vide pag. 203.

CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE DE LA LÈPRE

I. ESSAIS DE CULTURE DU BACILLE DE HANSEN

PAR R. CHAUSSINAND
Institut Pasteur de Saigon, Indo-Chine

Depuis 1932 nous avons procédé à des nombreuses tentatives de culture du bacille de Hansen sur milieux artificiels. En sept ans, quatre-vingt-neuf lépromes récents, et trois rates provenant de lépreux décédés, ont été ensemencés. Nous avons, en outre, pratiqué trente-cinq hémocultures chez des lépreux en état de poussée évolutive.

Méthodes de prélèvement.—Au début, nous nous servions comme matériel d'ensemencement de lépromes récents, désinfectés, prélevés aseptiquement et broyés à la main avec de petits fragments de verre stérilisé. Le produit de ce broyage était ensemencé, soit sans préparation préalable, soit après un traitement par la soude, l'antiformine, l'acide sulfurique ou l'acide acétique, d'après les techniques employées pour l'ensemencement des expectorations des tuberculeux. Nous avons abandonné cette façon de procéder parce que le matériel, ensemencé immédiatement après le broyage, se révélait trop souvent souillé par des microbes de la peau. Nous craignions, d'autre part, que le traitement par la soude, par l'antiformine ou par les acides ne diminuât la vitalité du bacille lépreux. Quinze lépromes ont été ensemencés d'après cette méthode.

Ensuite, nous avons adopté la technique suivante: Un léprome récent de l'avant-bras, supposé riche en bacilles et à peau intacte, ainsi que la peau environnante, sont désinfectés à l'éther et à la teinture d'iode. Puis, toute trace d'iode est enlevée avec de l'alcool à 90°. On fait alors sur le léprome une application de neige carbonique par cryocautère pendant environ une minute. Le léprome ainsi traité est recouvert d'une petite capsule en verre stérilisée, fixée aseptiquement. Au bout de 24 heures, le léprome cautérisé est surmonté d'une vésicule, contenant environ 1 cc. de sérosité dans laquelle se trouvent de nombreux bacilles et des leucocytes. Ce liquide est ponctionné aseptiquement avec une pipette effilée, puis directement ensemencé. Cette technique présente l'inconvénient de ne procurer qu'un matériel peu abondant et relativement pauvre en germes. Onze lépromes ont été ainsi ensemencés.

Depuis quatre ans, nous procédons de la façon suivante: Un gros nodule lépromateux récent, supposé riche en bacilles et à peau intacte, est désinfecté à l'éther, puis à la teinture d'iode et à l'alcool à 90°. Il est entièrement excisé aseptiquement et toute la peau le recouvrant est brûlée au thermocautère. Le léprome est alors introduit dans une petite presse à main métallique, stérilisée, que nous avons fait construire spécialement. Le suc du nodule s'écoule par les petits trous, situés à la partie inférieure de cette presse et le tissu lépromateux est retenu presque en totalité. Ce suc qui

contient généralement une énorme quantité de bacilles, sous forme de globi et de petits amas, est ensemencé directement, sans traitement préalable. Ensuite, nous introduisons 1 à 2 cc. d'eau physiologique stérile dans la presse et le léprome est exprimé une seconde fois. Ce deuxième liquide obtenu ne contient, pour ainsi dire, pas de tissu lépromateux et se montre encore très riche en germes. Il est également ensemencé sans traitement préalable. Avec ce procédé, il est tout à fait exceptionnel que les milieux de culture ensemencés se révèlent ultérieurement souillés. Cette technique permet d'ensemencer largement quatre à six tubes avec une émulsion extrêmement riche en bacilles de Hansen. Pour nos essais de culture, nous utilisons de préférence des nodules lépromateux récents, provenant de malades en état de poussée évolutive. Soixante-trois prélèvements ont été pratiqués d'après cette méthode.

Nous nous sommes également servis pour nos ensemencements, à trois reprises, de rates de lépreux, décédés à l'hôpital de Choquan, que les Docteurs Dorolle et Baccialone ont bien voulu prélever pour nous. En outre, trente-cinq hémocultures ont été effectuées chez des lépreux en état de poussée évolutive.

Milieux de culture.—Nous avons utilisé près de cent milieux de culture solides et liquides différents. Il serait fastidieux de les énumérer tous. Les milieux servant à la culture des bacilles tuberculeux et ceux employés dans les mycoses ont été expérimentés, et chacun de ces milieux a subi plusieurs modifications à diverses reprises. Des milieux à base d'huîtres, de chair de poissons, de matière cérébrale et même de tissus humains provenant d'accidentés ont été utilisés. Il a été procédé à des essais de culture du bacille de Hansen sur embryon de poulet ainsi que dans du liquide aspergillaire d'après la méthode de Vaudremer (7). Nous avons préparé des milieux auxquels nous ajoutions du liquoïde Roche, des vitamines, de l'extrait globulaire ou des extraits d'organes les plus divers, d'origine humaine et bovine. Ces essais de culture ont été tentés en aérobiose et en anaérobiose et cela à des pH variant de 6,5 à 8,5. Plus de mille ensemencements et réensemencements ont été effectués.

