

Beaucoup plus pratique et plus commode est celle de Ziehl, la seule que j'emploie maintenant et que je vous conseille de préférer à toutes les autres. La solution colorante se compose d'eau, de fuchsine et d'acide phénique<sup>1</sup> et se conserve avec facilité pendant plusieurs mois. Les lamelles restent dans ce bain colorant pendant une dizaine de minutes au maximum, un quart d'heure au plus pour les coupes, sans qu'il soit nécessaire de chauffer. La décoloration se fait avec l'acide sulfurique au quart; les coupes décolorées sont montées dans l'eau ou séchées et montées au baume.

<sup>1</sup> Sol. de Ziehl: Alcool absolu 10 centimètres cubes, acide phénique 5 grammes, fuchsine 1 gramme, pour 125 grammes de solution.

### TROISIÈME LEÇON

SOMMAIRE. — Tentatives de cultures. — Toussaint. — Bouillons et milieux solides. — Cultures dans le sérum. — Stérilisation par le chauffage discontinu. — Géluse. — Agar-agar. — Recherches de MM. Nocard, Gran-cher, Hippolyte Martin. — Technique de l'ensemencement. — Choix de la matière à ensemer. — Conditions de température et d'humidité nécessaires au développement des cultures. — Développement des bacilles. — Différences morphologiques suivant leur âge. — Tentatives d'inoculations aux animaux et à l'homme. — Hébréard, Lepelletier (de la Sarthe), Kortum, etc.

L'aspect sous lequel se présente le microbe, les colorations qui lui sont propres ne sont pas les seuls réactifs qui permettent la différenciation du bacille de Koch. Nous avons vu que, par des cultures, Villemin avait démontré la spécificité et la virulence du microbe de la tuberculose.

Recherchons maintenant les diverses tentatives qui ont précédé la découverte définitive de Robert Koch.

Un savant trop tôt enlevé à la science, Toussaint, élève de Pasteur, avait tenté en suivant les procédés indiqués par son maître, d'isoler et même plus, de cultiver l'agent tuberculeux. Dans ce but, conformément aux procédés pastoriens, il employa des bouillons obtenus par l'ébullition de la chair musculaire du bœuf. Ce liquide stérilisé et conservé dans des ballons servait à l'ensemencement des pro-

duits dont il recherchait la nature. Ce milieu liquide permet de cultiver une grande quantité de microbes ; c'est même là son grand inconvénient car leur isolement devient difficile et c'est sans doute à cet obstacle que Toussaint dut l'insuccès de ses travaux. Dans un milieu aussi mobile il est peu aisé en effet, à moins de posséder l'habitude du maître, de recueillir et d'isoler une seule espèce de bactéries, et cependant, comme nous le verrons plus loin, les recherches de l'auteur précédent ne furent peut-être pas aussi infructueuses qu'on pourrait le supposer. Certaines des inoculations faites avec ces cultures déterminèrent l'écllosion de granulations dues sans doute à la tuberculose, à moins cependant qu'il ne se soit agi là d'une de ces pseudo-tuberculoses que nous décrirons plus tard. D'ailleurs la granulation fût-elle réellement de nature tuberculeuse il faudrait encore savoir si le bacille qui l'a déterminée avait augmenté et s'était multiplié dans le terrain de culture, ou s'il y était simplement conservé.

De nouveaux procédés ont rendu facile la culture du microbe et l'ont mise à la portée de tous, grâce à l'emploi des milieux solides. Mais il est intéressant de connaître d'abord le procédé qu'employa Koch et dont l'usage a continué à se maintenir en Allemagne.

Ce n'était plus un bouillon mais le sérum du sang de bœuf ou de mouton dont il se servait comme milieu. Pour se procurer ce sérum, il ouvrait un vaisseau avec un instrument préalablement flambé et stérilisé et en s'entourant

de toutes les précautions antiseptiques. Le sang recueilli, en évitant autant que possible le contact de l'air, était conservé dans des éprouvettes soigneusement fermées et placées ensuite dans une glacière. Ce refroidissement avait un double but, d'abord d'obtenir la séparation plus lente du caillot et du sérum, puis de ralentir le développement des bactéries dont la présence pouvait résulter du contact de l'air, même passager. Vous savez en effet combien le nombre des microbes contenus dans l'atmosphère est considérable et avec quelle facilité la contamination peut se produire. Ces éprouvettes sont maintenues pendant vingt-quatre heures à une basse température, et dans cet intervalle le caillot se forme, laissant surnager le sérum qui est repris et versé dans des tubes à essais flambés auparavant et obturés de suite au moyen de petits tampons de coton. Il ne reste plus qu'à stériliser et à coaguler le sérum.

