

avait cultivé. MM. Roux et Yersin ont été plus heureux. « Des paralysies, écrivent-ils, s'observent chez les animaux inoculés de la diphthérie, soit dans la trachée, soit sous la peau. C'est même un phénomène très fréquent lorsque les animaux ne succombent pas à une intoxication trop rapide ».

Le premier cas de paralysie diphthéritique expérimentale fut observé par eux sur un pigeon qui, inoculé dans le pharynx, avait eu de belles fausses membranes et paraissait guéri.

Les lapins qui résistent aux accidents immédiats de la diphthérie inoculée dans la trachée présentent le plus souvent ces symptômes paralytiques, auxquels ils finissent par succomber.

La terminaison ordinaire chez le lapin inoculé dans les veines avec un centimètre cube de culture pure est la mort dans un délai de quatre jours, ainsi que nous l'avons dit plus haut, et l'accident terminal est une paralysie généralisée.

« Lorsque la mort ne survient pas dans un délai aussi court, la paralysie est plus facile à observer. »

Elle débute d'ordinaire par le train postérieur, et parfois elle est si rapidement progressive qu'en un ou deux jours elle a envahi tout le corps, et que l'animal meurt par arrêt de la respiration et du cœur. « D'autres fois la paralysie reste limitée pendant un certain temps aux pattes postérieures; elle commence par une faiblesse des muscles qui donne à la démarche une allure particulière, puis elle devient plus complète, et les mouvements du train antérieur sont seuls conservés. La maladie est presque toujours envahissante; la paralysie gagne le cou et les membres antérieurs. Il n'est pas rare de voir la mort survenir subitement sans convulsions, surprenant l'animal dans l'attitude où on venait de le voir quelques instants auparavant. Un groupe de muscles peut être frappé tout

d'abord; ainsi on voit des lapins dont les pattes de derrière sont écartées du corps, comme si l'action des abducteurs était supprimée. Quand ils marchent, leurs membres postérieurs ne se détendent plus, ils avancent l'un après l'autre sans se détacher du sol. Lorsque les pattes du devant sont atteintes à leur tour, l'allure devient comme rampante. Bien que la paraplégie soit le début le plus fréquent, la paralysie peut aussi porter sur les muscles du cou, de façon que la tête ne peut se soulever du sol, et aussi sur les muscles du larynx, ce qui donne la raucité à la voix. »

Nous avons vu ci-dessus que les chiens inoculés avec des cultures de diphthérie sous la peau ou dans la trachée mouraient avec des phénomènes de paralysie très marquée.

IV. — Caractères biologiques du bacille diphthéritique.

- Vitalité dans les cultures et les fausses membranes.
- Virulence, vitalité et atténuation. — Bacille pseudo-diphthéritique.

1. *Vitalité dans les milieux de culture.* — « Le bacille diphthéritique se conserve très longtemps vivant dans les cultures; il n'est pas rare de trouver des colonies actives sur des tubes de sérum restés pendant plus de six mois à la température de la chambre. Des cultures en bouillon pourraient encore être rajeunies après un séjour de cinq mois à 37° et de deux mois à 39°. Enfermées en tubes clos, sans air et à l'abri de la lumière, elles conservent plus longtemps encore leur vitalité et leur virulence. Les bacilles contenus dans de semblables tubes, datant de treize mois, nous ont donné des cultures actives. Il ne se forme pas cependant de germes dans ces vieilles cultures; les microbes ont des formes renflées ou allongées; ils se colorent mal ou ne se colorent plus, mais ils périssent

comme les bacilles jeunes quand on les chauffe à 58 degrés. »

La température de 58°, maintenue quelques minutes, est en effet la température de destruction pour les germes diphthéritiques en culture humide, non desséchée.

Les bacilles desséchés en provenance de sérum se comportent de la façon suivante : Conservés à 33° à l'abri de la lumière ils sont morts après trois mois; conservés à la température de la chambre, à l'abri de la lumière, ils meurent après quatre mois. Il suffit de quatre jours à la température de 45° pour stériliser entièrement ces germes.

