

13

SUR LA PRÉSENCE

D'AGGLUTININES SPÉCIFIQUES

DANS LES CULTURES MICROBIENNES

PAR

M. Le D^r E. MALVOZ

— X

Extrait des *Annales de l'Institut Pasteur*, août 1899

—

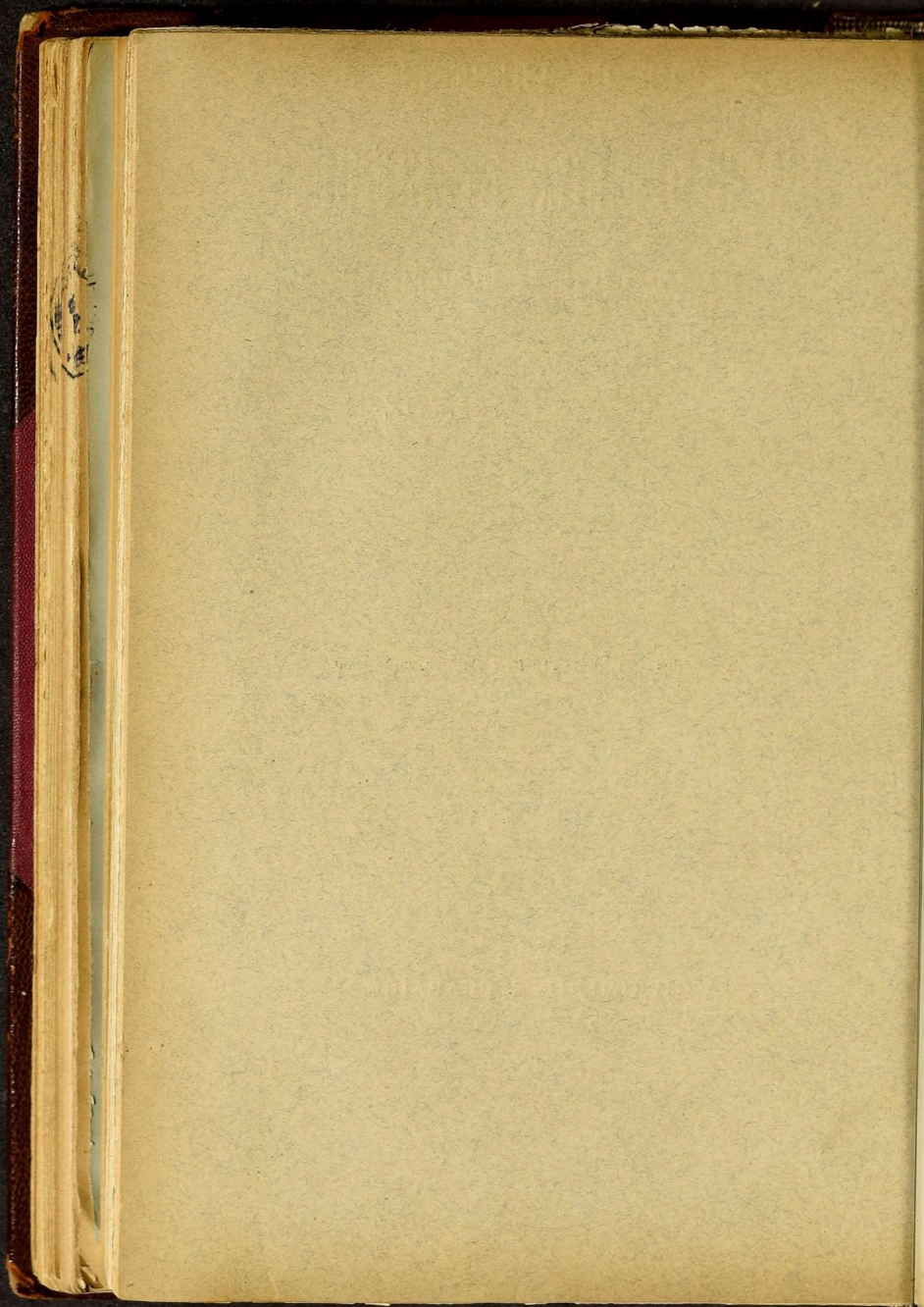
SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

—

1899



SUR LA PRÉSENCE D'AGGLUTININES SPÉCIFIQUES

dans les cultures microbiennes ¹.

Par M. le Dr E. MALVOZ.

Dans un précédent travail ², j'ai montré que l'agglutination des microbes n'était pas une propriété spéciale des sérums spécifiques, comme on l'avait pensé d'abord, mais que ce phénomène pouvait être provoqué par des substances chimiques beaucoup moins complexes, au premier rang desquelles se plaçaient la formaline, le sublimé, des matières colorantes telles que la safranine et la vésuvine.

