

volontiers, ont, depuis quelques années, tendance à remplacer les lumineuses clartés, les unanimes affirmations et les innombrables acquisitions de la première heure; ils veulent, de tout cela, tirer argument pour nier les conquêtes pastoriennes et prématurément rejeter dans les oubliettes des théories surannées et des doctrines fallacieuses tout un faisceau de faits génialement découverts et patiemment accumulés; ils n'y réussiront point parce que, si l'on peut fournir d'un *fait* indéniable, palpable en quelque sorte et matériellement subsistant, une explication autre que celle déjà donnée, une interprétation différente de celles auparavant produites, pouvant même parfois leur être diamétralement opposée, s'il est loisible à l'homme de modifier, en justifiant sa nouvelle manière de voir, une *opinion* quelconque qu'un *fait* lui avait antérieurement suggérée, il ne peut être en son pouvoir de supprimer ou même de changer dans son essence le *fait* lui-même; celui-ci persiste et persistera envers et malgré tout, il échappe d'absolue façon à la volonté humaine et nul ne peut faire qu'il ne soit pas.

Aussi, malgré le temps d'arrêt et de tâtonnements que subit depuis quelques années la Science microbique, nonobstant les difficultés que nous sommes les premiers à enregistrer et que nous considérons même comme indispensables à la connaissance future de la vérité, des *faits*, tels que ceux consignés dans ces pages, sont comme des moellons indestructibles et tenaces qui attendent inconsciemment, insensibles aux successifs remaniements dont ils sont l'objet, que l'heure vienne où, l'œuvre de l'architecte étant parachevée enfin, les ouvriers de l'avenir les scellent méthodiquement et sans crainte d'erreur là où leur place à chacun aura à l'avance été définitivement marquée. Ce sont bien cependant les mêmes blocs qui, hier encore, étaient amoncelés sans ordre et disposés au hasard et qu'aujourd'hui voici artistement groupés, constituant par leur ensemble un colossal et superbe édifice!

Ainsi en adviendra des *matériaux* acquis par la Microbie; ils sont aujourd'hui, plus que jamais peut-être depuis l'origine de cette science, nous ne saurions le cacher, épars çà et là, groupés à l'aventure, à peine rapprochés suivant leurs connexions naturelles, mais ils *sont*, ils témoignent, par leur chaos même, de leur indubitable existence; déjà même certains parmi eux ont servi à l'édification de doctrines dont le bien fondé et l'importance n'échappent qu'à ceux qui ne veulent point ouvrir les yeux. Ayons donc la patience d'attendre quelque peu, éloignons de notre esprit le découragement qui naît d'un trop grand scepticisme, et peut-être verrons-nous bientôt luire ce jour où l'*Histoire naturelle des Bactéries pathogènes* justifiera vraiment son titre et fournira au biologiste comme au médecin les notions précises, indiscutables, vraiment scientifiques, qu'elle leur ménage si parcimonieusement à l'heure actuelle!

## SUR LES PARASITES DES TUMEURS ÉPITHÉLIALES MALIGNES

Par M. ARMAND RUFFER

*Directeur du British Institute of preventive medicine à Londres.*

L'idée que le cancer est une maladie infectieuse n'est point neuve. Plusieurs auteurs du commencement de ce siècle et des siècles précédents en étaient convaincus et avaient essayé, mais en vain, d'appuyer leur manière de voir par l'expérimentation. Des observations non contrôlées par l'examen microscopique ont bien peu de valeur, et l'on ne saurait assez s'en méfier. Waldeyer, Thiersch et leurs élèves, en précisant anatomiquement le domaine du cancer, ont rendu un grand service. Mais on doit se rappeler que décrire une lésion n'est pas l'expliquer, et que c'est un tort de vouloir se contenter de considérations anatomiques. La prolifération plus rapide de l'épithélium chez les cancéreux n'est qu'un effet; ce n'est pas la cause de la maladie.

De même on n'avance en rien la question de l'origine du cancer en prétendant que l'épithélium prolifère, parce que le tissu connectif perd de son pouvoir de résistance. Bien loin d'en être ainsi, il serait plus vrai de dire que les tissus dérivés du mésoderme prolifèrent plus rapidement chez le cancéreux; mais, en tout cas, il faudrait d'abord nous expliquer pourquoi le tissu connectif perd son pouvoir de résistance.