Notons que si à l'état humide le virus diphthéritique ne résiste pas à la température de 58° maintenue pendant quelques minutes, le virus sec supporte sans peine une température de 98° maintenue pendant plus d'une heure.

2. *Vitalité dans les fausses membranes.* — MM. Roux et Yersin rapportent dans leur troisième mémoire les deux expériences suivantes, qui éclairent vivement cette intéressante question :

a) « Une fausse membrane extraite de la trachée d'un enfant, au moment de la trachéotomie, est ensemencée sur sérum puis *enveloppée dans un linge*. Quand elle est *sèche*, on plie le linge dans du papier et on place le tout dans une *armoire fermée* à la température de la chambre. Sur le sérum il s'est développé dès le lendemain de nombreuses colonies spécifiques. Trois mois après on fait un nouvel ensemencement avec un fragment de la membrane sèche : après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve, la surface du sérum porte beaucoup de colonies de bacilles diphthéritiques. Après cinq mois de dessiccation la fausse membrane donne encore des colonies sur sérum : elles croissent un peu plus lentement et sont moins nombreuses,

mais elles sont formées par de beaux bacilles. »

b) « Une autre fausse membrane, séchée de la même façon sur le linge et également très riche en bacilles diphthéritiques a été conservée, *suspendue à l'air* et exposée au *soleil* et à la *pluie* pendant les mois d'avril et de mai 1890. Les ensemencements qui ont été faits avec cette membrane, restée aux intempéries pendant un mois et demi, n'ont donné aucune colonie diphthéritique. »

C'est donc surtout, et les exemples cités par les auteurs en maints cas confirment l'étude expérimentale, à l'abri du soleil et de l'humidité, dans un lieu où l'air ne se renouvelle pas, que le germe diphthéritique garde le plus longtemps sa vitalité.

3. *Virulence variable du bacille de Klebs.* — *Bacille atténué.* — *Bacille pseudo-diphthéritique.* — La virulence des bacilles de Klebs que fournissent les divers cas de diphthérie humaine est loin d'être toujours identique.

La virulence d'un bacille de Klebs donné s'établira par le critérium expérimental suivant : On fait une culture dans le bouillon, et après vingt-quatre ou trente heures de séjour à l'étuve on prélève un centimètre cube qu'on inocule sous la peau d'un cobaye. La réaction sur l'animal donnera le degré de virulence. Un bacille très virulent tue en vingt-quatre à trente heures et quelquefois moins. A mesure que la virulence faiblit le délai de survie s'allonge et l'animal peut arriver à ne périr qu'en huit à dix jours. A un degré plus faible encore, l'animal ne succombe pas : il n'y a qu'une lésion locale, un œdème suivi d'eschare; enfin l'œdème peut même ne pas se produire; l'inoculation est absolument inoffensive : *la virulence est nulle.*

On peut dire d'une façon générale que :

a) La virulence des bacilles de Klebs est grande quand on s'adresse à des diphthéries très graves : ces

cas ne comportent que peu de bacilles non virulents ;

b) Dans les diphthéries bénignes, à côté des bacilles de grande virulence, il existe des bacilles de virulence moyenne, et des bacilles non virulents, ne donnant que de l'œdème aux cobayes, ou mieux restant sans action sur ces animaux.

c) Enfin, dans la bouche des personnes saines, dans diverses angines non diphthériques, on trouve un bacille absolument analogue au bacille diphthérique par son aspect au microscope, l'apparence de ses colonies, mais sans aucune virulence; analogue en un mot au bacille diphthérique non virulent des angines diphthériques bénignes; ce bacille porte le nom de *pseudo-diphthérique*.

a) *Bacille virulent*. — *Son atténuation*. — Les caractères expérimentaux du bacille virulent ont été étudiés ci-dessus. La question de son atténuation régulière n'est pas encore résolue. Nous allons exposer les quelques données que nous possédons à ce sujet, et qui sont presque exclusivement dues à MM. Roux et Yersin :