Koch dans ce but emploie le procédé connu sous le nom de méthode du chauffage discontinu. Voici en quoi il consiste : chaque jour les tubes sont portés pendant une heure à une température de 55 à 60 degrés, et cela pendant six jours consécutifs.

La stérilisation étant ainsi obtenue, il suffit pour coaguler et gélatiniser ce sérum, de le porter une dernière fois à 65 ou 68 degrés, en ayant soin toutefois de maintenir les tubes inclinés pendant cette opération ; cette inclinaison permet d'augmenter et de rendre plus facile à atteindre la surface à ensemercer. En chauffant ainsi les tubes, seule-

ment une heure par jour à 55 degrés, on tue les microbes arrivés à leur développement complet ; mais cette température est insuffisante pour détruire les spores.

Dans les vingt-trois heures suivantes elles accomplissent leur évolution et succombent à leur tour à la nouvelle élévation de température. Au bout de quelques séances la stérilisation est complète.

Voilà le procédé de Koch du moins tel qu'il l'a décrit, mais en réalité pour obtenir la gélatinisation dans ces conditions, il y a vraisemblablement, permettez-moi l'expression, un *tour de main* dont l'auteur allemand garde soigneusement le secret.

En effet, mon préparateur, M. le D<sup>r</sup> Martha, étant allé à Berlin pour étudier la méthode de Koch, on lui fit connaître, avec la plus grande amabilité d'ailleurs, le mode de préparation du sérum, mais lorsqu'il arriva au rendez-vous qui lui avait été donné pour assister à la coagulation de ce liquide, l'opération avait été hâtivement terminée.

Heureusement nous pouvons nous passer de ce détail, et les recherches de Nocard, communiquées à la Société de Biologie en 1885, nous ont mis en possession d'un procédé comparable à celui des Allemands. A 100 grammes de sérum, il suffit d'ajouter un gramme de peptone et 0,25 centigrammes de sucre et de chlorure de sodium. On obtient sur ce milieu de très belles cultures, mais la préparation du sérum est longue, la stérilisation en est encore difficile ; aussi, poursuivant ses recherches Nocard trouva avec Roux,

en décembre 1886, une nouvelle formule beaucoup plus perfectionnée. Ce procédé très simple consiste à additionner le sérum d'une certaine quantité de glycérine. Il est même possible de remplacer le sérum par de l'agar-agar ou de la gélose<sup>1</sup>, substance naturellement gélatineuse qu'il est facile de porter à 100 et quelques degrés dans l'autoclave de Chamberland et d'en opérer ainsi rapidement et avec sûreté la stérilisation.

Et cependant on chercha mieux encore. Dans le laboratoire du professeur Grancher, le D<sup>r</sup> Hippolyte Martin fit l'essai de bouillons obtenus par décoction de la chair de différents animaux et obtint les meilleurs résultats avec ceux qui avaient été préparés avec les muscles du singe et du hareng.

Depuis les travaux de Nocard et de Roux tous les bactériologistes ont pu reproduire facilement la culture des bacilles tuberculeux. Nocard lui-même put, par son procédé, arriver à la vingtième culture en quelques mois ; je conserve même dans mon laboratoire un de ces tubes datant de 1886 et dont la conservation est encore parfaite. Les nombreuses cultures que j'ai faites avec l'aide de M. le D<sup>r</sup> Würtz, me permettent de vous affirmer la certitude absolue de ces résultats.