Depuis la publication de ce travail, la liste des substances, que j'ai reconnues comme douées de propriétés agglutinantes, s'est beaucoup allongée : je signalerai en particulier la fuchsine en solution aqueuse bien filtrée, et les acides acétique et lactique dilués ³.

Pour étudier l'agglutination, je me sers maintenant, au lieu du bacille typhique, d'un microbe beaucoup plus facile à observer et qui est très sensible aux agglutinines, le premier vaccin du charbon. Il n'est pas difficile avec quelque habitude, en délayant une anse de culture sur gélose de 1^{er} vaccin dans un peu d'eau distillée, d'obtenir de belles émulsions montrant des bâtonnets, avec leur légère mobilité, bien isolés les uns des autres. On rejette les

1. Le présent travail a été adressé à la rédaction des *Annales* en février 1899. C'est à cause de l'encombrement de la publication qu'il n'a pu paraître plus tôt.

2. Sur l'agglutination des bacilles typhiques par des substances chimiques. *Annales Pasteur* 1897.

3. Nous avons été mis sur la voie de la découverte des propriétés agglutinantes très curieuses de l'acide acétique dilué par une circonstance bizarre, qui porte son enseignement au sujet des causes d'erreur en matière de séro-diagnostic. On nous avait envoyé du sang pour l'épreuve de Widal, et nous trouvions que son sérum agglutinait le bacille typhique même à 1 p. 5000 ! C'était, à n'en pas douter, une vraie fièvre typhoïde. Or, nous apprimes qu'il s'agissait de sang normal. Après bien des questions et des recherches, il fut reconnu enfin que l'expéditeur avait rincé au vinaigre, pour le nettoyer, le petit tube où le sang avait été recueilli !

émulsions montrant par-ci par-là des paquets de bacilles ayant échappé à la dissociation.

C'est ce microbe atténué du charbon qui est particulièrement sensible à l'action de l'acide acétique dilué : tandis que le même acide concentré rapetisse simplement les bacilles sans les réunir en amas, l'acide produit de très belles agglutinations, même à des dilutions de 1 p. 2000 et davantage. L'acide lactique agit de même. On ne voit pas au microscope de coagulum englobant les microbes ; ceux-ci semblent englobés dans un précipité formé en dehors d'eux. Nous ignorons encore le mécanisme intime de l'agglutination, aussi bien par les sérums que par nos substances chimiques, et quelles sont les causes qui rapprochent les uns des autres des microbes primitivement séparés.

*

*

La présence de substances agglutinantes spécifiques dans le sang des sujets infectés est généralement attribuée à des réactions de l'organisme : sous l'influence des microbes ou de leurs produits, il y aurait, ou bien production en excès de substances déjà élaborées à l'état physiologique, ou bien sécrétion de produits nouveaux, doués de propriétés agglutinantes.

Mes recherches me semblent devoir faire envisager la question d'une autre façon : il n'est pas nécessaire, me paraît-il, d'invoquer l'existence de sécrétions normales ou pathologiques dues, soit à l'infection elle-même, soit aux processus cellulaires de l'immunisation, pour expliquer l'action agglutinante des sérums. On peut retrouver, dans les cultures mêmes des microbes, tout au moins en ce qui concerne le charbon, des agglutinines spécifiques : celles-ci, ajoutées à des émulsions neuves, y produisent des amas de bacilles, qui ne diffèrent pas de ceux obtenus au moyen pu sérum.

On savait déjà que certains microbes, en proliférant dans les cultures liquides, ne restent pas isolés, mais se présentent en flocons plus ou moins volumineux : tel est le cas pour les microbes du charbon virulent, du reuget, de la diphtérie etc. Les cultures du bacille typhique lui-même, en bouillon ordinaire, présentent assez souvent de petits amas microbiens. Ces faits sont bien connus de tous ceux qui s'occupent de séro-diagnostic, et on recommande notamment, pour l'épreuve de Widal, de se

servir de cultures en eau peptone (Courmont), qui montrent généralement des bacilles bien isolés.

Ces agglutinations spontanées sont appelées des *pseudo-amas*, et on les a toujours différenciées, je ne sais pourquoi, des groupements bacillaires produits par l'action des sérums.

Quoi qu'il en soit de ces distinctions, les faits suivants prouvent, me paraît-il, l'existence d'agglutinines spécifiques dans les cultures.

