

Année de l'Institut Pasteur 1897 x ¹⁸

RECHERCHES
SUR L'AGGLUTINATION DU BACILLUS TYPHOSUS
PAR DES SUBSTANCES CHIMIQUES
PAR E. MALVOZ

(Institut d'anatomie pathologique et de bactériologie de l'Université de Liège.)

On ne peut guère examiner sous le microscope de phénomène plus curieux que celui de l'agglutination de certains microbes par les sérums spécifiques. Que l'on prenne, par exemple, une émulsion de bacilles typhiques ou cholériques, que l'on y ajoute une trace de sérum provenant d'un animal fortement immunisé contre le typhus ou le choléra, et l'on sera frappé des modifications considérables qui s'accomplissent dans la préparation. Les bacilles qui, avant l'addition du sérum, étaient d'une mobilité extrême, bien séparés les uns des autres, s'arrêtent presque tous. Bientôt, on les voit se rapprocher, comme par une attraction mystérieuse, et peu à peu ils se groupent en amas de plus en plus considérables : ils *s'agglutinent*, et la préparation ne contient plus, après un certain temps, que des flocons nageant dans le liquide, formés de bacilles agglomérés.

Ce phénomène, découvert et étudié par Charrin et Roger, Metschnikoff, Bordet, Gruber et Durham, Pfeiffer, etc., a reçu, on le sait, d'importantes applications cliniques : son existence, démontrée par Widal dans le sang des typhisés, est devenue la base du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde.

Chose étrange, malgré d'innombrables travaux publiés dans ces derniers temps sur la séro-diagnose, on ne sait pour ainsi dire rien du mécanisme intime du phénomène. Pourquoi, par exemple, un sérum actif n'agglutine-t-il bien que des bacilles déterminés, à l'exclusion d'autres espèces microbiennes, même

très voisines? Bien que la plupart des questions soulevées par le phénomène de l'agglutination n'aient pas encore reçu de réponse, on a déjà voulu tirer des conclusions générales sur son existence, et en faire la base d'une théorie de l'immunité. De telles théories seront évidemment prématurées aussi longtemps que les obscurités qui entourent l'étude du phénomène ne seront pas éclaircies.

Il nous a paru qu'on ferait avancer la question en recherchant quelles sont les principales substances chimiques qui sont capables de produire *in vitro*, tout comme le sérum spécifique, l'agglutination du *bacillus typhosus*, et dans quelles conditions cette agglutination se produit; de plus, le phénomène lui-même n'est-il pas, au même titre que le typhus-sérum, applicable au diagnostic du bacille d'Eberth-Gaffky?

Cette question des substances chimiques capables de provoquer l'agglutination semble avoir été fort peu étudiée. A notre connaissance, seuls Blachstein¹ et Engels² ont fait quelques recherches sur ce sujet. Ils ont étudié l'action agglutinante de la chrysoïdine, substance colorante diazoïque, sur le bacille cholérique. Tandis que Blachstein soutient que seul le vrai bacille cholérique est agglutiné par cette substance, à l'exclusion des autres vibriens voisins du choléra, Engels affirme que la chrysoïdine n'a pas d'action spécialement élective sur le bacille virgule spécifique.

Pour nous placer dans des conditions toujours comparables, nous avons pris, dans tous nos essais, des cultures fraîches sur gélose, ayant séjourné quelques heures à 37°. Le bacille typhique provenait de la rate d'un cadavre. On délaye une anse de la culture dans 1 c. c. d'eau distillée : on obtient ainsi une émulsion ne présentant au microscope que des bacilles bien mobiles, nettement isolés et nullement agglutinés. On s'assure, d'ailleurs, à chaque expérience, que l'émulsion ne présente pas spontanément d'amas microbiens.

Nous avons tout d'abord constaté que le typhus-sérum, provenant soit d'un vrai typhique, soit d'une chèvre fortement immunisée, produisait, à la dose d'une goutte pour 1 c. c. d'émulsion de bacilles typhiques, de beaux amas caractéristiques.

1. *Munchener medicinische Wochenschrift*, n° 44 et 45, 1896.

2. *Centralblatt für Bakteriologie*, n° 3, vol. 21, 1897.

Nous avons ensuite ajouté à nos bacilles émulsionnés les substances chimiques les plus variées. Nous n'avons été nullement surpris de constater qu'un bon nombre de substances, jouissant de propriétés coagulantes, agglutinaient plus ou moins fortement les bacilles typhiques, tout comme le typhus-sérum. En tête de ces substances, nous plaçons la formaline (aldéhyde formique à 40 0/0 dans l'eau), le sublimé corrosif, l'eau oxygénée, l'alcool fort.

La concentration des milieux en présence joue naturellement un très grand rôle.

