

**Contribution a l'étude des propriétés morphologiques et biologiques du  
vibron cholérique / par Cesare Zonchello.**

**Contributors**

Zonchello, Cesare.

London School of Hygiene and Tropical Medicine

**Publication/Creation**

Constantinople : Frañuaise L. Mourkidues, 1909.

**Persistent URL**

<https://wellcomecollection.org/works/a66jp4c7>

**Provider**

London School of Hygiene and Tropical Medicine

**License and attribution**

This material has been provided by This material has been provided by London School of Hygiene & Tropical Medicine Library & Archives Service. The original may be consulted at London School of Hygiene & Tropical Medicine Library & Archives Service. where the originals may be consulted. Conditions of use: it is possible this item is protected by copyright and/or related rights. You are free to use this item in any way that is permitted by the copyright and related rights legislation that applies to your use. For other uses you need to obtain permission from the rights-holder(s).



Wellcome Collection  
183 Euston Road  
London NW1 2BE UK  
T +44 (0)20 7611 8722  
E [library@wellcomecollection.org](mailto:library@wellcomecollection.org)  
<https://wellcomecollection.org>

P. 1499  
ADMINISTRATION SANITAIRE DE L'EMPIRE OTTOMAN 22

LONDON SCHOOL OF TROPICAL MEDICINE  
NOT TO BE TAKEN AWAY

3399

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

JAN 31 1910

DES

PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES

DU VIBRION CHOLÉRIQUE

PAR

LE D<sup>R</sup> CESARE ZONCHELLO

C O  
3454  
REC<sup>D</sup>  
REG<sup>D</sup> 3 FEB

MÉDECIN DU LAZARET D'ABOU-SAAD

(MER ROUGE)