Prenons une émulsion de premier vaccin charbonneux préparée en broyant, dans un demi-centimètre cube d'eau distillée, une anse de culture sur gélose restée six jours à 22°. On dépose sur porte-objet une anse de l'émulsion, on s'assure que les bacilles sont mobiles et bien isolés les uns des autres. La préparation peut être abandonnée plusieurs heures en chambre humide, sans que des agglutinations se produisent entre les bacilles. L'addition d'eau ordinaire, d'eau salée à 1-3-5 0/0, laisse les microbes parfaitement isolés, même après plusieurs heures.

Mais si on mélange sur le porte-objet, à une anse d'émulsion, la même proportion de bouillon ordinaire (alcalin), on voit les bacilles perdre leur faible mobilité, puis se rapprocher, se souder en groupes composés de 3-5-10 bacilles.

Le résultat est le même si on emploie de la gélatine en feuille additionnée de 10 parties d'eau distillée : les préparations sont maintenues liquides à 37°; la gélatine se comporte donc comme le ferait du sérum spécifique dilué.

Enfin, le phénomène de l'agglutination devient très net si on se sert, non plus d'un bouillon vierge, *mais d'un bouillon dans lequel a proliféré le bacille du charbon lui-même*, et que l'on a débarrassé des microbes au moyen de l'appareil centrifugeur. On prend une anse de cette culture centrifugée, on s'assure qu'elle ne renferme pas de bacilles. On la mélange intimement sur porte-objet à une anse d'émulsion de vaccin, on abandonne en chambre humide. Bientôt, on voit apparaître au microscope des amas de 10-15-20 microbes et même davantage; à un moment donné, il reste peu de bacilles libres dans la préparation. Le sérum normal du cheval, qui est doué d'un certain pouvoir agglutinant, ne provoque pas d'amas plus considérables ni différents d'aspect des premiers.

Les cultures de charbon, qui m'ont donné l'agglutination la

plus nette, avaient été obtenues par M. Lambotte, mon assistant, en soumettant des bouillons ensemencés de *bacillus anthracis* à une agitation continue, au moyen de l'appareil Herman¹; particularité très curieuse, les liquides ainsi agités plusieurs jours deviennent, après quelques passages, d'une viscosité très grande, dont nous ne connaissons pas encore la raison. Non seulement les bacilles du vaccin, traités par une culture centrifugée de charbon, se groupent en amas, mais on distingue, dans les corps microbiens, ces sortes de vacuolisations qui s'observent souvent par l'addition des sérums spécifiques. On ne parvient pas à distinguer un coagulum ou un précipité englobant les bacilles.

Si, au lieu de vaccin charbonneux, on emploie une émulsion de *bacterium coli* ou de *b. typhosus*, on ne parvient pas à provoquer l'agglutination de ces microbes.

Dilué au quart, le liquide charbonneux agglutine encore, mais plus faiblement, les émulsions de vaccin.

On sait que le phénomène de l'agglutination peut être étudié d'une autre façon qu'en se servant d'émulsions microbiennes auxquelles on ajoute du sérum. Il est possible de faire l'observation à l'état *naissant*, en ajoutant à un milieu de culture liquide, en goutte pendante par exemple, une trace de sérum spécifique; on ensemence avec quelques microbes seulement, on abandonne à une température convenable, en même temps que des préparations témoins non additionnées de sérum. Dans ces conditions, on assiste à la pullulation microbienne accompagnée de l'agglutination, là où l'on a ajouté le sérum.

Ensemençons de la même façon du vaccin charbonneux, quelques microbes seulement, en goutte pendante: des préparations seront faites en eau peptone (peptone de Witte), d'autres en bouillon ordinaire, en gélatine nutritive (maintenue à 37°), et enfin en culture charbonneuse centrifugée. En eau peptone, la plupart des bacilles restent séparés les uns des autres, en se multipliant. Ce n'est qu'après un certain temps qu'ils se réunissent en petits amas; dans les autres milieux, au contraire, les préparations se présentent, après 24 à 36 heures, comme s'il s'agissait de milieux additionnés d'un peu de sérum spécifique: les bacilles sont groupés en flocons, surtout considérables dans

1. *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VII, n° 2.

les cultures en liquide charbonneux centrifugé. Il ne s'agissait nullement d'une prolifération de microbes du charbon, ayant échappé à la centrifugation : des préparations témoins faites avec le liquide sont restées stériles ; d'ailleurs, les caractères du premier vaccin étaient très reconnaissables.