Par contre, il nous semble que si les tumeurs épithéliales contiennent des parasites, et si ces parasites sont la cause de ces tumeurs, on peut facilement expliquer les faits cliniques et les lésions pathologiques du cancer.

En 1889, Thoma vit dans le noyau et dans le protoplasme de cellules cancéreuses des corps ressemblant à des coccidies, et possédant un noyau bien marqué. Ces corps pouvaient être facilement reconnus en colorant le tissu par l'hématoxyline et l'éosine. La même année, Malassez et Albarran crurent pouvoir affirmer la présence de coccidies dans une tumeur épithéliomateuse du maxillaire; je reviendrai plus tard sur ce travail. Darier, peu de temps après, dit avoir vu des coccidies dans l'épithélium dégénéré de la maladie de Paget; les différents stades de leur évolution correspondaient assez exactement aux stades de l'évolution des coccidies en général. Ces corps paraissaient formés par un amas protoplasmique avec ou

sans noyau, mais il était très difficile d'établir un diagnostic entre ces parasites et les cellules épithéliales. La cellule s'entourait d'une membrane à double contour dans laquelle on voyait plusieurs petits corps formés par segmentation, le tout ressemblant à un kyste contenant des spores. Wickham confirme les observations de Darier et, l'année suivante, Nilssjörbring décrit un parasite se trouvant dans les cellules cancéreuses. Autant que nous avons pu juger par la description donnée par Nilssjörbring et les dessins illustrant son mémoire, il nous semble que cet auteur n'a pu distinguer entre les produits vraiment parasitaires et les produits de la dégénérescence épithéliale. J. Siegenbeck, von Henkelom, trouvèrent dans plus de deux cents carcinomes de petits corps ronds, dont ils ne déterminent pas du reste la nature. Hauser, dans la même année, dit qu'il n'avait pu constater la présence de parasites dans les tumeurs cancéreuses. En 1890, William Russel, d'Édimbourg, crut avoir démontré le micro-organisme caractéristique du cancer, qu'il désigna sous le nom de « corps à fuchsine ». A l'aide d'un mode de préparation spéciale, il démontra la présence de ces corps dans le cancer, mais malheureusement Shattock et Ballance, Klein et d'autres montrèrent que ces corps à fuchsine se rencontraient aussi dans beaucoup de maladies aiguës et chroniques, telles que la diphtérie et la tuberculose, maladies qui n'avaient aucun rapport avec le cancer. Soudakewitch, en 1892, publia un mémoire où il décrivit avec soin les parasites du cancer; ses observations, très importantes, ont été contrôlées par M. Metchnikoff. La même année, M. Walker et moi, nous trouvâmes les mêmes parasites dans les tumeurs cancéreuses. M. Sautchenko fit la même observation et décrivit des parasites ressemblant en tout à ceux décrits par nous, et différant de toutes façons de ceux qu'il avait décrits auparavant avec M. Podwizowski; ces derniers ne sont, suivant moi, que des formes de dégénérescence épithéliale, qu'on rencontre souvent dans l'épithéliome. Par contre, des observateurs tels que Maurice Cazin, Strøbe, Schutz, Ribbert, Fabre-Domergue, Thin, Sheridan, Délépine, Boyce, Steinhaus, Welch, Næggerath, Cornil, Fraenkel et autres, ont nié la présence des coccidies dans le cancer, tandis que Neveu en France et Cattle en Angleterre se sont rangés à notre opinion. L'unanimité, on le voit, est loin d'être faite.

Nous commencerons l'étude du parasite du cancer par l'examen de préparations fraîches. C'est là un sujet neuf, pour ainsi dire, mais j'en ai dit quelques mots au Congrès de médecine internationale de Rome (avril 1894). Exprimons avec soin et sans user trop de force un cancer riche en cellules épithéliales (le cancer d'une jeune femme, par exemple), et examinons avec un fort grossissement et à l'aide du condensateur Abbé. A l'intérieur de certaines cellules épithéliales et le plus souvent dans leur protoplasme, on aperçoit des espaces ronds qui ressemblent, à première vue, à des vacuoles. Ces espaces sont entourés d'une membrane à double contour et contiennent dans leur intérieur un corps difficile à voir avec l'éclairage du condensateur.