Quand on inocule à des cobayes des cultures de diphthérie conservées « pendant longtemps à la température de la chambre ou à l'étuve, ils ne succombent pas, bien que les cultures employées se soient montrées *très actives*, quand elles étaient plus jeunes ». « Les bacilles qu'elles contiennent ne sont cependant pas morts : il suffit de les porter dans du bouillon pour qu'ils pullulent à nouveau. Il semble donc qu'avec le temps leur virulence a diminué. Cette conclusion est erronée : elle dépasse l'expérience qui prouve seulement qu'une vieille culture inoculée directement n'a pas tué les cobayes, ce qui n'autorise pas à dire qu'elle est atténuée. En effet une culture est *atténuée quand,ensemencée, elle donne une culture nouvelle atténuée comme elle*. Le

caractère de l'atténuation véritable, c'est d'être *héréditaire*. Il suffit de semer à nouveau les vieilles cultures de diphthérie pour voir qu'elles ne sont pas dans ce cas. La culture *renouvelée* tue les cobayes, et nous voyons sortir de notre culture âgée, inactive, un bacille mortel. Si les bacilles anciens ne tuent pas, c'est qu'ils ne germent pas sous la peau des cobayes : il suffit de les rajeunir pour leur rendre leur virulence.

L'atténuation d'un bacille diphthérique virulent peut s'obtenir artificiellement dans le laboratoire. Voici un moyen employé par MM. Roux et Yersin : Il consiste à cultiver le bacille que l'on veut atténuer dans un ballon de Fernbach, c'est-à-dire un ballon à deux tubulures latérales. Le ballon est mis à l'étuve à 39°,5 et par les tubulures latérales on fait passer un courant d'air aspiré par une trompe à eau. Dans ces conditions, il arrive un moment où la culture d'abord très virulente s'atténue, tue les cobayes avec retard, ne leur donne plus qu'un œdème plus ou moins marqué ou même reste tout à fait inoffensive.

« Les bacilles diphthériques finissent donc par périr quand ils sont cultivés à la température de 39°,5-40° dans un courant d'air ; avant leur mort ils perdent leur virulence. Cette atténuation est tantôt rapide, tantôt lente ; parfois elle paraît se faire brusquement, quelque temps à peine avant la mort des bacilles. On n'obtient pas de virulences intermédiaires aussi régulières que dans l'atténuation du charbon. »

Un autre moyen d'atténuer un bacille virulent est la dessiccation combinée à l'action de l'air. Nous avons dit ci-dessus « que le virus diphthérique desséché se conserve pendant très longtemps, et qu'une fausse membrane sèche donne après cinq mois un grand nombre de colonies si on l'ense-

mence sur sérum. *Mais ces colonies ne sont plus virulentes.* »

Il est donc possible, en partant d'un bacille virulent, d'obtenir un bacille dépourvu de virulence « tout à fait semblable aux bacilles atténués que l'on trouve dans les angines diphthéritiques bénignes ou dans la bouche de certaines personnes en bonne santé (bacille pseudo-diphthéritique) ».

Le bacille atténué peut-il reprendre sa virulence et comment? Pour la diphthérie comme pour le charbon, la virulence ne peut être récupérée, *quand elle est descendue trop bas.* Tous les efforts tentés par MM. Roux et Yersin pour renforcer la virulence d'un bacille de Klebs ayant perdu toute action sur le cobaye ont échoué. Leurs tentatives « ont été plus heureuses en prenant comme point de départ un bacille qui avait encore une légère action sur le cobaye. Le renforcement a été obtenu en associant ce virus non mortel au streptocoque de l'érysipèle et en inoculant le mélange aux cobayes. Cette expérience ne réussit pas toujours. Elle nécessite l'emploi d'un microbe de l'érysipèle extrêmement actif ».