RESULTATS

A plusieurs reprises et sur différents milieux, nous avons observé au microscope de grands agglomérats de bacilles acido-résistants, tels que les ont décrits Shiga (6), Schlossmann (5) et Kulescha (4), mais nous ne pensons pas qu'il s'agisse de cultures vraies. Cette multiplication apparente des germes provient plutôt, à notre avis, d'une désagrégation des globi ensemencés, suivie d'une espèce d'agglutination qui semble se pro-

duire dès que la surface des milieux solides montre une légère tendance à se dessécher. Sur les milieux liquides, nous avons également vu se former quelquefois de petits fragments de voiles très ténus, composés de bacilles acido-résistants. Nous supposons que ce phénomène est dû à des germes qui ont été entraînés à la surface et agglutinés, peut-être, par de minuscules particules graisseuses, provenant du matériel ensemencé.

Jamais, nous n'avons pu obtenir des sous-cultures à partir de ces agglomérats de germes. Nous retrouvions évidemment de nombreux bacilles en raclant la surface des milieux solides ensemencés, mais ces bacilles présentaient une tendance très nette à la dégénérescence; de plus, leur nombre diminuait à chaque repiquage pour disparaître complètement après quelques passages. Nous estimons qu'il s'agissait, dans ces cas, de transports de bacilles de milieu à milieu et non de cultures vraies. Sur les milieux liquides, nous n'avons jamais observé la formation d'un nouveau fragment de voile après repiquage, et même la particule du voile ensemencé disparaissait sans laisser de traces, en peu de temps.

Par trois fois, nous avons obtenu des cultures macroscopiques de bacilles acido-résistants repiquables en série. Une de ces cultures, provenant de l'abcès d'une gaîne vasculo-nerveuse chez un lépromateux avancé, a été identifiée comme bacille tuberculeux eugonique, de type humain, mais de faible virulence. Les deux autres sont des bacilles paratuberculeux chromogènes, présentant des similitudes biologiques avec les souches chromogènes Hyogo, isolées à partir de lépromes que le Professeur Shiga a bien voulu nous remettre lors de notre séjour à Tokyo. La première de nos deux souches provenait de l'ensemencement du suc d'un nodule très riche en germes, chez un lépromateux avancé. La deuxième a été obtenue par hémoculture chez un lépreux, gravement atteint, de l'hôpital de Choquan (Dr. Dorolle).

Ce malade présentait, depuis une semaine, une courbe de température à allure septicémique; son corps était couvert de petites vésicules contenant des bacilles acido-résistants. L'examen du sang, étalé sur lame, montrait d'assez nombreux bacilles acido-résistants, groupés en petits amas, ou isolés, intra- et surtout extracellulaires. A noter que nous n'avons plus retrouvé de bacilles dans le sang de ce lépreux et que les hémocultures sont restées négatives, dès que la température est redevenue normale.

Les bacilles de ces deux souches, provenant de malades différents, n'ayant eu aucun contact entre eux, paraissent être des germes de nature très proche. Chez le premier malade, la

culture (trois colonies isolées) a été obtenue au bout de deux mois sur un seul des quatre tubes ensemencés (gélose au Sauton double, pH 7,5). Chez le deuxième, 20 cc. de sang ont été mélangés au lit du malade avec du Sauton + liquoïde Roche (pH 7,2). A partir du sédiment de ce ballon, nous avons ensemencé, deux semaines plus tard, plusieurs tubes de milieux différents. Sur un seul de ces tubes (Petragnani modifié) il s'est formé une colonie au niveau de l'eau de condensation après un mois et demi d'étuve. Le ballon servant à ce repiquage n'a montré ultérieurement aucune culture.

Ces deux souches présentent des caractères biologiques identiques, mais leurs courbes du pH diffèrent légèrement dans les cultures sur milieux liquides. Les repiquages s'obtiennent facilement, après une semaine environ, sur milieux à l'oeuf et même sur milieux ordinaires, à l'étuve et à la température du laboratoire.