Enlevons le condensateur du microscope et en même temps faisons arriver la lumière un peu obliquement. On s'aperçoit alors que le corps contenu dans cette vacuole est un corps *sui generis* qui ne ressemble en aucune façon aux cellules endogènes ou invaginées, ni même aux leucocytes ou aux cellules dégénérées d'alentour. Ces corps ont un aspect tout à fait caractéristique et contiennent invariablement un petit noyau quelquefois granuleux, quelquefois marqué au centre d'une tache claire. Ce noyau est entouré par une couche de protoplasme homogène remplissant plus ou moins la vacuole décrite plus haut. Ces parasites, presque toujours immobiles, sont quelquefois sujets à des mouvements d'oscillation très lents. On peut les observer ainsi plusieurs heures ou plusieurs jours de suite.

Ces observations sont longues, fatigantes, assez difficiles et délicates, mais on peut se convaincre de la présence de ces parasites beaucoup plus vite et plus facilement en colorant les préparations fraîches. Pour arriver à de bons résultats, il faut toutefois renoncer à tous les procédés usuels de coloration des bactéries. En effet, les parasites du cancer ne se colorent pas par les couleurs basiques d'aniline, mais bien par les couleurs acides. Nous dirons donc avec Ehrlich qu'ils sont oxyphiles et non basophiles. De plus, les parasites sont des organismes délicats ne résistant ni à la chaleur, ni même à la dessiccation. Pour faire une bonne préparation, on enlève avec un scalpel bien propre un peu de suc cancéreux qu'on place sur une lamelle. On mélange ensuite avec une goutte de la matière colorante en ayant soin que le mélange soit bien intime; on recouvre avec une lamelle propre et on lute avec de la vaseline ou de la paraffine. Ces préparations ne se gardent naturellement pas longtemps, mais sont pourtant de bons sujets d'étude pendant quarante-huit heures ou même plus.

M. Plimmer et moi nous sommes servis surtout d'une solution de bleu de méthylène, à laquelle on avait ajouté quelques gouttes de vert de méthylène. On ajoute quelques gouttes d'acide acétique, jusqu'à ce que la solution soit très faiblement acide. On s'étonnera peut-être que nous nous servions d'une matière colorante qui est la couleur par excellence pour les bactéries. Remarquons toutefois que le bleu de méthylène du commerce est un mélange mécanique de couleurs basiques et d'une couleur acide. Cette dernière se fixe spécialement sur les parasites du cancer, et son action est rendue plus intense par l'addition d'acide acétique.

Le noyau de la cellule épithéliale est coloré en vert, le protoplasme en bleu très pâle. Le noyau du parasite au contraire est rose et son protoplasme bleu pâle.

Le parasite se colore par plusieurs couleurs d'aniline acides. Celles qui donnent les meilleurs résultats sont le bleu de méthylène, l'éosine glycérrinée et le bleu d'aniline en solutions très faiblement acides.

Passons maintenant à l'étude des parasites dans les préparations fixées et coupées au microtome.

Dans toutes les études cytologiques, il faut se servir d'une méthode de fixation et de durcissement qui ne produise pas d'altération dans les cellules et dans leur contenu. Or les méthodes dont se sont servis beaucoup de savants qui se sont occupés de cette question sont fautive. L'alcool même à 50 degrés produit un rétrécissement du noyau, mais surtout du protoplasme cellulaire. Le liquide de Müller ne fixe pas instantanément les cellules, et alors se produisent des déformations qui nous donnent des cellules anormales. Il faut donc se servir d'un réactif qui tue les cellules instantanément sans produire de déformation. L'acide osmique à 1 pour 100, le liquide de Fleming, de Fol, de Foà, sont utiles à ce point de vue. Mais malheureusement l'acide osmique, l'acide chromique et les chromates qui contiennent ces liquides, rendent difficile et même souvent impossible l'action des couleurs d'aniline acides, qui, comme nous verrons, colorent seules les parasites dans les coupes comme dans les préparations fraîches.

La méthode qui nous a donné les meilleurs résultats est la suivante : on sature de l'eau distillée bouillante avec du sublimé corrosif en cristaux, on laisse refroidir et cristalliser le sublimé et l'on se sert comme fixatif de la liqueur surnageante conservée dans un endroit obscur. Aussitôt la tumeur enlevée, on jette des morceaux de 4 ou 5 millimètres carrés dans cette solution saturée de sublimé; après un séjour de douze à vingt-quatre heures, on lave à l'eau courante pendant vingt-quatre heures, et l'on durcit d'après la méthode usuelle dans les alcools de plus en plus concentrés. Une fois la pièce durcie, on la fait passer dans le chloroforme ou le xylol, puis dans la paraffine, et l'on fait des coupes aussi fines que possible avec le microtome.