Mais si on ensemence du *bacterium coli* dans une goutte pendante de liquide charbonneux, on voit aussi les bacilles proliférer en s'agglutinant. Où est, dans ce cas, la spécificité ? Celle-ci se manifeste si, au lieu d'employer la culture centrifugée de charbon telle quelle, on la dilue au dixième. Une goutte pendante de cette dilution, ensemencée de *b. coli*, ne montre pas de microbes en amas, tandis que le vaccin du charbon y prolifère en bacilles entortillés et agglutinés, comme dans une culture additionnée de sérum spécifique.

*
* *

Il faut donc bien admettre que les cultures de charbon renferment, à un moment donné, des agglutinines spécifiques, dont on peut faire apparaître les propriétés *in vitro* dans des milieux neufs. C'est surtout le liquide, débarrassé des microbes, d'une culture agitée, qui se montre chargé de ces substances douées du pouvoir de provoquer l'agglutination. Mais pourquoi le phénomène se produit-il aussi, à un plus faible degré, il est vrai, en mélangeant des bacilles pris sur gélose et émulsionnés dans l'eau, à du bouillon neuf, à de la gélatine liquéfiée, à du sérum normal ? Il faut bien admettre que les bacilles apportent avec eux des produits, dont nous ne connaissons pas la nature, lesquels, en présence de certaines substances du bouillon, etc., amènent, soit la formation d'un coagulum englobant les microbes, soit une viscosité particulière des bâtonnets qui adhèrent ainsi les uns aux autres. On ne connaît pas bien le mécanisme de l'agglutination des microbes, comme des globules rouges, et ce travail n'a pas été fait pour résoudre cette question.

On remarquera que le bouillon, la gélatine liquéfiée, se comportent comme le sérum normal de certains animaux. Ne peut-on assimiler le phénomène à celui qui se produit après l'addition de fuchsine, par exemple ? J'ai obtenu de très beaux amas de bacilles en ajoutant de la fuchsine, en solution aqueuse bien filtrée, aux émulsions : des flocons rougeâtres de microbes

adhérents se déposent et, après un certain temps, le liquide s'éclaircit complètement en se décolorant. Un sérum spécifique provoque des précipitations du même genre. Dira-t-on que la fuchsine est *agglutinante*? N'est-ce pas, au contraire, cette substance colloïdale, en solution toujours incomplète, qui se coagule et est véritablement *agglutinée* autour des bacilles entraînés dans le précipité? N'y a-t-il pas, dans le bouillon, la gélatine, le sérum normal, des substances colloïdales qui, en présence de certains produits apportés avec les microbes, se précipitent en plus ou moins grande abondance? On peut penser, *a priori*, que les phénomènes d'agglutination, en englobant les microbes eux-mêmes, sont très contingents et très étroitement liés à une foule de facteurs, tels que la qualité et la quantité des sels dissous, etc. On comprend ainsi que certains sérums normaux agglutinent beaucoup mieux que d'autres, et que des bacilles d'une espèce donnée soient plus sensibles au phénomène. Dans le mémoire qui suit, MM. Lambotte et Maréchal ont vu le sérum humain normal agglutiner le vaccin du charbon même à 1 p. 500, comme un véritable sérum spécifique!

Mais comment s'expliquer la propriété agglutinante si considérable du sérum des animaux immunisés? A notre avis, ce sont les inoculations répétées de produits microbiens qui surchargent le sang de ces mêmes substances qu'on retrouve dans les cultures, substances inconnues, mais qui, mises en présence des bacilles homologues, déterminent leur agglutination. Ces substances se condensent et se fixent peut-être dans le sérum. Un travail fait à notre laboratoire par M. Gengou et qu'on trouvera plus loin, sur l'agglutination dans le charbon inoculé au chien, a donné des résultats qui cadrent mal avec l'hypothèse d'un rôle actif de l'organisme dans la production des agglutinines. Moi-même, j'ai injecté une grande quantité de premier vaccin du charbon à des chiens; le sérum était déjà très agglutinant douze à quinze heures après l'injection, et, les jours suivants, le titre d'agglutination a diminué peu à peu. De plus, M. Gengou a constaté, aussi bien chez l'animal neuf que chez le chien soumis à de fortes injections de premier vaccin, que les divers organes, les exsudats leucocytaires, les globules blancs du sang, renfermaient infiniment moins d'agglutinines que le sérum. Toutes ces observations doivent nous faire

admettre qu'en ce qui concerne le charbon tout au moins, la propriété agglutinante du sérum n'est pas due à des réactions cellulaires, contrairement aux propriétés préventive ou antitoxique : celles-ci, dans l'état actuel de nos connaissances, paraissent bien être le résultat d'une activité toute particulière des organes, sous l'influence des microbes ou de leurs produits.

1. Liège, Institut pathologique et bactériologique.