Ces germes se sont montrés avirulents pour le cobaye, le lapin et le singe. Injectés à fortes doses par voie sous-cutanée, ils provoquent chez ces animaux un nodule qui peut s'abcéder ou qui se résorbe progressivement. Même inoculés sous la peau, mélangés à de l'huile de paraffine, ou injectés par voie intracérébrale aux lapins, ces bacilles ne manifestent aucune virulence appréciable. I. Bertrand, J. Bablet et F. Bloch, qui recommandent, depuis 1937, la voie intracérébrale chez le lapin pour déterminer le type originel des bacilles tuberculeux (1) et aussi pour discriminer les bacilles du groupe paratuberculeux (2), ont expérimenté nos deux souches chromogènes en 1939 (3). Ils ont constaté, comme nous, que l'inoculation intracérébrale directe ne provoquait pas de troubles notables de la santé générale, ni de manifestations nerveuses. Chez les animaux sacrifiés au bout d'un mois ou de deux mois, les lésions histologiques locales étaient des plus discrètes, la réaction des méninges et des plexus choroïdes à peine esquissée (légère hyperplasie endothéliale). Le point d'inoculation était toutefois marqué par un nodule résiduel, formé de corps granuleux et de macrophages à granulations pigmentaires. En se basant sur ces résultats, ces auteurs classent nos deux souches chromogènes dans le groupe des bacilles paratuberculeux.[1]

[1] Ces mêmes auteurs ont également classé comme bacilles paratuberculeux les souches acido-résistantes, provenant de lépreux, que Shiga a bien voulu nous remettre. Par contre, l'inoculation intracérébrale au lapin du bacille de Kedrowsky, isolé d'un granulome lépreux vers 1925, leur a permis de conclure qu'il s'agissait d'un bacille tuberculeux de type bovin, isolé chez un lépreux.

Un *Macacus cynomolgus*, recevant une alimentation carencée en vitamines B, a subi, en vingt mois, quinze séries d'inoculations à fortes doses de ces germes par les voies les plus diverses (jusqu'à 2 cgr. par séance). Au début, les injections sous-cutanées déterminaient la formation de nodules infiltrés qui, quelquefois, s'abcédaient. Au bout d'un an, les lésions locales se montraient de moins en moins importantes. Elles se formaient et disparaissaient de plus en plus rapidement. Finalement, l'injection de fortes doses sous la peau n'était plus suivie de réactions locales visibles. Ce singe est mort à la suite d'une hémiplégie, trois mois après la dernière inoculation. La recherche des bacilles acido-résistants dans les régions cutanées et sous-cutanées injectées, ainsi que dans les différents organes, a été négative. Aucune constatation nécropsique n'a permis d'affirmer que cette mort était directement due aux inoculations expérimentales.

Mais, injectées par voie sous-cutanée à la souris blanche, immédiatement après leur isolement, ces souches provoquaient la mort des animaux par septicémie (bacilles et rétrocultures positifs dans le sang du coeur, le foie, la rate et les poumons). Actuellement, après quatre ans de culture sur milieux artificiels, l'injection de la même dose ne produit chez les souris que l'apparition d'un nodule qui se résorbe plus ou moins rapidement.

Les essais entrepris, par ailleurs, en vue de provoquer avec ces deux bacilles, cultivés il est vrai depuis un certain temps sur milieux artificiels, la réaction de Mitsuda chez quelques lépreux de type nerveux n'ont pas abouti. Cette constatation incite à ne pas considérer ces souches acido-résistantes comme des cultures du bacille de Hansen. Il pourrait s'agir de bacilles paratuberculeux qui se seraient fixés dans l'organisme amoindri de lépreux. A noter cependant que sur environ mille deux cents hémocultures pratiquées chaque année à l'Institut Pasteur de Saigon, chez des sujets non lépreux affectés de maladies les plus diverses, on n'a jamais pu isoler un bacille paratuberculeux quelconque.

Nous avons, en outre, observé des faits qui paraissent indiquer qu'une culture macroscopique du bacille de Hansen a probablement été obtenue. Il s'agit d'un ensemencement pratiqué sur un milieu spécial[2] avec le suc d'un léprome récent, contenant de très nombreux bacilles. Onze mois plus tard, nous avons observé, dans deux des quatre tubes ensemencés,

[2] De nouveaux essais sont actuellement en cours. La composition de ce milieu nutritif ainsi que les résultats obtenus seront l'objet d'un prochain mémoire.