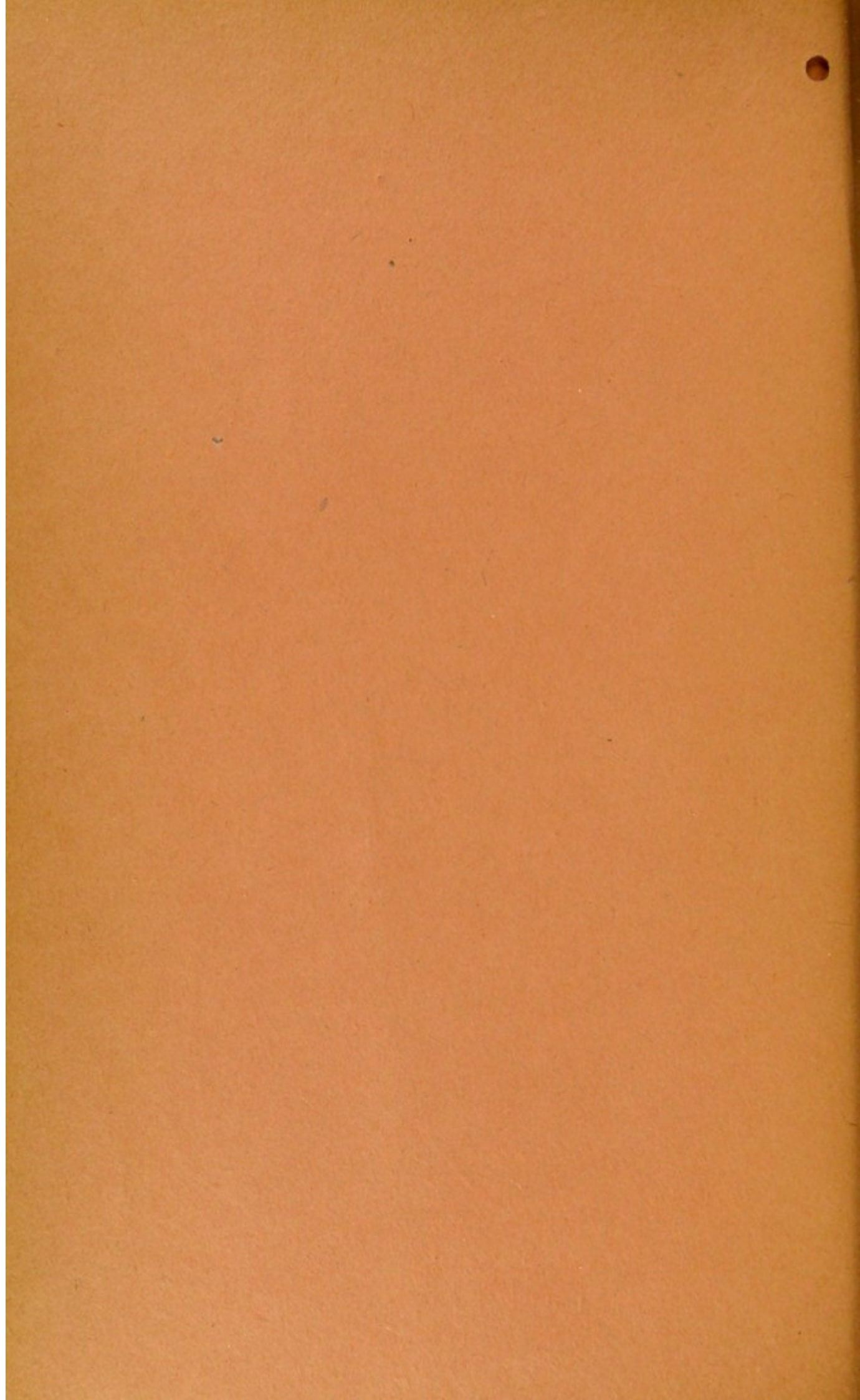


CONSTANTINOPLE

Moderne Imp. Française L. Mourkidès, Rue Lulédji Hendek, N° 3-5

1909





ADMINISTRATION SANITAIRE DE L'EMPIRE OTTOMAN

---

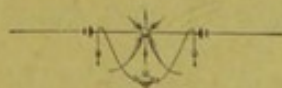
CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DES PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES  
DU VIBRION CHOLÉRIQUE

PAR

LE D<sup>R</sup> CESARE ZONCHELLO

MÉDECIN DU LAZARET D'ABOU-SAAD

(MER ROUGE)



CONSTANTINOPLE

Moderne Imp. Française L. Mourkidès, Rue Lulédji Hendek, N° 3-5

—

1909





ADMINISTRATION SANITAIRE  
DE  
L'EMPIRE OTTOMAN

Djeddah, le 27 Août 1909.

SERVICE DE DJEDDAH (Mer Rouge)

N<sup>o</sup>

ADMINISTRATION SANITAIRE

DE L'EMPIRE OTTOMAN

OBJET :

CONSTANTINOPLE

*Contribution à l'étude des  
propriétés morphologiques et bio-  
logiques du vibrion cholérique.*

Messieurs,

J'ai entrepris pendant mon dernier congé, à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Cagliari (Sardaigne) ces quelques recherches expérimentales dans le but d'apporter ma modeste contribution à une connaissance plus parfaite du vibrion cholérique. On sait en effet qu'il y a encore des faits inexplicables dans l'épidémiologie du choléra, et que les résultats des recherches de laboratoire ne sont pas tous bien probants.

### **I. Examen des vibrions par l'éclairage à fond noir.**

L'application pratique de l'éclairage à fond noir aux recherches de microscopie a pour point de départ l'ultramicroscope de Siedentopf et Zsigmondy : mais cet appareil, ainsi que l'autre de Cotton et Mutton, sert seulement pour l'examen des colloïdes nageant dans un milieu liquide. Au cours de mes recherches, j'ai employé tous les dispositifs d'éclairage à fond noir dont l'on fait usage aujourd'hui, dispositifs que Mr le Directeur de l'Institut a bien voulu mettre à ma disposition, à savoir : le condensateur parabolique de Siedentopf de la maison Zeiss, le condensateur parabolique de la maison Koristka, le condensateur à miroir de la maison Reichert, et le condensateur achromatique Koristka avec la lentille supérieure dépolie et noircie, suivant Casagrandi.