Le bacille de Klebs artificiellement atténué présente tous les caractères spéciaux qui sont le propre des bacilles naturellement atténués (angines diphthéritiques bénignes) ou du bacille pseudo-diphthéritique : Il pousse plus abondamment en milieu liquide, rend le bouillon plus rapidement alcalin et croît peu dans le vide.

b) *Bacille non virulent.* — Nous avons dit où se trouve, chez le diphthéritique, cette variété de bacille de Klebs, naturellement dépourvue de virulence. Elle est le propre des angines diphthéritiques bénignes, ou de l'époque de terminaison favorable des angines graves. Nous avons défini ses caractères expérimentaux, dit qu'ils pouvaient

varier d'une action encore légère sur le cobaye (œdème, avec quelquefois petite eschare) à une action absolument nulle. Les caractères un peu spéciaux de culture sont ceux assignés au bacille artificiellement atténué, ou au bacille pseudo-diphthéritique. Il est actuellement impossible de réveiller la virulence de cette variété quand elle a disparu en totalité.

c) *Bacille pseudo-diphthéritique.* — « Löffler, le premier, a signalé dans les fausses membranes croupales un bacille tout à fait semblable au bacille diphthéritique, mais qui en diffère en ce qu'il n'a aucune action nocive sur les animaux. M. G. Hoffmann a rencontré ce même bacille dans la diphthérie, et aussi dans les angines scarlatineuses et rubéoliques. Après ces auteurs, beaucoup d'expérimentateurs ont trouvé ce microbe soit dans la bouche des diphthéritiques, mélangé au microbe spécifique, soit dans la bouche de personnes bien portantes. »

Le bacille pseudo-diphthéritique a été trouvé par MM. Roux et Yersin quinze fois sur quarante-cinq sujets entrés à l'hôpital des Enfants pour des affections très diverses, mais autres que la diphthérie. Vingt-six fois ils l'ont rencontré sur cinquante-neuf examens faits dans une école d'un village du Calvados, au bord de la mer, village où depuis longtemps aucun cas de diphthérie n'avait été relevé. Ces chiffres, sans valeur absolue, montrent néanmoins que le bacille pseudo-diphthéritique est très répandu et qu'on peut le considérer comme un hôte fréquent de la bouche chez les personnes saines.

Il se rencontre aussi — comme Hoffmann l'avait signalé — dans les angines non diphthéritiques. « Les enfants malades, d'angine simple l'ont donné deux fois. Sept rubéoleux l'ont fourni cinq fois. »

Les caractères morphologiques et de culture du

bacille pseudo-diphthérique sont, à quelques nuances près, ceux du bacille diphthérique virulent : identité des colonies sur sérum ; croissance à 33-35° en bouillon avec dépôt sur la paroi des vases de culture ; coloration, soit uniforme, soit granuleuse suivant les cas, par le bleu de Löffler, de Kühne, ou le Gram. Enfin mort à 38° en moins de dix minutes.

Les nuances qui séparent les bacilles virulents du pseudo-diphthérique sont les suivantes :

« Le pseudo-diphthérique est souvent plus court dans les colonies sur sérum ; ses cultures dans le bouillon sont plus abondantes ; elles se continuent à une température de 20-22°, à laquelle le bacille vrai croît très lentement. Quand on fait par comparaison des cultures des deux bacilles dans du bouillon, elles deviennent acides, puis alcalines ; les changements de réaction se produisent beaucoup plus vite dans celles du bacille pseudo-diphthérique. Comme le diphthérique vrai, le pseudo-diphthérique pousse dans le vide, mais moins abondamment, ce qui est l'inverse de ce qui se passe dans les cultures à l'air. »

Les réactions sur le cobaye forment la véritable différence entre le pseudo-diphthérique et le diphthérique spécifique : « L'inoculation de ces bacilles pseudo-diphthériques n'a jamais donné la mort aux animaux : on pouvait toutefois remarquer que les uns causaient aux cobayes des œdèmes notables, que d'autres en produisaient de très petits, que d'autres enfin ne faisaient aucune lésion locale. »

Quelle est la relation véritable entre ces deux bacilles, que Löffler séparait radicalement, que d'autres auteurs, Escherich, par exemple, réunissent dans une même espèce, l'un n'étant pour eux que la forme atténuée de l'autre ?