La coupe une fois collée sur la lamelle d'après une des méthodes usuelles, on enlève la paraffine par la benzine, on fait passer par l'alcool, par l'eau, par l'iode en solution dans l'iodure de potassium. L'iode, en effet, enlève l'excès de sublimé, qui, malgré ces lavages consécutifs, pourrait encore se trouver dans la coupe. La teinture d'iode s'enlève facilement par l'alcool, et l'on peut alors colorer la coupe par une des méthodes appropriées.

Il est nécessaire que le noyau, le protoplasme et leur contenu soient colorés. Un des réactifs, et des plus simples, est celui de Biondi-Ehrlich, qui consiste en un mélange de vert de méthylène, de fuchsine acide et d'orange aniline. Les noyaux se colorent en vert, le nucléole en rouge intense, le protoplasme et le tissu conjonctif en rouge. Le noyau du parasite se colore en rouge et son protoplasme reste presque incolore. Pourtant, dans quelques cas de cancer, il prend une teinte assez intense.

Partant du même principe, nous avons cherché d'autres procédés de coloration donnant d'aussi bons résultats. Cela est facile, car on n'a qu'à combiner une couleur basique avec une couleur acide; la première se fixant sur le noyau et l'autre sur le nucléole, le protoplasme de la cellule et son contenu. La méthode suivante nous a donné les meilleurs résultats.

La coupe est plongée pendant une à deux minutes dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 5 pour 1000; on lave légèrement à l'eau et l'on place la coupe dans une solution de sulfate de cuivre concentrée. La coupe devient noire et on la fait passer à l'acide chlorhydrique à 1 pour 1000, où elle prend une teinte jaune pâle. Une immersion de quelques secondes dans la solution de sulfate de cuivre lui rend la teinte bleue voulue, et on la lave alors pendant quelques minutes dans l'eau. Toutes ces manipulations, qui paraissent assez longues et compliquées, ne prennent pas cinq minutes. On fait alors agir une solution d'une couleur acide, celle qui nous a donné les meilleurs résultats étant une solution de cochenille concentrée. De cette façon on a de belles préparations qui montrent le noyau de la cellule en bleu, le protoplasme bleu rougeâtre et les parasites en rouge. Dans les coupes ainsi colorées, les parasites ressemblent exactement à ceux trouvés dans les préparations fraîches. Ils se composent d'une capsule qui se détache toujours franchement sur le fond de la cellule cancéreuse. Le noyau se colore toujours par les couleurs d'aniline acides, jamais par les couleurs basiques qui colorent le noyau de la cellule. Le noyau du parasite est ordinairement très petit, et est entouré de protoplasme clair, se colorant difficilement. Il envoie quelquefois de fins prolongements vers la périphérie, mais d'autre part le protoplasme des parasites présente souvent des stries assez épaisses, qui s'étendent de la périphérie vers le noyau, sans du reste jamais toucher ce dernier. On voit quelquefois à la périphérie du parasite des grains assez gros, placés d'une façon régulière et qui ressemblent tout spécialement aux grains qui ont été décrits dans les coccidies habitant le foie du lapin.

Il est difficile de se faire une idée du mode de reproduction de ces parasites, et nous avons cherché vainement les spores, qui nous semblaient devoir s'y trouver. Mais il existe d'autres figures qui montrent que ces parasites se reproduisent par simple division ou scissiparité. Le noyau se divise alors en deux ou plusieurs parties égales qui se placent à la périphérie, pendant que la capsule se divise et envoie des prolongements dans l'intérieur du parasite. Peu à peu la division du noyau se complète, les prolongements de la capsule se rejoignent dans le centre, et de cette façon se forment 2, 4, 6, 8, 16 ou 32 jeunes parasites. Nous n'avons jamais vu la formation de spores, à moins qu'on ne veuille donner ce nom aux jeunes parasites formés de la manière que nous venons de décrire. Nous nous rangeons donc à l'opinion de M. Metchnikoff, qui veut que les spores décrits par Podwissorzky, Sawtschenko, Soudakewitch ne soient que des produits de la dégénérescence des cellules épithéliales.

Étudions maintenant en quoi consistent les différences histologiques et autres, qui existent entre ces parasites et les autres corps inclus dans le protoplasme de la cellule cancéreuse.

On sait, depuis les travaux d'Arnold, que les noyaux de certaines cellules