poulet. *Compt. rend. Soc. Biol.* **142** (1948) 35.
2. NOEL, R. et MARIE-SUZANNE, SR. Du mode de propagation du bacille de Stéfansky inoculé dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. *Ann. Inst. Pasteur* **86** (1949) 535-538; *reprinted in English in Internat. J. Leprosy* **18** (1950) 395-398.
3. NOEL, R., MARIE-SUZANNE, SR., CORDET, P., PARIS, R. A., CHAPAS, G. et RICHARD, R. Sur la formation de cristaux provoquée par l'inoculation de divers bacilles acido-résistants sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. *Compt. rend. Acad. Sci.* **236** (1953) 538-540.
4. NOEL, R. et MARIE-SUZANNE, SR. A propos de la formation de cristaux sur la membrane d'embryon de poulet inoculée avec des bacilles de Stéfansky. *Compt. rend. Acad. Sci.* **236** (1953) 753-754.

DESCRIPTION DES PLANCHES

PLANCHE 16

FIGS. 1 & 2. Vue topographique du point d'inoculation de la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poulet inoculée depuis sept jours, avec le Bacille de Hansen (Fig. 1), et avec le *Mycobacterium marianum* (Fig. 2).

FIGS. 3 & 4. Vue au grossissement moyen de la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poulet inoculée depuis sept jours. Lésions observées à distance du point d'inoculation, présence de nodules dans le mésenchyme, avec le Bacille de Hansen (Fig. 3), et avec le *M. marianum* (Fig. 4).

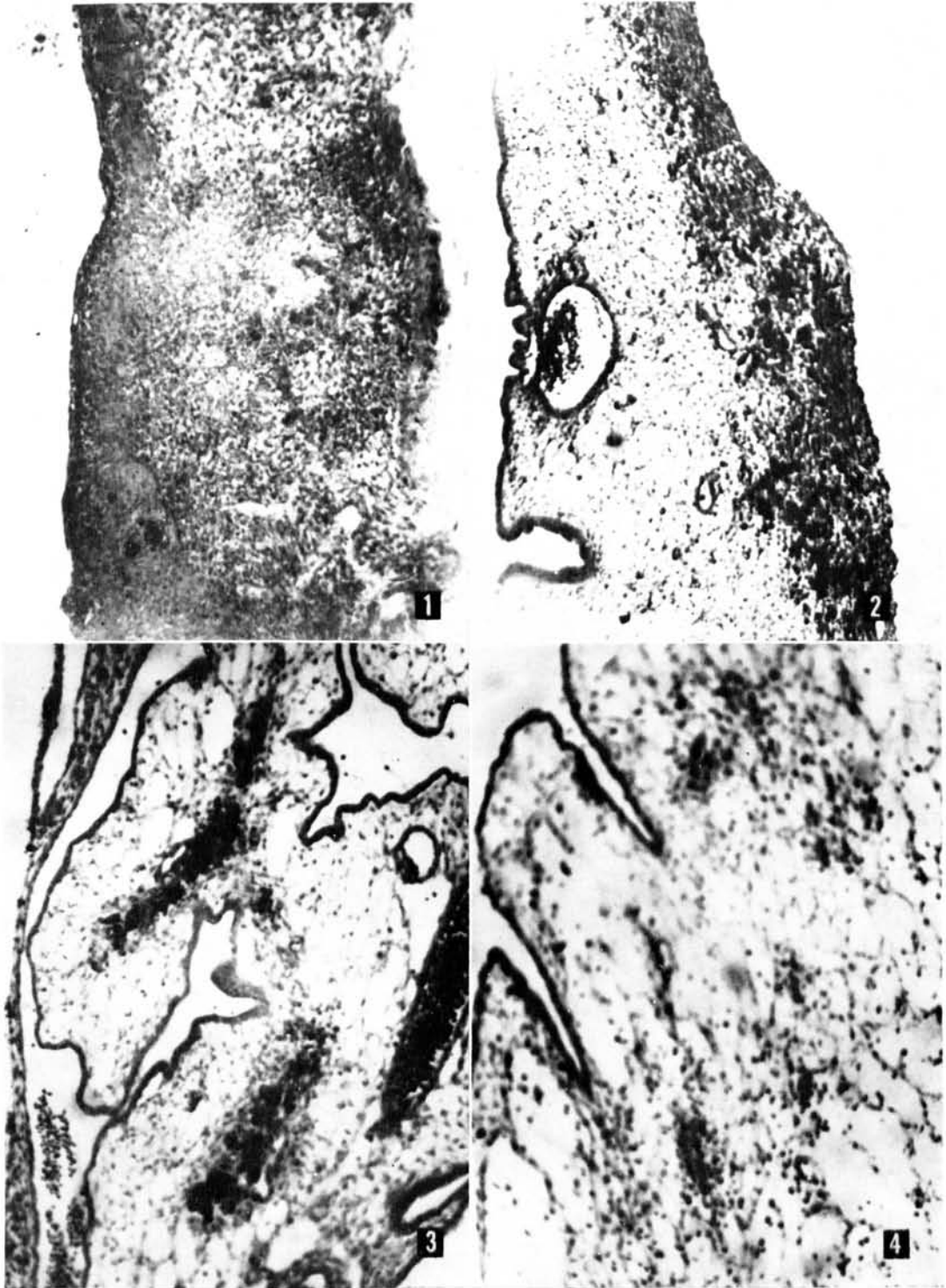


PLATE 16

PLANCHE 17

FIGS. 5 & 6. Vue au fort grossissement de la membrane chorio-allantoïdienne d'oeuf de poulet inoculé depuis sept jours. Nombreux bacilles disséminés avec les cellules histiocytaires très loin du point d'inoculation, avec le Bacille de Hansen (Fig. 5), et avec le *M. marianum* (Fig. 6).

FIG. 7. Vue topographique des amas cristallins sur la membrane chorio-allantoïdienne inoculée avec le *M. marianum*.

FIG. 8. Cristaux microscopiques vus au microscope polarisant sur un fragment de membrane chorio-allantoïdienne.

FIGS. 9 & 10. Multiplication des cristaux macroscopiques sur le blanc d'oeuf, vue du microscope polarisant.