Nous adoptons entièrement cette dernière opi-

nion, que MM. Roux et Yersin ont présentée sous une forme saisissante : « Les différences morphologiques que l'on a relevées entre eux, disent-ils, sont si faibles qu'elles ne prouvent rien. Ces organismes ne peuvent être distingués que par leur action sur les animaux, mais la différence de virulence ne comporte nullement la différence d'origine. Au point de vue de la forme, de l'aspect des cultures, le bacille diphthérique et le bacille pseudo-diphthérique diffèrent moins entre eux que le charbon virulent et le charbon très atténué, qui viennent cependant d'une même souche. D'ailleurs la distinction que nous faisons entre les bacilles virulents et les non virulents est arbitraire : elle repose sur la réceptivité des cobayes. Si nous inoculons des animaux plus sensibles, il est des bacilles pseudo-diphthériques que nous rangerions parmi les virulents, et si, au contraire, nous remplaçons dans nos essais les cobayes par les lapins, il est des bacilles diphthériques que nous appellerions pseudo-diphthériques. Dans les expériences on ne rencontre pas seulement un bacille virulent et un bacille non virulent : entre ces deux extrêmes il y a des bacilles à tous les degrés de virulence. Parmi ceux qui sont vraiment diphthériques, les uns tuent en vingt-quatre heures, d'autres en soixante heures, d'autres en trois à quatre jours, d'autres en un temps plus long encore : il ne viendra cependant à l'idée de personne que ces microbes d'activités diverses n'appartiennent pas à la même espèce. Pourquoi alors séparer ceux qui ne diffèrent que par une virulence moindre encore ? Où ferons-nous commencer le pseudo-diphthérique ? au bacille qui ne donne plus d'œdème au cobaye, ou à celui qui le produit un peu ?... »

L'identité paraît absolue entre les deux espèces ; il manque la dernière preuve : la production du

bacille pseudo-diphthérique en partant du bacille virulent et la production du bacille virulent en partant du bacille pseudo-diphthérique.

On atténue le bacille virulent, nous l'avons dit, jusqu'à le réduire à l'état de pseudo-diphthérique; mais on ne peut élever le bacille pseudo-diphthérique — non plus d'ailleurs que le bacille virulent artificiellement atténué — au rang de bacille virulent.

L'identité reste donc seulement très probable. La conclusion qu'il y a lieu de tirer d'un bacille de nature diphthérique dans la bouche de personnes saines ou chez les angineux non diphthériques, nous la dirons ailleurs.

Les services que la connaissance du bacille de Koch a rendus à la clinique pour le diagnostic de la tuberculose, la connaissance du bacille de Klebs les rend aujourd'hui pour le diagnostic de la diphthérie. La constatation du bacille spécifique est devenue le critérium différentiel, et un procédé des plus simples, à la portée de tous, assure aujourd'hui le diagnostic des angines diphthériques, qui mettait quelquefois dans l'embarras les cliniciens les plus exercés. En même temps s'est constituée l'histoire microbiologique des fausses angines diphthériques, histoire encore assez peu avancée, d'ailleurs.

V. — Des applications à la clinique de la connaissance du bacille de Klebs. — Diagnostic et pronostic de la diphthérie humaine par les procédés microbiologiques.

Le bacille de Klebs n'existe que dans les fausses membranes diphthériques : il se trouve là et là seulement. C'est là qu'il vit, là qu'il fabrique l'énergique poison dont nous parlerons ci-après, poison qui détermine la mort du sujet diphthérique. C'est

donc dans la fausse membrane qu'il faut le chercher pour établir le diagnostic de diphthérie.

Les opérations, bien simples à pratiquer, sont les suivantes :

1. Examen microscopique de la fausse membrane ou de son raclage :

2. Ensemencement de ce produit diphthérique; séparation des colonies diphthériques et inoculation expérimentale des colonies isolées.

