

rescente n'est pas soluble, puisque le liquide de culture filtré sur porcelaine devient obscur¹.

LEPIERRE (1895) a obtenu des cultures phosphorescentes avec un microbe trouvé dans l'eau. Il fallait certains milieux pour observer le phénomène; la teneur en phosphates n'influa pas.

9° Odeur. — L'odeur des cultures est parfois très particulière, mais ne pourra jamais qu'être un moyen très secondaire de diagnose. Celle que dégagent les cultures du *Bacille de Nicolaïer* est très pénétrante et fécaloïde; il suffit de déboucher un tube de culture, même filtrée, de ce bacille pour empestier le laboratoire. L'odeur des cultures de *B. pyocyanique* est légèrement fécaloïde, et se retrouve dans les pansements des abcès à pus bleu. A partir du quatrième jour, les cultures de *Vibrio cholérique*, en solution de peptone, ont une odeur spéciale (urine de souris) qui correspond au moment où les cultures deviennent alcalines et dégagent de l'ammoniaque et autres produits de décomposition des peptones.

10° Production de gaz. — Plusieurs microbes, et spécialement des anaérobies, agissent comme ferments² et engendrent des gaz qu'on a relativement peu étudiés. La *gangrène gazeuse* a tiré son nom des gaz produits dans les tissus par le *Vibrio septique*. D'autres affections gazeuses ne sont pas mortelles et sont dues à d'autres microbes; ARLOING a étudié un de ces microbes³. Le bœuf présente des tumeurs crépitanes curables qui ne sont certainement pas dues au charbon symptomatique.

¹ Lire : DUBOIS, *Lalumière physiologique*, Revue générale des sciences, 31 juillet 1894.

² La découverte de la nature animée des ferments (PASTEUR), c'est-à-dire des propriétés fermentatives des microbes, a été l'origine de celle des microbes pathogènes. L'étude des microbes considérés comme ferments, bien que de la plus haute importance, ne peut trouver sa place ici. On se reportera au *Traité de chimie physiologique* de HUGOUNENQ (même bibliothèque) pour tous les renseignements sur cette question.

³ ARLOING, *Leçons sur la tuberculose et les septicémies*, recueillies par J. COURMONT, 1892, p. 485.

ARLOING a étudié l'action zymotique du *Vibrio septique* et du *B. Chauvæi* sur la peptone, l'albumine et le jaune d'œuf; il y avait principalement production d'azote, d'hydrogène et d'acide carbonique.

Les gaz produits dans les cultures anaérobies peuvent être quelquefois si abondants qu'ils font sauter le bouchon. On les voit nettement creuser des cavités dans la gélatine (fig. 158). Ce sont eux qui causent l'odeur de certaines cultures. Pour analyser les gaz on peut (fig. 165) cultiver le microbe dans un tube à essai (B) rempli de mercure et renversé sur un verre à pied (A) également plein de mercure; après passage à l'autoclave, on introduit du bouillon ensemencé, sans bulle d'air, dans le tube à essai et on met le tout à l'étuve. Les gaz (b') se voient bientôt au-dessus de la culture (b). On les analyse d'après les méthodes ordinaires. On peut aussi cultiver l'anaérobie dans le vide et casser le tube de verre sous une cloche à mercure.

Pour avoir des gaz en grande quantité, et pour pouvoir les analyser de jour en jour et même d'heure en heure (car leur composition change à mesure que la fermentation avance), au lieu d'opérer sur un mélange de plusieurs jours, on doit se servir d'un dispositif rappelant celui employé par PASTEUR pour l'étude des fermentations (fig. 166).