Pour la formaline, on ne voit apparaître d'amas bien nets, semblables à ceux que provoque dans l'émulsion le typhus-sérum, que si l'on ajoute, pour 1 c. c. d'émulsion, 1 c. c. de formaline.

Le sublimé agglutine fortement le bacille typhique déjà à la dose de 0,7 p. 1,000; c'est-à-dire qu'en déposant une anse de cette solution sur le porte-objet, et l'additionnant d'une anse d'émulsion typhique, on assiste de suite à la formation de beaux amas. Ceux-ci sont de plus en plus volumineux, au fur et à mesure que l'on augmente la concentration du réactif.

Une anse d'alcool fort, d'eau oxygénée, mélangée à une anse d'émulsion typhique, provoque aussi la formation de beaux amas microbiens.

L'agglutination provoquée par ces réactifs est tellement nette qu'elle nous sert d'expérience de cours, quand nous voulons montrer l'aspect que prennent les bacilles typhiques réunis en amas, lorsque nous n'avons pas de typhus-sérum à notre disposition.

Mais ces divers réactifs ont une action coagulante prononcée et leur propriété d'agglutiner les bacilles n'a, semble-t-il, rien de bien surprenant; de plus, le phénomène exige pour se produire d'assez fortes concentrations des réactifs. Quelle différence, à ce point de vue, avec le typhus-sérum! N'existe-t-il donc pas des substances chimiques produisant, comme ce dernier, le phénomène à des doses excluant l'hypothèse de la production d'une simple coagulation? Nous avons essayé d'abord la chrysoïdine qui, d'après Blachstein, agglutine le bacille cholérique. Nos émulsions typhiques n'ont pas présenté d'agglutination nette aux concentrations variées de chrysoïdine que nous avons

employées¹. Nous avons alors eu recours à d'autres corps, et nous avons choisi ceux qui présentent des groupements moléculaires plus ou moins voisins de la chrysoïdine, tels que l'induline, la nigrosine, la safranine, la vésuvine². L'induline et la nigrosine n'ont pas produit l'agglutination. Mais la safranine et la vésuvine représentent deux substances qui, *même à très faible concentration*, provoquent au sein d'une émulsion de bacilles typhiques la formation d'amas très caractéristiques.

En prenant une anse d'une solution de safranine ou de vésuvine à 1 p. 1,000, et en l'ajoutant à une anse d'émulsion typhique, on voit bientôt, sous le microscope, l'immobilisation des bacilles et leur réunion en amas, d'autant plus reconnaissables que les microbes sont légèrement teints en rose et en brun. Même en poussant plus loin la dilution, on obtient encore l'agglutination. Si, par exemple, on ajoute à 1 c. c. d'émulsion typhique 3 gouttes de safranine ou de vésuvine à 1 pour 1,000, on voit déjà des amas apparaître dans les préparations. *Le sang de bien des typhiques ne se comporte pas autrement.*

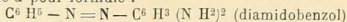
Nous sommes donc en possession de substances qui, même très diluées, provoquent facilement des amas de bacilles typhiques, comparables à ceux du typhus-sérum.

A l'inverse de la formaline, du sublimé, de l'alcool, etc., les acides minéraux n'agglutinent pas le bacille typhique, qu'ils soient employés dilués ou concentrés. On voit bien, dans les expériences, les bacilles devenir de plus en plus petits au fur et à mesure que l'on emploie un acide plus concentré, mais les microbes ne s'agglutinent pas.

L'acide phénique, l'acide lactique, le chloroforme ne provoquent pas, non plus, d'amas microbiens.

L'acide salicylique agglutine, mais les amas ne sont formés que d'un petit nombre de microbes. Le permanganate de potassium, en solution concentrée dans l'eau, ajouté à l'émulsion typhique, rassemble les bacilles en ilots dans lesquels ils sont beaucoup moins serrés qu'après l'action des substances véritablement agglutinantes.

1. La chrysoïdine est une matière colorante jaune brunâtre, vendue par Merck, à Darmstadt. Elle a pour formule :



2. La formule de la vésuvine est : $\text{C}^6 \text{H}^4 < \begin{matrix} \text{N} = \text{N} - \text{C}^6 \text{H}^3 (\text{N} \text{H}^2)^2 \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6 \text{H}^3 (\text{N} \text{H}^2)^2 \end{matrix}$

La soude caustique, l'ammoniaque ne donnent pas d'amas bacillaires si l'émulsion de microbes est faite dans l'eau distillée. Mais si, au lieu d'eau distillée, on emploie une eau alimentaire quelque peu dure, l'addition de soude ou d'ammoniaque à l'émulsion agglutine fortement les microbes. Ce phénomène est sans doute en rapport avec la précipitation du carbonate de chaux formée aux dépens du bicarbonate soluble. Cette simple expérience montre combien le phénomène de l'agglutination dépend de circonstances en apparence peu importantes. Il serait désirable de voir les bactériologistes se mettre d'accord sur le choix d'un milieu toujours le même, de composition simple, pour l'étude du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. Rien n'est variable comme la composition d'un bouillon de culture, et peut-être faut-il expliquer par cette variété des bouillons employés, bien des divergences notées d'un auteur à l'autre dans les constatations faites sur le sang des typhisés.