1. On peut faire des coupes de fausses membranes enlevées sur le malade : on durcit dans l'alcool et on colore par la méthode de Gram et l'éosine. On voit au microscope que « les parties superficielles de la fausse membrane sont formées par une couche de *petits bacilles* presque à l'état de pureté. Ce sont les bacilles de Klebs. Ils sont séparés de la muqueuse dépouillée de son épithélium par une couche de fibrine granuleuse et par un réseau fibrineux adhérent au tissu muqueux dont les vaisseaux très dilatés ont laissé échapper des globules rouges. Souvent aussi la zone la plus superficielle de la fausse membrane contient des microbes divers, bâtonnets, microcoques et chaînettes, mélangés aux amas des bacilles de Klebs qui sont, au contraire, prédominants immédiatement au-dessous. Ces petits bacilles, disposés comme nous venons de le dire, sont seuls caractéristiques de la diphthérie. » Dans les diphthéries graves, à marche rapide, il peut n'y avoir, pour ainsi dire, que des bacilles de Klebs dans la fausse membrane. Dans d'autres cas les microbes étrangers sont très nombreux, mais en arrière de la couche superficielle, riche en microbes vulgaires, on trouvera toujours emprisonnés, dans la fibrine, de *petits amas* très nets de bacilles spécifiques.

Une méthode plus simple consiste à enlever un

fragment de la fausse membrane, à déposer sur une lamelle et à colorer.

Pour cela on va chercher dans la gorge un fragment de fausse membrane « avec un tampon de coton hydrophile tenu à l'extrémité d'une pince ou fixé à une tige résistante. Les débris membranés, essuyés sur du papier buvard, sont frottés sur des lamelles, de façon que l'enduit qui reste à la surface du verre, vienne de la fausse membrane et ne soit pas fourni par le mucus buccal. Les lamelles séchées et passées à la flamme sont colorées au bleu de Löffler, au bleu de Kühne ou par la méthode de Gram ».

On examine, et « au milieu des autres microbes, les bacilles diphthériques, *souvent groupés en amas*, apparaissent souvent sous forme de bâtonnets à bouts un peu amincis et arrondis, légèrement recourbés, renflés en poire ou en massue, granuleux et inégalement teints. Par la méthode de Gram, ils se colorent d'une façon intense ».

Le bleu de Roux (bleu composé, mélangé de violet dahlia et de vert de méthyle, dont nous avons parlé ci-dessus) donne les meilleurs résultats pour l'examen extemporané. Il suffit de mettre sur la lamelle à examiner une goutte de ce bleu, d'appliquer celle-ci presque aussitôt sur la lame porte-objet, en essuyant l'excès de matière colorante. Sous le microscope, on voit que, parmi tous les bacilles des fausses membranes, ce sont les bacilles spécifiques qui se colorent le plus vite et avec le plus d'intensité.

Les bacilles de Klebs ne font jamais défaut dans la diphthérie. « Dans certains cas graves, on les trouve presque à l'état de culture pure; d'ordinaire ils sont mélangés à beaucoup d'autres microbes, mais, en parcourant les préparations, on rencontre de petits paquets de bacilles caractéristiques. »

2. L'examen microscopique, tout utile qu'il soit, ne suffit pas. Si on veut établir le diagnostic de la diphthérie d'une façon certaine, il faut, en outre, *isoler* le bacille diphthérique et l'obtenir à l'état de culture pure.

L'isolement se fait sur *sérum*, d'après une méthode imaginée par Löffler: « le sérum est un milieu si favorable à la croissance du bacille diphthérique que celui-ci forme des colonies très apparentes en moins de vingt-quatre heures, alors que la plupart des bacilles d'impureté ont à peine commencé à végéter (1). »

On procède de la manière suivante: on charge une spatule de platine du raclage de la fausse membrane qui a déjà servi à l'examen microscopique, ou bien on va directement gratter une fausse membrane de la gorge, et, *sans recharger la spatule*, on ensemence successivement deux ou trois tubes de sérum.