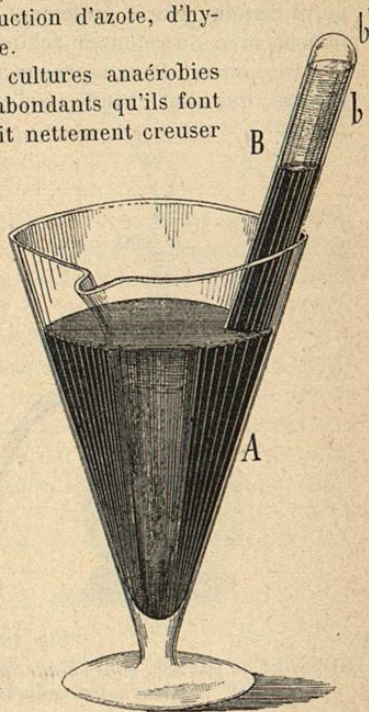


Fig. 165.

Dispositif simple pour recueillir les gaz produits par les microbes dans leurs milieux de culture.

Un grand ballon à deux tubulures (A) est rempli aux deux tiers de liquide nutritif; la tubulure recourbée plonge dans un autre ballon rempli également du même liquide nutritif et bouché avec du coton; le robinet (a) de la seconde tubulure est laissé ouvert. Deux fournaux à gaz sont placés sous les deux ballons, qui sont chauffés à l'ébullition pendant une demi-

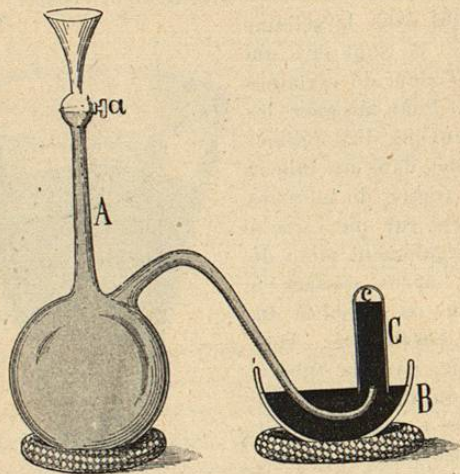


Fig. 166.

Dispositif de PASTEUR pour l'étude des gaz produits par les microbes dans leurs milieux de culture.

heure. Ils sont ainsi stérilisés et purgés d'air. On éteint alors le fourneau du ballon (A) qui se refroidit et on ferme le robinet (a). La vapeur d'eau se condense en (A); le vide se fait; le liquide du second ballon se précipite et remplit complètement le ballon (A) et ses deux tubulures. On remplace ensuite le second ballon par une capsule en porcelaine (B) remplie de mercure et stérilisée. Onensemence en mettant quelques centimètres cubes de culture dans l'entonnoir de la tubulure droite, au préalable rempli d'acide carbonique pour éviter les

entrées d'air; on ouvre le robinet (a) et la semence va se mélanger au liquide nutritif; on referme le robinet. Le tout est mis à l'étuve à + 37°. Pour recueillir les gaz (c) on place une éprouvette (C) remplie de mercure au-dessus du tube recourbé, et fait ensuite l'analyse par les moyens ordinaires. Certains microbes fabriquent plusieurs litres de gaz par jour.

Les produits volatils des cultures peuvent avoir une action physiologique spéciale (CHARRIN et GLEY) (Voy. p. 740).

11° Réactions spéciales. — On peut se servir de réactions chimiques très simples pour compléter le diagnostic d'une culture. Malgré les espérances basées sur ces procédés (réaction de l'indol, rouge choléra), on ne devra jamais s'en servir comme base unique de différenciation d'une espèce.

La réaction la plus communément recherchée est l'acidité ou l'alcalinité de la culture au moyen de papier tournesol sur lequel on laisse tomber une goutte de culture puisée avec une pipette. Certains microbes ont des alternatives d'acidité et d'alcalinité de la même culture. Une culture de *B. de Löffler* en bouillon devient acide vers le douzième jour et redevient ensuite alcaline. Le *Pneumocoque* engendre de l'acide formique; etc.

Cette réaction sera importante comme recherche de la production d'un acide, témoin de la fermentation d'un milieu spécial. C'est ainsi que le *Colibacille* donne une réaction acide si on le cultive en milieu lactosé (p. 673), par fermentation de la lactose. L'acide produit serait de l'acide lactique, tantôt droit (*Colibacille* du nourrisson), tantôt gauche (*Colibacille* de l'enfant dès qu'il a mangé) (PÉRÉ). Pour GRIMBERT, l'acidité est plutôt due à l'acide succinique.