Soumise à l'ébullition, puis refroidie, l'émulsion typhique agglutine encore bien par la formaline.

Salimbeni¹ tend à faire jouer un grand rôle à l'action de l'oxygène dans la production du phénomène de l'agglutination par les sérums spécifiques.

M. Lambotte a fait ici quelques expériences qui n'ont pas donné les mêmes résultats que ceux de Salimbeni. Il est vrai que la technique employée n'était pas la même. M. Lambotte s'est servi d'une chambre à gaz porte-objet de Ranvier. On dépose au centre de la plaque une goutte d'émulsion typhique. On introduit dans la rainure soit un peu de typhus-sérum dilué, soit de la formaline. On recouvre d'une lamelle lutée à la vaseline. On arrive facilement à éviter le mélange des réactifs et des bacilles. On s'assure d'abord sous le microscope que ceux-ci sont bien isolés et bien mobiles. On fait passer pendant longtemps un courant de gaz inerte (gaz d'éclairage, hydrogène). Quand tout l'air est chassé, on opère le mélange en secouant la plaque, et on constate que l'agglutination des bacilles est toutaussi nette que dans une préparation ordinaire.

On peut donner facilement à un sérum normal non agglutinant le pouvoir de provoquer la formation d'amas bacillaires dans une émulsion typhique; en d'autres termes, on peut trans-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*. Mars 1897.

former artificiellement du sérum normal en typhus-sérum, tout au moins au point de vue de l'agglutination. Pour cela, nous avons pris du sérum de bœuf, dont nous avons de grandes quantités à notre disposition. Ce sérum de bœuf, comme nous nous en sommes assuré, n'agglutinait pas à la dose de 1 de sérum pour 10 d'émulsion typhique. Mais si on ajoute à 9 c. c. de ce sérum pur, 1 c. c. de solution de safranine à 1 0/00 (cette addition ne provoque pas d'altération visible du sérum), on obtient ainsi un sérum dont une goutte provoque facilement la formation d'amas bacillaires dans 20 gouttes d'émulsion typhique. Et pourtant la safranine est là dans un état de dilution très considérable. A ce degré de dilution, la safranine seule, non additionnée de sérum, ne provoque pas l'agglutination des microbes typhiques.

Y aurait-il dans le sang des typhiques et des animaux, soumis à l'influence du bacille typhique, quelque produit de désassimilation, d'une constitution moléculaire plus ou moins voisine de celle de la safranine, de la vésuvine, etc.? Ce produit existerait-il seulement dans les organismes influencés par le bacille typhique, ou bien, présent normalement dans le sang, se formerait-il en plus grande quantité chez les typhisés?

Ce sont là des questions que nous ne pouvons pas résoudre pour le moment. Nos essais provoqueront peut-être des recherches dans cette voie. Nous signalerons, en passant, ce fait que la diazo-réaction d'Ehrlich, si souvent observée dans l'urine des typhiques, est due à la décomposition d'amines de la série aromatique par l'acide nitreux, avec formation de corps diazoïques colorés. Le sang des typhiques contient donc, semble-t-il, des corps à molécule compliquée et facilement décomposable en dérivés diazoïques. Or, la vésuvine, qui agglutine si bien à très faible dose le bacille typhique, est un corps azoïque. Ces données inciteront peut-être quelqu'un à chercher dans cette direction la véritable nature de la substance agglutinante du sang des typhiques.

Le fait de l'agglutination du bacille typhique par des réactifs chimiques présente, par lui-même, et à divers points de vue, un grand intérêt. Mais cet intérêt grandit encore si on étudie com-

ment se comportent, vis-à-vis de ces réactifs, d'autres microbes plus ou moins voisins du bacille typhique.

On sait que l'on a fait, de l'emploi du typhus-sérum ou du choléra-sérum, la base d'un procédé de diagnostic des bacilles typhiques et cholériques. Le bacille typhique, par exemple, est facilement agglutiné par le typhus-sérum dilué : traités par le même sérum, les coli-bacilles ne se rassemblent pas en amas. Si donc on se trouve en présence de microbes difficiles à identifier, soit comme bacilles typhiques, soit comme coli-bacilles, on n'a qu'à les soumettre à l'action du typhus-sérum convenablement dilué. Si l'on observe la formation d'amas bacillaires, on a affaire au bacille typhique; l'absence d'amas prouve qu'il ne s'agit pas de ce microbe.