« On met à l'étuve à 35° et le plus souvent après vingt heures, les colonies diphthériques se distinguent nettement par l'aspect spécial que nous avons décrit en traitant des cultures. Elles restent petites sur les premiers tubes semés, parce qu'elles sont très serrées, tandis qu'elles s'étalent et grossissent sur les tubes ensemencés les der-

(1) M. N. Sakharoff a proposé de substituer au sérum, dans la pratique des examens diagnostiques, le blanc d'œuf cuit. On découpe au couteau flambé des tranches oblongues de ce blanc d'œuf, et on les dépose au fond de tubes flambés, où l'on a versé au préalable quelques gouttes d'eau stérile. L'ensemencement du bacille de Klebs sur ce milieu donne en vingt-quatre heures, « à la température de 35-40°, une série de petites colonies rondes, faciles à reconnaître à leur forme convexe et à leur nuance particulière. Elles sont moins blanches que le fond sur lequel elles se détachent. Elles sont mates et peu transparentes. Parfois leur couleur, vers le douzième jour, tourne au jaune rougeâtre, ou prend des teintes chair ». (*Annales Pasteur*, 1892, p. 449.)

niers et prennent un aspect tout à fait caractéristique. »

Le diagnostic à l'œil de la colonie diphthérique doit toujours être contrôlé par l'examen microscopique des germes de la colonie.

Enfin, de ces colonies, il faut préparer les cultures pures pour essayer leur action sur le cobaye, pour connaître, en d'autres termes, leur virulence (1), notion qui importe au pronostic, comme nous le disons ci-dessous.

La méthode de diagnostic par l'ensemencement et l'isolement du bacille de Klebs à l'état de pureté peut donner des renseignements utiles, même dans le cas de *croup sans angine*. En grattant légèrement avec la spatule la muqueuse des amygdales et du pharynx, on peut obtenir une semence diphthérique des plus nettes sur sérum, et établir le diagnostic de croup diphthérique.

La méthode de MM. Roux et Yersin a permis de résoudre une intéressante question : Le bacille de la diphthérie persiste-t-il, et combien de temps, dans la bouche, après la disparition des fausses membranes ? La recherche de contrôle se fait en grattant, avec la spatule de platine, la muqueuse des amygdales et du pharynx et en ensemençant du sérum. Ces auteurs ont pu constater que la disparition du bacille de Klebs avec le retour de la muqueuse à l'état normal n'était pas toujours la règle. Le bacille de Klebs peut disparaître de la bouche en même temps que la fausse membrane, mais il peut

(1) Les colonies obtenues par ensemencement direct du sérum contenant toujours quelque impureté, on les purifie en en prélevant une parcelle au fil de platine; on porte cette semence dans un tube à essai contenant 10 centimètres cubes de bouillon stérile; on agite pour répartir; alors, avec une anse de platine ou avec une pipette, on prélève un peu de la dilution qu'on étale sur sérum. En vingt-quatre heures on a des colonies pures, qu'on sème en bouillon. Avec ces bouillons on fait les inoculations au cobaye.

y persister avec sa virulence pendant un laps de temps variable : MM. Roux et Yersin l'ont trouvé, trois, onze et même quatorze jours après toute disparition de fausses membranes. Ces faits expérimentaux sont l'explication de quelques faits cliniques où l'on voit la diphthérie apportée dans un milieu indemne jusque-là, par des enfants convalescents de diphthérie (1).

Les recherches microbiologiques peuvent aider aussi non seulement au diagnostic, mais dans une certaine mesure au pronostic de la diphthérie.

Dans les diphthéries graves, à marche rapide, la fausse membrane est, nous l'avons dit, presque une culture pure du bacille de Klebs : il y a donc là une indication pronostique.

Dans les cas qui marchent vers la guérison, les bacilles spécifiques deviennent moins nombreux, tandis que les microbes d'impureté augmentent. « Quelquefois, même au début de la diphthérie, on peut prédire une issue favorable, si on constate qu'il y a peu de bacilles spécifiques, et beaucoup d'autres microbes, notamment certains cocci. »

Mais c'est surtout sur la virulence des bacilles extraits de fausses membranes qu'on peut chercher à baser ce pronostic.

Nous avons dit ci-dessus ce qu'il fallait entendre par la virulence du bacille de Klebs : c'est le mode de réaction sur le cobaye.