plusieurs colonies minuscules (environ 0 mm. 5 à 0 mm. 8 de diamètre), surélevées, lisses, de forme ronde et de coloration grisâtre. Des étalements sur lames ont démontré qu'il s'agissait de bacilles, non dégénérés, fortement acido-résistants, groupés en amas et disposés côte à côte parallèlement, présentant toutes les caractéristiques du bacille de Hansen. Les repiquages, effectués sur le même milieu ne montrent pas de cultures apparentes nettes, un an plus tard. Mais on observe sur lame, après grattage du milieu aux points où une légère culture paraît visible à la loupe, de nombreux et très importants amas de bacilles non dégénérés, fortement acido-résistants, ayant le même aspect que le bacille de Hansen provenant de lésions récentes. De ces amas bacillaires partent de nombreuses trainées, légèrement contournées, formées de bacilles groupés parallèlement. En ce qui concerne les petites colonies remarquées dans les premiers tubes, il ne pouvait s'agir de particules du léprome puisque le suc ensemencé n'en contenait pas. En outre, ces colonies n'ont apparu qu'environ onze mois après l'ensemencement. D'autre part, nous n'avons jamais vu sur d'autres milieux de culture, vingt-trois mois après l'ensemencement, les bacilles nettement augmenter en nombre et conserver leur aspect normal. De tous nos nombreux essais, effectués pendant sept ans, nous estimons que seul ce résultat représente une culture macroscopique probable du bacille de Hansen. Nous poursuivons actuellement les essais avec ce milieu spécial, en pratiquant des repiquages un peu plus précoces, dans le but d'obtenir des cultures en série. Le résultat recherché est d'une importance telle qu'il mérite que de nouveaux efforts soient patiemment entrepris dans cette voie.

RÉSUMÉ

Depuis 1932 nous avons procédé à de nombreuses tentatives de culture du bacille de Hansen sur milieux artificiels. Le matériel d'ensemencement a été prélevé d'après diverses méthodes. L'expression mécanique des lépromes, excisés aseptiquement, semble la plus favorable. En sept ans, quatre-vingt-neuf lépromes récents et trois rates, provenant de lépreux décédés, ont été ensemencés. Nous avons, en outre, pratiqué trente-cinq hémocultures chez des lépreux en état de poussée évolutive. Environ cent milieux de culture solides et liquides différents ont servi à ces essais. Plus de mille ensemencements et réensemencements ont été effectués en aérobiose et en anaérobiose et cela, à des pH variant de 6,5 à 8,5.

Trois cultures en série de bacilles acido-résistants ont été obtenues. L'une a été identifiée comme bacille tuberculeux eugonique de faible virulence, de type humain. Les deux autres sont des bacilles paratuberculeux chromogènes, avirulents pour le cobaye, le lapin et le singe. Ces germes ne se sont révélés virulents pour la souris blanche qu'immédiatement après leur isolement. Chez le *Macacus cynomolgus* les injections en série de ces bacilles ont été suivies de phénomènes comparables à ceux observés chez le singe inoculé en plusieurs séances avec des bacilles de Hansen. Nous ne croyons pas pouvoir déduire de cette similitude de réaction chez les singes que les bacilles chromogènes isolés par nous représentent des cultures du bacille de Hansen. Car, si l'on se base sur les résultats négatifs de la réaction de Mitsuda constatés avec ces souches chromogènes chez quelques lépreux de type nerveux, l'hypothese suivante paraît plus plausible: Le bacille de la lèpre serait un bacille paratuberculeux et l'organisme du *Macacus cynomolgus* ne se montrant que très peu sensible à la lèpre humaine, réagirait vis-à-vis du bacille de Hansen et des bacilles paratuberculeux, considérés comme non pathogènes pour l'homme, d'une façon analogue.

Nous avons, en outre, observé des faits qui paraissent indiquer qu'une culture macroscopique du bacille de Hansen a probablement été obtenue après onze mois d'incubation sur un milieu spécial. Les repiquages, effectués sur le même milieu ne montrent pas de colonies nettement visibles, un an plus tard, mais les étalements sur lame révèlent indiscutablement un début de culture. De nouveaux essais sont actuellement en cours.

REFERENCES

(1) Bertrand, I., Bablet, J. et Bloch, F. Compt. rend. Soc. Biol. **124** (1937) 108.

(2) Bertrand, I., Bablet, J. et Bloch, F. Compt. rend. Soc. Biol. **128** (1938) 993.

(3) Bertrand, I., Bablet, J. et Bloch, F. Compt. rend. Soc. Biol. **130** (1939) 1565.

(4) Kulescha, in Peschkowsky et Malinin. Zntlbl. f. Bakt. Orig. **126** (1932) 137-145.

(5) Schlossmann. Zntlbl. f. Bakt. Orig. **115** (1930) 474-480; **128** (1933) 369-381.

(6) Shiga, K. Zntlbl. f. Bakt. Orig. **114** (1929) 511-518.

(7) Vaudremer, A., Sezary, A. et Brun, C. Compt. rend. Soc. Biol. **106** (1931) 1225 et 1932; **109** (1932) 624-626; Presse méd. (1935) No. 92, 1812-1815.