J'ai dû abandonner, après essai, le dispositif très simple



qu'on réalise en diaphragmant les condensateurs ordinaires, car le fond noir qui en résulte peut tolérer seulement un système optique limité (ocul. comp. 8. objec. à sec 6.), tandis qu'avec les quatre systèmes susmentionnés on peut très bien se servir des lentilles à immersion.— Mais elles doivent être diaphragmées avec un diaphragme en métal noirci percé de trous de différents diamètres (Koristka), ou bien bouchées par une tige formant diaphragme que l'on visse derrière la partie optique de l'objectif (Zeitz): dans le premier cas on intercepte le faisceau latéral des rayons qui proviennent de la préparation, dans le deuxième au contraire le faisceau central est intercepté.— Grâce à un tel dispositif j'ai pu obtenir des grossissements de 1800 diamètres; j'ai observé les images les plus nettes avec l'objectif  $\frac{1}{13}$  Koristka et les ocul. comp. 4. 6. 8. La source lumineuse a été toujours donnée par une lampe à bec Auer; en employant les condensateurs Zeiss et Koristka, entre la source lumineuse et le microscope, on place un ballon en verre rempli d'eau: il sert pour concentrer les rayons du bec Auer sur le miroir du microscope; en employant le condensateur Reichert, ce ballon est remplacé par une lentille biconcave: alors il est prudent de faire passer les rayons lumineux, qui sortent concentrés et chauds de cette lentille biconcave, à travers une cuvette remplie d'eau: c'est une précaution qui évite tout dommage à l'objectif, sans que la netteté des images sur fond noir soit diminuée. Rien n'empêche que l'expérience ait lieu à la lumière du jour, mais il est alors préférable d'abriter le microscope derrière un carton pour éviter que l'éclairage ambiant trouble la netteté de l'observation à fond noir.

La préparation pour l'examen est faite avec une culture des vibrions jeune de 24 heures: On met sur la lamelle une goutte de solution physiologique de Na Cl, où l'on délaye une très petite quantité de la culture; sur la lame on place la lamelle en évitant de former des bulles d'air qui dérangent fortement l'examen sur fond noir, puisqu'elles deviennent des anneaux ou des ovoïdes lumineux qui troublent l'obscurité du fond; enfin on colle tout autour la lamelle sur la lame avec le mastic d'Arcanson (cire vierge et colophane 3: 1.). Entre la lentille frontale du condensateur et la préparation l'on doit placer de l'huile de cèdre en évitant pareillement la formation de bulles d'air. Pour l'observation on emploie d'abord le système à sec moyen et fort et, après, quand le tout est disposé de façon



qu'on ait les images les plus nettes sur le fond noir, on emploie le système à immersion.

Je dois dire avant tout que l'éclairage à fond noir ne porte aucune contribution aux diagnostics morphologiques de différentes espèces de vibrions: j'ai examiné une dizaine de vibrions cholériques, le *V. Proteus*, *V. Metchnikoff*, *V. Danubicus*, *V. Tyrogenes*, et plusieurs vibrions des eaux: mais toutes les particularités de forme, de grandeur, de disposition et de profondeur de la courbure du germe etc., qui sont les seules données qu'on peut remarquer sur le fond noir, sont les mêmes qu'on remarque dans les préparations simples colorées avec la fuchsine diluée. Tout vibrion se montre constitué par une membrane périphérique fortement éclairée, tandis que son centre est noir; on a l'impression que le germe est troué. Dans le bloc central noir, on observe très fréquemment, un, deux, trois granules très réfringents luisants, dont la situation est polaire ou centrale. La membrane périphérique n'existe pas en réalité; elle est l'effet optique de l'éclairage à fond noir: on a le même aspect dans le *staphylococcus pyogenes*, le *b. typhi*, *b. coli*, *bacillus subtilis*, et aussi dans un germe capsulé: le pneumobacille de Friedlander: les cocci paraissent sous la forme d'anneaux, les bacilles et les bactériums sous la forme de chas luisants. L'explication est facile: les différents condensateurs paraboliques interceptent, à l'aide d'un diaphragme noirci, les rayons centraux qui sortent du miroir du microscope, rayons dont l'ouverture numérique est inférieure à 1, 1 tandis que les rayons périphériques qui ont des ouvertures numériques comprises entre 1, 1 et 1, 4 ont une marche différente selon l'appareil. Dans les systèmes Zeiss et Koristka ils sont réfléchis par la surface convexe du paraboloïde et renvoyés obliquement sur la préparation qui est placée au foyer du paraboloïde; dans le condensateur Reichert ils se réfléchissent sur la surface latérale en miroir, qui est oblique, mais plate, ils sont renvoyés sur la surface inférieure elle aussi en miroir, d'où ils vont obliquement vers la préparation. Comme on le voit la préparation n'est pas illuminée de bas en haut, mais d'une façon latérale oblique: les rayons obliques se réfractent seulement à la périphérie du germe, car l'indice de réfraction du milieu liquide dans lequel se trouve le vibrion est différent de l'indice de réfraction de la périphérie du vibrion; seuls les granules contenus dans la masse centrale



du vibrion sont illuminés parce qu'ils ont un degré très fort de réfraction.