Dans quarante cas de diphthérie mortelle, MM. Roux et Yersin inoculent les bacilles de Klebs isolés aux cobayes. Ceux-ci meurent tous dans un délai variant de vingt-quatre heures à deux et quatre jours : le virus diphthérique, mortel pour l'homme, est aussi très meurtrier pour les cobayes. Les bacilles

(1) Il faut d'ailleurs faire une part dans ces faits au transport du germe par les vêtements, qui, dans l'espèce, est une explication aussi plausible que celle donnée ci-dessus.

non virulents se rencontrent d'ailleurs aussi dans ces cas mortels, mais y sont toujours en petit nombre.

Trente-neuf cas de diphthérie non mortelle — ayant d'ailleurs évolué avec une allure clinique variable ou sévère, ou moyennement grave ou légère — ont donné des cultures pures inoculées à des cobayes : « dix-sept ont amené la mort des animaux en moins de trois jours : sept ont tué dans un délai qui a varié de quatre à neuf jours; cinq n'ont fait périr qu'une partie des animaux inoculés; dix se sont montrées inactives, mais à des degrés divers, les unes donnant un œdème suivi d'eschare, les autres un œdème plus ou moins étendu, mais promptement dissipé. »

Dans les diphthéries qui guérissent, on trouve donc des bacilles très virulents, des bacilles de virulence moyenne et des bacilles sans virulence pour le cobaye. « Quoiqu'il ne s'agisse pas là d'une règle générale, les diphthéries les plus anodines donnent les bacilles les moins actifs, et de toutes façon l'expérience est d'accord avec la clinique, puisqu'elle montre une différence saisissante entre l'inoculation des bacilles extraits de cas mortels et des bacilles extraits de cas qui guérissent : « le virus le moins actif se rencontre surtout dans les cas les moins graves. »

Ajoutons, en terminant ce paragraphe, que, dans les diphthéries sévères, qui ont une terminaison favorable, on trouve une atténuation de virulence des bacilles. Les colonies des premiers jours sont toutes virulentes, « mais à mesure que le temps s'écoule, on a des colonies qui sont les unes très actives, les autres moins; il y en a même qui ne causent aucun mal aux cobayes. Ces colonies non virulentes, finissent même par dominer et bientôt on ne trouve plus qu'elles.

VI. — Associations microbiennes dans la diphthérie.
Les pseudo-diphthéries.

Tous les auteurs qui ont étudié la diphthérie ont, depuis Klebs, signalé la présence de nombreux microbes associés au bacille de Klebs. Quelquefois le bacille de Klebs est presque à l'état de pureté; plus ordinairement il est mélangé à d'autres organismes.

Tantôt ces organismes ne jouent manifestement qu'un rôle banal, — et c'est ainsi qu'on voit dans les diphthéries sévères le nombre de microbes étrangers, purs saprophytes, augmenter si la maladie marche vers la guérison, quand la fausse membrane se désorganise — tantôt ces organismes paraissent jouer un rôle des plus actifs, et leur présence imprime à l'affection un cachet tout particulier : tel est le streptocoque pyogène, le mieux étudié des microorganismes associés au bacille de Klebs.

Sur soixante-neuf cas d'angine diphthéritique vraie, M. Martin trouve cinquante-deux fois le bacille de Klebs presque seul. Les microorganismes étrangers étaient tellement rares que la diphthérie pouvait être dite pure; — dix-sept fois il trouve des associations microbiennes et dix fois l'association est celle du streptocoque pyogène (1).

Nous verrons ci-dessous que le streptocoque est capable de produire seul dans la gorge des fausses membranes, de créer une pseudo-diphthérie qui est

(1) « Les angines où la diphthérie s'associe aux streptocoques donnent en culture sur le sérum deux sortes de colonies bien distinctes :

» Des colonies volumineuses déjà après vingt-quatre heures, ordinairement isolées : ce sont des colonies de diphthérie. Entre ces colonies, si l'on regarde attentivement, on voit, après vingt-quatre heures, un semis très serré de colonies plus petites, transparentes : ce sont les colonies de streptocoques. » (L. Martin, *Annales Pasteur*, 1893.)