Mais jusqu'ici nous n'avons appris qu'à nous procurer le terrain favorable à l'évolution du microbe ; il faut encore

<sup>1</sup> Gélose, mélange d'agar-agar, bouillon et gélatine.

l'ensemencer et étudier les précautions minutieuses qui seules nous permettront de l'obtenir à l'état de pureté. Pour pratiquer cet ensemencement vous prendrez un fil de platine dont une des extrémités est fixée dans une baguette de verre, et l'autre recourbée en formant une sorte de petit anneau. Ce fil, au moment même où l'on s'en sert, doit être chauffé au rouge afin de le débarrasser complètement des organismes qui pourraient s'être déposés à sa surface ou résulter d'une opération antérieure. Puis après l'avoir chargé de la bactérie à ensemencer, le tube étant retourné, l'ouverture dirigée vers le sol afin d'empêcher l'introduction des germes de l'air, on promène l'extrémité du fil en grattant la surface de la gélose, un nombre de fois égal à celui des stries que l'on veut obtenir. Le tube soigneusement et rapidement rebouché est porté dans l'étuve. Mais avant de voir les diverses précautions dont il faudra entourer cette manipulation, il faut savoir à quelle source nous nous adresserons pour nous procurer ce qu'on peut appeler réellement la graine de la culture. Chez l'homme, les sources en sont multiples ; un point important c'est de nous procurer cette graine avec le maximum de pureté possible.

Le bacille de la tuberculose en effet se développe lentement et on comprend toute la difficulté qu'il aurait à croître, et celle qu'on aurait à le reconnaître, si des organismes d'une vitalité plus grande et d'un accroissement plus rapide se développaient concurremment avec lui dans un même milieu.

C'est assez dire que ce n'est pas sur la table, de l'amphithéâtre que vous trouverez ces conditions réunies ; mais il est des opérations qui tout en étant entre les mains du chirurgien un moyen de traitement constituent pour la bactériologie de véritables expériences. Il est des arthrites fongueuses, des ganglions hypertrophiés et suppurés, des abcès véritablement enkystés, dont la nature tuberculeuse est indiscutable. Prenez un de ces organes enlevés par le bistouri du chirurgien, et dans votre laboratoire, après en avoir flambé la surface, ouvrez-le en vous servant d'un instrument parfaitement stérilisé, et le centre de cet organe vous fournira la source dont vous avez besoin. Une culture précédente ou les granulations trouvées chez un animal auquel vous avez infligé préalablement une tuberculose expérimentale pourront être avantageusement utilisées. Pour vous prémunir contre toute espèce de mécompte il sera toujours d'une pratique prudente d'ensemencer plusieurs tubes à la fois et d'inoculer quelque cobaye ou lapin.

Lorsque ces différentes formalités, dont la minutie vous paraît peut-être exagérée mais constitue une condition indispensable de succès, auront été réalisées, il vous restera encore à favoriser le développement et la pullulation de la bactérie ensemencée.

Deux facteurs d'une importance capitale interviennent dans cette pullulation, la chaleur et l'humidité, et encore doivent-elles être réalisées dans des limites extrêmement étroites. C'est à une température oscillant entre 38 et 40 degrés,

maintenue avec une régularité parfaite, qu'il faut soumettre les tubes contenant les cultures. A 40 degrés le développement se ralentit, il s'arrête à 42 degrés, il en est de même si la température demeure inférieure à 38 degrés. Nous reviendrons plus tard d'ailleurs sur l'importance de cette notion dans l'étiologie de la tuberculose. L'humidité n'est pas moins nécessaire. Si difficile que puisse paraître la réalisation d'une semblable condition, vous l'obtiendrez facilement si vous possédez la merveilleuse étuve de d'Arsonval. De par le mode de préparation de la gélose il persiste au fond du tube, indépendamment de la matière solidifiée, une petite quantité de liquide, que l'on verra s'accumuler en plaçant le tube dans une position verticale. Vous vous garderez soigneusement de la rejeter et pour que l'évaporation résultant d'une température fixe de 38 à 39 ne vienne pas la soustraire, le tube, outre son bouchon de ouate, sera muni d'une lame de caoutchouc qui en assurera l'obturation hermétique. De plus, une éprouvette remplie d'eau placée dans l'étuve y maintiendra une humidité constante.