Ces granules sont immobiles dans l'intérieur des germes ; j'insiste sur cette proposition, et j'ajoute qu'ils ne doivent pas être confondus avec des points luisants qui ne sont pas de granules, et qui paraissent, à l'observation superficielle, comme des granules qui se transporteraient rapidement d'un bout à l'autre du vibrion. Ces points sont la représentation lumineuse des sommets des enroulements que forme le corps du vibrion dans son rapide mouvement spirillaire, sommets qui, pendant le déplacement du germe, tombent, de temps à autre, dans le plan où se croisent les rayons obliques éclairants.

Les granules soumis à la coloration vitale de Cesaris-Demel (alcool absolu 20 gr. — Sudan III. 4. centig. Br Cresylblau 2 centig.) ne prennent pas la coloration des graisses, mais bien la coloration métachromatique. Si l'on fait une préparation par étalement de la dilution de la culture, en suivant la technique recommandée pour la coloration du sang, et si après on colore au Giemsa pendant 24 heures, ces grains prennent une couleur plus foncée que la masse vibronienne qui est colorée en lilas, et comme trouée par des espaces clairs.

Le mouvement des vibrions que l'éclairage à fond noir nous permet de suivre dans des conditions des plus favorables, est nettement et caractéristiquement un mouvement de spire. Je n'ai jamais réussi à voir, malgré des examens diligents et répétés, le cil polaire auquel l'on attribue ce mouvement. Cela veut dire que l'indice de réfraction de la substance ciliaire ne diffère point ou très peu de l'indice de réfraction du milieu liquide où le germe nage. Il est vrai, d'autre part, que tout autour du vibrion qui court rapidement sur le fond noir, et qui en conséquence perd de temps à autre sa mise au point, on voit des franges lumineuses; mais elles ne sont que des franges de diffraction qu'on remarque aussi à l'examen des germes immobiles (*sarcinae*) et des germes périthryques (*b. typhi*, *b. subtilis*), quoique dans ce dernier cas les franges soient plus larges. Je puis donc dire que l'éclairage à fond noir ne nous est d'aucun secours, pour affirmer ou nier la présence des cils autour d'un germe, moins encore pour calculer le nombre ou la disposition des cils, ou pour en étudier la morphologie. On a dit et on croit encore généralement que les cils sont des organes de mouvement, mais désormais il semble qu'on ne doit pas dans tous les cas rendre



synonyme de mouvement la présence de cils puisque quelques patients observateurs auraient relevé les cils aussi dans toutes ou presque toutes les formes immobiles de la famille des *coccus* et en conséquence dans les *staphylococcus* et les *sarcinae* (Casagrandi). Pour moi, et pour l'impression que j'ai eue en examinant des vibrions monothryques sur fond noir, le cil polaire aurait tout au plus pour fonction de donner la direction du mouvement tandis que ce mouvement paraît comme une fonction directe de tout le corps du germe, comme l'effet d'un *quid vitale* existant dans toute la masse. Si on me permet une comparaison banale mais explicative je dirais que les cils représentent le gouvernail qui donne la direction du mouvement au navire, dont la force motrice réside dans la machine centrale.

## II. Cutiréaction & ophthalmoréaction vis-à-vis de la toxine cholérique

En mai 1907, Pirquet de Vienne fit connaître à la Société médicale de Berlin qu'il avait obtenu avec la vieille tuberculine de Koch T.A.R., à 25<sup>0</sup>/<sub>0</sub> des éléments éruptifs sur la peau d'enfants atteints de tuberculose (Kutine-Tuberkulin Reaction) et presque en même temps, Wolff Eisner de Berlin qu'il avait remarqué chez des adultes tuberculeux des réactions hypérémiques et exsulatives des conjonctives soumises à une goutte de T. A. R. à 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (Konjunktival-Tuberkulin Reaction). Mais Calmette ayant, un mois après la communication de Wolff Eisner à Berlin, relaté à l'Académie des Sciences de Paris ses résultats sur le même objet, la réaction conjonctivale est mieux connue sous le nom de oculoréaction de Calmette. De très nombreuses recherches (Letulle, Citron, Dufour, Comby, Bazy, Engel et Bauer, Baudler et Kreibilich, Lignières, Arloing, T. Lemaire, Petit, S. Cohn, Pieroni, Bertoli, Feliziani, Vallardi, etc.) suivirent les communications de ces savants, visant toutes le but et l'espoir de trouver dans les deux phénomènes un moyen sûr de diagnostic et de pronostic de la tuberculose. Aujourd'hui on peut dire, tout bien considéré, que les deux réactions sont déjà entrées dans la pratique médicale (peut être moins l'ophthalmoréaction à cause de l'inflammation alarmante qu'elle donne,) où, si elles sont bien interprétées, elles offrent vraiment un appoint utile pour le diagnostic de la tuberculose incipiente. La cause