La constatation de l'alcalinité du milieu de culture indiquera parfois le moment où un microbe va diminuer en virulence (exemple: les cultures de *Vibrien cholérique*, en solution peptonée, qui deviennent alcalines vers le quatrième jour). Le *Pneumocoque* périt, dans ses cultures, lorsque le milieu devient acide: on peut prolonger sa vitalité en neutralisant par addition de carbonate de chaux.

La présence de l'indol est recherchée de la façon suivante : On ajoute au bouillon de culture une solution de nitrate de potasse (2 centigrammes pour 100 grammes d'eau) dans la proportion de 40 de bouillon pour 1 de solution ; puis, on traite par quelques gouttes d'acide sulfurique pur. S'il y a de l'indol, le liquide se colore en rose ou rouge foncé.

Ajoutons de suite que tel microbe peut perdre la propriété de présenter la réaction de l'indol ; c'est ce qu'on a vu pour le *Colibacille* ; faudrait-il donc le qualifier de typhique toutes les fois qu'il ne donne pas la réaction ? Nous dirons pour la réaction de l'indol ce que nous avons dit pour la plupart des caractères des microbes : caractère important, surtout lorsqu'il existe, mais nullement pathognomonique, et dont l'absence n'a pas grande signification.

Voici, d'après KITASATO (1889), un tableau des cultures étudiées à ce point de vue :

MICROBES PRÉSENTANT
LA RÉACTION DE L'INDOL.

Vibron cholérique.
B. du choléra des poules.
B. de la septicémie du lapin.
B. tétanique.
B. du choléra des porcs.
B. du charbon symptomatique
Vibron septique.
Spirille de Finckler.
B. lactique.
B. coli, etc.

MICROBES NE PRÉSENTANT PAS
LA RÉACTION DE L'INDOL.

B. de la septicémie de la souris.
B. du rouget du porc.
B. de la peste porcine.
B. anthracis.
B. de Friedlander.
B. de la diphtérie.
Pneumocoque de Frænkel.
M. tetragenus.
Streptocoque pyogène.
B. typhique.
B. pyocyaneus.
Staphylocoque pyogène.
B. butyrique.
B. phosphorescent, etc.

La réaction du rouge choléra, découverte par PÖELH, en 1886, et simultanément, en 1887, par BUJWID et par DUNHAM, a eu des fortunes diverses. Si on ajoute 5 à 10 p. 100 d'un acide minéral (sulfurique, chlorhydrique) à une culture pure de *Vibron cholérique*, on voit celle-ci tourner au rose violet en quelques minutes. La réaction se fait, grâce à la production antérieure

dans la culture d'indol et d'acide azoteux. ALI-COHEN démontra bientôt que tous les microbes engendrant de l'indol donnent la réaction du choléra, parce que la plupart des acides minéraux sont impurs et contiennent de l'acide azoteux. DUNHAM, KOCH montrèrent alors que la réaction du rouge choléra a une réelle valeur, mais à condition : 1° de n'opérer que sur des cultures en solution de peptone (l'addition d'un peu de nitrate de potasse favorise) et non en bouillon même peptoné ; 2° de se servir d'acide sulfurique absolument pur, privé d'acide azoteux. En d'autres termes, le *Vibron cholérique* serait le seul à fabriquer simultanément dans une solution de peptone de l'indol et de l'acide azoteux. D'autres vibrions (*V. de Finkler-Prior*, *V. Metchnikowi*) présentent cette réaction. Certains *V. cholériques* ne la présentent pas. BRIEGER a étudié la matière colorante du *Choléra-Roth*, qu'il a pu reprendre par l'éther.

On verra, à propos de chaque microbe (*Deuxième Partie*) les réactions biologiques et biochimiques qu'il présente (*fermentation des sucres, modification des nitrates, etc.*).