Eh bien, on constate des différences aussi importantes dans l'action de la formaline, du sublimé, de l'eau oxygénée, de la safranine, etc., sur les émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles.

Nous avons dit déjà que, pour éviter la complication des phénomènes qui se produisent quand on emploie, pour l'étude de l'agglutination par du sérum ou des réactifs, des cultures en bouillon ou en eau-peptone, nous prenions toujours des émulsions dans l'eau distillée de bacilles recueillis sur gélose. Si on fait ainsi des émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles, pris sur cultures de même âge, et que l'on ajoute de la formaline, de l'eau oxygénée, dans les proportions déjà indiquées, on observe nettement l'agglutination du bacille typhique et l'absence de ce phénomène pour le coli-bacille. La différence est particulièrement nette avec la formaline. Tandis que l'addition des parties égale d'émulsion typhique et de formaline est suivie de la formation d'amas de bacilles agglutinés, les coli-bacilles immobilisés restent isolés dans les préparations. La différence d'une émulsion à l'autre est même visible à l'œil nu : l'émulsion typhique est transformée en un liquide rempli de flocons blanchâtres. Le phénomène est tellement net qu'il peut servir comme méthode de diagnostic. C'était devenu, à un moment donné, une des distractions du laboratoire, que de faire par les visiteurs un grand nombre d'émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles, et de reconnaître à l'œil nu, rien qu'au moyen de la formaline, quelle était la nature du

microbe contenu dans le tube à essai qu'ils vous présentaient.

La safranine à 1 pour 1,000 ajoutée à 1 c. c. d'émulsion typhique, donne déjà des amas à la dose de 1 pour 10 d'émulsion ; le coli-bacille n'est pas agglutiné dans ces conditions, pas plus que si on prend de la safranine à 1 pour 100. Le sérum additionné de safranine, comme il a été indiqué, se comporte vis-à-vis des émulsions de bacilles typhiques et de coli-bacilles comme le typhus-sérum dilué. On prend 20 gouttes d'émulsion typhique et d'émulsion de coli-bacilles ; on ajoute à chaque tube 2 gouttes de sérum de bœuf additionné de safranine à 1 pour 1000 (9 de sérum + 1 de la solution de safranine). Des amas bacillaires très nets se forment dans les cultures typhiques ; on n'en voit pas, ou à peine quelques bacilles groupés par deux ou trois, dans l'émulsion de microbes du côlon.

On doit se demander si ces différences si nettes d'un microbe à l'autre ne sont pas dues à la présence, dans l'émulsion de bacilles du côlon, de substances telles que des substances ammoniacales formant des combinaisons avec l'aldéhyde formique, etc. Il est clair que la même objection peut être faite au procédé du diagnostic par le typhus-sérum. avec d'autant plus de raisons que très souvent cette recherche s'effectue, non pas au moyen de bacilles émulsionnés dans l'eau distillée, mais de cultures en bouillon renfermant tous les produits, tels qu'ammoniacales, amines, etc., fabriqués par les bacilles. Néanmoins, dans le but de rendre les essais aussi comparables que possible, nous avons cherché à débarrasser complètement les bacilles typhiques et les coli-bacilles des substances solubles de la culture. Dans ce but, nous avons fait passer, à travers de petites bougies Chamberland reliées à la trompe, des cultures typhiques et des cultures de bacilles du côlon en bouillon de viande. Nous avons ensuite lavé les dépôts à grande eau (eau distillée) jusqu'à ce qu'on n'obtienne plus de réaction par le réactif de Nessler. En raclant ensuite la surface de la bougie et en délayant dans l'eau distillée, on produit des émulsions riches en bacilles. Mais ceux-ci sont ou très peu mobiles, ou même complètement immobiles ; la recherche des cils est devenue infructueuse. De plus, on n'observe plus, avec l'émulsion typhique, la production d'amas si remarquable que l'on obtenait au moyen de la formaline, du sublimé, de la safranine, etc. Le typhus-sérum

lui-même n'agglutine pour ainsi dire plus ces bacilles lavés.

Coli-bacilles et bacilles typhiques, ainsi traités, se comportent donc sensiblement de la même façon. Les grands lavages subis par les microbes ont sans doute pour effet de les dépouiller de l'enveloppe ciliée qui entoure le corps bacillaire, et cette enveloppe est peut-être le siège des réactions chimiques qui s'accomplissent dans le phénomène de l'agglutination.

Quoi qu'il en soit, la méthode de diagnostic que nous proposons, employée de la façon indiquée, nous paraît susceptible d'applications pratiques. MM. Lambotte et Bossart ont fait, à notre laboratoire, un grand nombre de recherches basées sur ce procédé et au moyen des microbes les plus variés. Les résultats seront publiés prochainement. La méthode est déjà employée couramment ici pour le diagnostic des colonies microbiennes que fournit l'eau de boisson.