Bien qu'ayant scrupuleusement rempli les conditions indiquées précédemment, les premiers jours se passeront sans que rien vienne vous révéler l'apparition d'un organisme à la surface de la culture. C'est qu'en effet la première période de son développement peut passer pour latente et au sixième ou au dixième jour seulement apparaîtront là où a porté le fil de platine de petites saillies blanchâtres, légèrement opalescentes disposées en stries répondant à celles de

l'ensemencement. De profil surtout, la surface paraîtra hérissée de petites granulations mamelonnées et dont les bords tendront à se rejoindre. Bien que dans la période que nous avons appelée latente, la loupe ne révèle la présence d'aucune production, un grossissement plus considérable permet d'apercevoir les inégalités commençantes de la surface. Si vers cette même époque vous préparez des lamelles par impression, « Klatsch Präparat » des Allemands, c'est-à-dire que si sur ces cultures commençantes vous appliquez la surface d'une lamelle, vous en obtenez un véritable décalque, qui, traité par les réactifs colorants, apparaît constitué par une multitude de bacilles toujours immobiles, comme vous le savez, et qui par leur groupement forment des amas, des stries, des sinuosités plus ou moins entrecroisées. En avançant en âge, ces mamelons deviennent de plus en plus saillants, ils s'étendent et se relient les uns aux autres et vers la quatrième semaine ils ont envahi la presque totalité de la surface de la gélose, sans que cependant chaque granulation, prise individuellement, arrive à dépasser la dimension de 1 ou 2 millimètres.

Mais ce développement ne s'effectue régulièrement que dans les conditions que nous avons indiquées plus haut. La culture vient-elle à être soustraite au milieu qui lui convient, la pullulation s'arrête, et peut ainsi sommeiller pendant des mois. Après un laps de temps fort long, si les cultures sont placées de nouveau dans l'étuve, la reproduction reprend là où elle s'était arrêtée et continue son évolu-

tion normale. Dans le bouillon, la glycérine, la marche est identique, et peut-être, somme toute, Toussaint a-t-il obtenu des cultures qu'il méconnut. A mon avis en m'appuyant sur l'aspect que révèle le microscope dès les premiers jours, je crois pouvoir affirmer que le développement du bacille de Koch est plus hâtif qu'on ne le croit généralement.

Mais si les cultures contiennent toujours des bacilles, leurs formes peuvent varier suivant leur âge. C'est ainsi qu'allongés sur une culture jeune nous les voyons dans la culture faite en 1886 que je tiens de M. Nocard et dans toutes les cultures anciennes, prendre l'aspect sporulé. Je n'oserais pourtant affirmer que les renflements que nous apercevons dans leur continuité soient réellement des spores et la manière dont elles se comportent vis-à-vis des matières colorantes confirme notre doute. Ces différents aspects méritent d'être signalés et nous verrons leur importance diagnostique dans la recherche des bacilles.

Nous avons terminé ce qui a directement trait aux cultures proprement dites et nous pouvons aborder maintenant le réactif animal, les inoculations, la pathologie expérimentale. Si Villemin fut le premier à mener à bien les expériences de cet ordre, il fut néanmoins précédé dans cette voie par quelques expérimentateurs qu'il serait injuste d'oublier. Hébréard, médecin de Bicêtre, tenta quelques recherches expérimentales sur les animaux et n'obtint d'ailleurs aucun succès. Je ne citerai que pour mémoire les

expériences entreprises sur les animaux par Lepelletier, de la Sarthe, expériences qu'il eut le courage de répéter sur lui-même, heureusement d'ailleurs sans aucun succès. Kortum osa se permettre des inoculations sur de jeunes enfants, prenant pour excuse la certitude qu'il disait avoir de l'innocuité de cette pratique. Sur l'un deux il exécuta des frictions avec de la substance tuberculeuse; l'autre fut inoculé au moyen d'une lancette avec du liquide provenant d'un ulcère scrofuleux. Ces inoculations furent sans résultat et elles devaient l'être, la friction, comme procédé, ne pouvait être une méthode d'inoculation, et quant à la seconde expérience nous savons que le liquide des ulcères scrofuleux ne contient que de rares bacilles et il est probable que la très petite quantité de liquide insérée sous la peau n'en contenait aucun. Nous n'insisterons pas sur les expériences d'Alibert et de Guersant.

Mais en 1865, Villemin, dans des expériences conçues avec un plan bien déterminé et exécutées suivant une méthode rigoureuse, démontra dans un mémoire demeuré justement célèbre l'inoculabilité et la virulence incontestable de la tuberculose.