intime de ces phénomènes n'est pas encore bien connue : je me borne à citer les théories les plus importantes.

Pour Pirquet la réaction précoce qu'on remarque dans les maladies à sérums et dans la revaccination est strictement liée à l'hypersensibilité qu'il appelle Allergie. Le sérum injecté allergène ou antigène provoque dans l'organisme la formation de l'ergine ou anticorps, ce qui serait la cause de l'hypersensibilité. Les ergines, ou anticorps sont en général spécifiques, et réagissent seulement en présence de leur antigène ou allergène.

Wolff Eisner croit que chez les tuberculeux il y a des substances capables de mettre en liberté des scories bacillaires (Bazillensplitter) ultramicroscopiques dont la tuberculine serait composée, éléments à action irritante qui produiraient les réactions locales; Zieler, au contraire, en employant une tuberculine déjà privée, à l'aide de la filtration et de la dialyse, des Bazillensplitter de Wolff Eisner a observé des réactions très évidentes. Pour Nicolle, les phénomènes d'hypersensibilité sont dus à la formation d'anticorps lytiques, et Armand Delille est porté à conclure que c'est la présence des anticorps lytiques dans le sérum et leur mise en liberté au niveau de l'inoculation cutanée de la tuberculine qui déterminent la réaction papulo-erythémateuse locale de la cutiréaction, ou l'injection conjonctivale locale de l'ophthalmoréaction. Sans attendre que l'origine intime de ces phénomènes soit élucidée les expérimentateurs appliquèrent ou tâchèrent d'appliquer la réaction de Pirquet et de Calmette au diagnostic d'autres maladies infectieuses : mais les résultats jusqu'à présent connus sont douteux ou contradictoires. C'est ainsi que A. Putzeys, et T. Stiennon n'observèrent aucune réaction locale chez 7 cheveaux morveux traités avec la malléine, tandis que Vallée a obtenu une cutiréaction positive. Chantemesse aurait remarqué l'ophthalmoréaction chez des typhiques, tandis que pour Braga les résultats de l'ophthalmoréaction dans la fièvre typhoïde seraient douteux.

J'ai tâché d'appliquer les deux nouvelles réactions aux cobayes, d'abord soumis à l'injection des vibrions cholériques et banals. Vous comprenez le but que je visais. Ces réactions, si positives et spécifiques, appliquées à l'homme cholérique, nous auraient donné un moyen très rapide, sûr et facile de diagnostic du choléra.

Pour rendre plus facile la relation, je divise en deux groupes les cobayes préparés avec le matériel anaphylaxant (Richet) ou hypersensibilisant (Pirquet). Dans les cobayes du premier groupe j'injecte dans le péritoine un, deux dépôts vibrioniens d'une culture de 24 heures en gélose, dépôts qui ont été tués d'avance par le



rechauffement à 60° pendant une heure, et après 3-4 jours, j'essaye la cuti et l'oculoréaction. Les cobayes du second groupe sont préparés d'abord comme les précédents et après 4 jours ils sont soumis à l'injection, dans le péritoine, d'une anse de vibrions vivants: après 2-3 jours on essaie les réactions de Pirquet et Calmette. J'ai préparé l'antigène des trois façons suivantes 1° Méthode de Brieger pour l'endotoxine. On ensemence les vibrions sur des grandes plaques de gélose ou des boîtes de Pétri; 3-4 jours après, au moment où le développement des germes est très fort, on retire les dépôts vibroniens à l'aide d'une spatule, on les émulsionne dans l'eau distillée et l'on place les émulsions à 40° c. pendant toute une semaine; mais chaque jour elles sont soumises au secouement pendant deux heures dans un Schüttelnapparat; on les filtre ensuite à travers les bougies filtrantes et l'on conserve le liquide dans la glacière. 2° On prépare dans des larges récipients des cultures en bouillon des vibrions que l'on tient dans l'étuve à 37° pendant 10 à 12 jours, après quoi on filtre et l'on conserve dans la glacière. 3° On injecte dans le péritoine des cobayes deux enduits de vibrions vivants délayés dans 5, 7, c/c d'eau physiologique, et un peu avant que les cobayes soient tués on retire, à l'aide des pipettes Pasteur, le liquide péritonéal riche en aggrégations, on scelle les pipettes à la lampe et on les place dans la glacière.