12° Action particulière sur certains milieux de culture ; aspect des colonies sur milieux spéciaux. — Pour faire la diagnose d'une espèce microbienne, il faut, autant que possible, essayer de la cultiver sur des milieux spéciaux qui lui conviennent particulièrement, ou sont modifiés par elle d'une façon caractéristique, ou enfin lui donnent un aspect tout spécial.

Nous ne pouvons revenir ici sur tous les milieux spéciaux que nous avons décrits au chapitre III. On trouvera à la *Deuxième Partie* la façon d'employer les plus utiles d'entre eux pour le diagnostic des maladies infectieuses.

Nous insisterons seulement sur quelques modifications importantes de milieux courants, opérées sous l'influence de certains microbes, et pouvant servir à les distinguer.

La *liquéfaction de la gélatine* par diverses cultures est un caractère précieux à noter. Il est assez fixe, sans cependant être absolument constant pour une même espèce. Tel microbe liquéfiant peut perdre cette propriété, au moins tem-

porairement. J'ai conservé pendant longtemps un tube d'Es-march fourmillant de colonies du *B. pyocyannique* qui n'avaient pas liquéfié la gélatine. Cela se comprend d'ailleurs très bien. Cette liquéfaction est une véritable digestion à l'aide des diastases secrétées par les microbes; ceux-ci peuvent à un moment donné cesser de fabriquer ces ferments solubles.

Parmi les microbes qui liquéfient la gélatine, certaines diffé-



Fig. 167.

Culture de *Staphylocoque pyogène* en tube de gélatine, âgée de huit jours.

1, colonie liquéfiante. — 2, gélatine liquéfiée et trouble. — 3, gélatine claire non liquéfiée.



Fig. 168.

Culture de *Bacillus anthracis* en tube de gélatine, âgée de huit jours.

1, capuchon de caoutchouc. — 2, tampon de coton. — 3, colonie liquéfiante. — 4, gélatine non liquéfiée.

rences sont à noter (fig. 156). Les uns liquéfient très rapidement, d'autres lentement, progressivement, formant une cupule dans la gélatine et n'arrivant que très tardivement à la liquéfaction complète. Si vous ensemencez une goutte de *Staphylocoque pyogène* sur un tube de gélatine, vous voyez la liquéfaction se faire lentement et progressivement; au bout de quinze jours ou trois semaines, le fond du tube est encore solide et transparent supportant la partie liquéfiée et trouble (fig. 156, 5 et 167). Le *Bacillus anthracis* liquéfie lentement en formant une cupule (fig. 168); ses cultures jeunes n'ont pas liquéfié (fig. 156, 4).

La simple culture sur gélatine est donc très précieuse puisqu'elle permet de distinguer : 1° les microbes qui ne poussent pas sur ce milieu (*Pneumocoque*, *B. tuberculeux*); 2° ceux qui y poussent en liquéfiant; 3° ceux qui y poussent sans liquéfier.

Voici quelques exemples de microbes qui poussent sur la gélatine :

MICROBES LIQUÉFIANTS :

Staphylocoque pyogène.
B. pyocyannique.
V. cholérique.
Bacillus anthracis.
Vibrien septique, etc.

MICROBES NE LIQUÉFIANT PAS :

B. coli.
B. d'Eberth.
Micrococcus tetragenus.
Bacille de Löffler, etc.

La figure 156 schématise quelques types de culture sur gélatine, les uns ne liquéfiant pas, d'autres liquéfiant.

La liquéfaction de la gélose ou du sérum gélifié est très rare. Le *Vibrien cholérique* liquéfie le sérum.

La coagulation du lait dans lequel on cultive un microbe est assez caractéristique. C'est ainsi que le *B. coli* coagule le lait tandis que le *B. typhique* le laisse liquide; le *B. coli* sécrète un ferment caséifiant, et le *B. typhique* n'en sécrète pas. Malheureusement, certains échantillons du *B. coli* ont perdu la faculté de caséifier le lait; ce moyen de diagnostic n'est donc pas infallible. La coagulation du lait indique, quand elle existe, qu'on ne se trouve pas en présence du *B. typhique*; lorsqu'elle ne s'opère pas, on n'a pas forcément affaire au *B. typhique*.

13° Sporulation. — On a un grand intérêt à savoir si un microbe se reproduit par spores. On est encore bien indécis sur l'existence des spores d'un grand nombre d'espèces. Nous verrons au chapitre suivant la façon de reconnaître les spores au microscope; rappelons simplement ici que les spores étant très résistantes à toutes les causes de destruction, on soupçonnera leur existence toutes les fois qu'une semence aura résisté à la dessiccation, à la lumière, à un chauffage à + 100°, etc.

14° Agglutinabilité. — L'agglutinabilité des cultures mi-

crobiennes par certains sérums, vue, en 1889, avec le *B. pyocyanique*, par CHARRIN et ROGER, a été bien mise en relief par PFEIFFER, en 1894, avec le *Bacille du choléra*. Les noms de GRUBER et DURHAM, de WIDAL (voy. p. 645) sont les plus importants à citer.

Depuis la découverte de la propriété agglutinante de certains sérums d'individus soit immunisés (sérum antidiphthérique et antityphique, etc.) soit simplement malades (typhiques, tuberculeux), sur les cultures du microbe causal, on a voulu faire inversement, de l'agglutinabilité de ce microbe, par un sérum connu, un moyen de diagnose. En principe, la méthode est excellente. Il faut, cependant, ne lui demander que ce qu'elle peut donner. Sous sa forme absolue (tout microbe agglutiné par le sérum α est le microbe α ; tout microbe non agglutiné par le sérum α n'est pas le microbe α), elle donnerait des résultats inexacts.

D'abord, la question de dose est très importante. L'agglutinabilité n'a de valeur que dans certaines limites qu'il ne faut pas dépasser. L'effet obtenu doit donc être comparé à la proportion du mélange de sérum et de culture. C'est ainsi, par exemple, que les sérums typhiques agglutinent légèrement certains *Colibacilles*; ceux-ci ne sont cependant pas pour cela des *Bacilles d'Eberth*; ils ne seront jamais agglutinés, comme ceux-ci, avec des doses infimes de 1/100, 1/500, 1/1000 ou même moins. Il y a donc une question de degré, hors de laquelle l'agglutinabilité perd son importance dans la diagnose de l'espèce microbienne.

En second lieu, tel microbe peut avoir perdu sa faculté agglutinative, de même qu'il peut la récupérer.

Prenons comme exemple le *B. d'Eberth*. Il n'est pas douteux que ses cultures sont d'autant plus agglutinables qu'elles sont plus anciennes dans un laboratoire (ROBER); la faculté agglutinative augmente avec le nombre des générations artificielles, jusqu'à un certain taux où elle reste fixe. Bien plus, certains *B. d'Eberth* récemment retirés des organismes des typhiques ou des eaux ne sont pas du tout agglutinables, tout en étant de véritables *B. d'Eberth*. On les constate agglutinables au bout de quelques

générations. BANCEL¹ a étudié à ce point de vue dix échantillons de *B. d'Eberth*. Sur sept bacilles que j'avais isolés du sang des typhiques, un seul était aussi agglutinable que les échantillons entretenus au laboratoire; les autres étaient agglutinés, par exemple, à 1/50 par un sérum agglutinant à 1/200 les bacilles témoins. A la dixième génération, tous les bacilles étaient normalement agglutinables. Trois bacilles, isolés de suppurations post-typhiques, ne se laissaient pas agglutiner, mais acquéraient cette propriété au bout de quelques mois d'entretien dans le laboratoire. CHANTEMESSE, EMERY, etc., ont noté ce défaut d'agglutinabilité des *B. d'Eberth* des eaux.

L'absence d'agglutinabilité ne doit donc pas modifier définitivement la diagnose d'une espèce microbienne.