J'ai soumis à l'étude plusieurs vibrions, parmi lesquels il y en avait de cholériques (*V. Prussiae*, Camaran,) de paracholériques (?) (*V. Tor*,) de non cholériques (*V. Danubicus*, Metchnikoff, *Proteus*). Pour la cutiréaction: sur les dos et les flancs des cobayes soigneusement rasés, on frotte avec du coton trempé d'éther; une goutte du liquide antigène est posée sur la peau ainsi préparée, et dans la goutte on fait de petites scarifications à l'aide d'une aiguille pour vaccination; on évite toute sortie de sang; après quoi, les animaux sont immobilisés pendant quelques minutes.

Pour l'ophthalmoréaction les paupières sont bien ouvertes et on verse à l'angle interne de l'œil une goutte du liquide antigène: tout clignotement est empêché pendant quelques minutes: un petit massage termine l'opération. J'ajoute que plusieurs cobayes avaient été injectés avec chacun des vibrions mentionnés, avant d'être soumis à la cuti et ophthalmoréaction en employant les trois liquides antigènes préparés avec ces mêmes vibrions, tandis que sur les autres cobayes je faisais les deux réactions en employant l'antigène préparé par des vibrions d'espèce différente. Je visais à établir si, les deux réactions étant positives, elles étaient aussi spécifiques pour le vibron cholérique. Comme contrôle, j'ai employé de cobayes sains, sans aucune injection préventive.



Ayant obtenu chez tous les cobayes examinés (sujets et témoins) toujours les mêmes résultats, je me dispense de dresser le tableau de toutes les expériences. Je me borne donc à dire que, soit chez les cobayes traités avec l'antigène homologue, soit chez ceux traités avec l'antigène hétérologue, j'ai noté, sur les scarifications de la peau, après un jour, de très légères lésions inflammatoires (à savoir turgescence et rougeur) qui après se couvrirent de croûtes. On ne doit pas considérer comme spécifiques de telles lésions, puisque, le plus souvent, on ne peut pas les différencier de semblables lésions des cobayes témoins. Quant aux yeux, ils restèrent toujours sains : une seule fois j'ai remarqué après 7 heures un catarrhe conjonctival qui avait disparu après deux jours. C'était un cobaye injecté avec un enduit de vibrion de Prusse, tué à 60° c. et, après, avec une anse du même vibrion vivant, l'antigène était une goutte du liquide préparé par l'autolyse du même vibrion (Méthode Brieger). Mais dans des examens successifs je n'ai pu plus obtenir le même résultat.

Pour conclure, je dois considérer comme négatif le résultat de toutes mes recherches sur la cuti et l'ophtalmoréaction cholériques. Je pourrai bien tâcher d'expliquer un tel résultat, mais je le crois inutile tant que nous ignorerons la vraie essence des phénomènes d'allergie. Mais, puisque l'occasion s'en présentait, j'ai voulu voir tout au moins si la cuti et l'oculoréaction négatives n'étaient pas la conséquence de la trop petite quantité d'antigènes dans les liquides que j'avais préparés par les trois procédés susmentionnés. Voilà la raison pour laquelle j'ai fait l'épreuve de la fixation du complément, d'après la technique de Wassermann et de ses élèves.