Certains microbes ne paraissent pas propres à la recherche de l'agglutinabilité parce qu'ils ne végètent pas en cultures homogènes (ils sont naturellement agglutinés); on peut rendre les cultures homogènes par certains artifices. On verra que le *B. de Koch* végète en cultures homogènes si on les agite (ARLONG; p. 451); il en est de même du *B. de Löffler* (NICOLAS; p. 613). On a imaginé des appareils destinés à agiter continuellement les cultures.

15° Passage des microbes à travers les parois poreuses. —

Lorsqu'on filtre une culture ou de l'eau à travers une bougie en porcelaine (Chamberland ou autres) on arrête tous les microbes (voy. : *Filtration* p. 52). On savait, cependant, depuis longtemps, que cette propriété d'arrêter les microbes n'est pas absolue. Au bout de quelques jours, la bougie Chamberland, adaptée à un robinet d'eau sous pression, laisse passer les microbes en assez grande abondance. Ce qu'on ignorait, c'est l'extrême facilité avec laquelle certains microbes peuvent traverser les bougies. C'est là une donnée d'une importance considérable, très précieuse pour le bactériologiste.

a. D'abord, certains microbes sont *extrêmement petits*, de

¹ BANCEL, Journal de Physiologie et de Pathologie générale 1902, p. 519.

dimension bien plus minime que celle des microbes que nous sommes habitués à étudier (voy. p. 221). Soumis à une faible pression, ils traversent facilement et rapidement certaines bougies qui retiennent les microbes ordinaires. Cette découverte est due à MM. NOCARD et ROUX qui ont ainsi isolé le microbe de la *péri-pneumonie bovine*. Ce dernier très fin, à peine visible, peu colorable, traverse les bougies suffisamment poreuses lorsqu'on filtre de la sérosité pneumonique. Le liquide qui a passé est virulent.

Ce fait capital a suscité un grand nombre d'expériences dans le même sens. LÖFFLER pense avoir ainsi fait passer par les bougies le microbe inconnu de la *fièvre aphteuse*. BORREL estime que le *virus claveléux*, ainsi filtré, est encore virulent. M. NICOLLE a fait également traverser les filtres au virus de la *peste bovine*, etc. La voie ainsi ouverte sera fertile en applications.

Le passage des petits microbes à travers les filtres exige, pour réussir, certaines conditions assez minutieuses.

Les bougies ne sont pas toutes également perméables. Les bougies Chamberland de B à F sont de plus en plus poreuses. On s'adressera donc aux bougies F. BORREL a même fait fabriquer des bougies F, à F₁₀ de plus en plus poreuses. Les bougies Berkefeld sont (ou étaient) encore plus poreuses. Plus la bougie est mince, plus la chance de filtration est augmentée.

Il ne faut pas trop diluer le liquide à filtrer, car un grand nombre de microbes sont fatalement retenus et le liquide filtré pourrait être jugé, faussement, comme stérile.

Seuls les microbes parfaitement libres peuvent traverser les cloisons poreuses. S'ils sont intraleucocytaires ils sont retenus.

Si le liquide qu'on veut filtrer est une sérosité non diluée, la viscosité du liquide peut entraver le passage. C'est là l'écueil contraire à celui de la dilution.

Il vaut mieux agir par pression que par aspiration.

On voit quels soins doivent être apportés à ces expériences, pour les réussir. Des résultats négatifs ne prouvent rien, tant qu'ils ne sont pas multipliés, en éliminant les causes d'erreur.

b. Les microbes de dimensions ordinaires, le plus souvent très

mobiles, peuvent traverser très rapidement les bougies filtrantes si celles-ci sont plongées dans un liquide nutritif et placées à l'étuve. C'est en somme, en végétant, et non plus par pression, que ces microbes traversent la paroi poreuse. C'est CAMBIER qui, en 1904, a attiré l'attention sur cette curieuse propriété. Il avait cru trouver là un moyen de séparer le *B. d'Eberth*. des autres microbes des eaux (voy. p. 417). Il n'en est rien, mais le procédé est intéressant.

On le trouve décrit, page 168, avec les expériences de LESIEUR, de CARNOT et FOURNIER et les dispositifs recommandés par ces auteurs.