### **Fixation du complément**

Le système hémolytique est constitué par des globules rouges de bœuf, bien lavés afin d'ôter toute trace de sérum, et par le sérum d'un lapin soumis pendant deux mois à une injection hebdomadaire de sang de bœuf. Ce sérum centrifugé à plusieurs reprises, très limpide, est chauffé une demi-heure à 56° c. afin de détruire son alexine. L'ambocepteur spécifique est constitué par le sérum limpide et chauffé une demi-heure à 56° c. des cobayes injectés préalablement avec des vibrions et sur lesquels j'avais déjà remarqué le résultat négatif de la cuti et de l'oculoréaction. J'ai employé comme antigène tantôt les produits d'autolyse des vibrions de Prusse obtenus avec la méthode de Brieger ; tantôt le liquide agressinique aspiré du péritoine des cobayes inoculés avec les vibrions vivants de Prusse, et



filtré ; tantôt l'eau salée physiologique qui avait servi pour laver les corps des vibrions de Prusse, pendant qu'ils étaient broyés avec du quartz dans un mortier en acier actionné par un moteur à gaz, 24 heures durant. (Inutile de dire que cette eau de lavage était très limpide, ayant été enlevé toute minime trace de quartz, matériel qui pouvait très bien déterminer une absorption de l'hémolyse, comme déjà Langshewner et Stankwrj l'ont démontré). Enfin le sérum de cobaye employé comme complément était toujours très récent, sans hémoglobine, très limpide, et l'eau physiologique employée pour les dilutions, toujours stérile, limpide, et non hémolytique.

L'épreuve définitive de Wassermann, pour être à l'abri de toute critique, doit être précédée par une série d'épreuves préliminaires, la pratique ayant démontré que la fixation du complément peut être dérangée, ou par l'excès du sérum sensibilisateur des hématies (Neisser et Sachs), ou par un excès d'antigène (Moreschi Fleischmann et Michaélis), ou par l'excès du sérum fixateur (Moreschi et Liefmann). Les épreuves préliminaires ont donc pour but d'écarter toutes ces causes d'erreur qui pourraient porter à une fausse interprétation des résultats.

Les préparatifs de la première expérience préliminaire sont faits de la manière suivante :

### Titrage du pouvoir du sérum hémolytique

TUBES	Dilution de globules à 5 % dans l'eau physiologique	Sérum hémolytique de lapin-bœuf chauffé	Sérum frais de cobaye neuf (Alexine)	RÉSULTAT de L'HÉMOLYSE
N <sup>o</sup> 1	1 cm. c.	0.25 cm.c.	0.1 cm.c.	+ + +
» 2	1 »	0.20 »	0.1 »	+ + +
» 3	1 »	0.15 »	0.1 »	+ + +
» 4	1 »	0.10 »	0.1 »	+ + +
» 5	1 »	0.05 »	0.1 »	+ + +
» 6	1 »	0.02 »	0.1 »	+ + +
» 7	1 »	0.01 »	0.1 »	+ + +
» 8	1 »	0.005 »	0.1 »	+ + +
» 9	1 »	0.002 »	0.1 »	+ + +
» 10	1 »	0.000.5 »	0.1 »	+ + +
» 11	1 »	0.000.3 »	0.1 »	+ + + après 1/2 heure
» 12	1 »	0.000.2 »	0.1 »	— —



Dans tous les tubes on ramène le volume total à 2 cm.c. à l'aide de l'eau physiologique. Les tubes sont placés dans l'étuve : on prépare deux tubes témoins pour montrer que le sérum sensibilisateur de lapin-bœuf à lui seul n'est pas hémolytique, et que le sérum frais de cobaye neuf (Alexine), à lui seul n'est pas non plus hémolytique.

Ce tableau nous amène à conclure que l'unité hémolytique du sérum du lapin-bœuf est dans notre cas de 0.000.3 cm.c. à savoir que : 0.000.3 de sérum de lapin-bœuf + 0.10 d'alexine constituent un système hémolytique vis-à-vis de globules rouges de bœuf, dilués à 5 % dans l'eau physiologique. Dans la pratique on multiplie par deux, ou deux et demie, cette unité hémolytique : nous emploierons donc, dans chaque tube, 1 cm.c. de la solution des hématies de bœuf à 5 % sensibilisées avec 0.000.8 cm.c. de sérum de lapin-bœuf.

La deuxième expérience préliminaire nous permet de voir si l'antigène à lui seul, sans la présence des ambocepteurs, ne fixe pas le complément.

En voici le tableau :

TUBES	Antigène	Complément	Système hémolytique	Résultat de l'hémolyse		
N <sup>o</sup> 1	0.10 cm.c.	0.10 cm.c.	1 cm.c.	+	+	+
» 2	0.25 »	0.10 »	1 »	+	+	+
» 3	0.50 »	0.10 »	1 »	+	+	+
» 4	1.00 »	0.10 »	1 »	+	+	+

On ramène le contenu de chaque tube au même volume. L'expérience est répétée pour chacun des différents antigènes, que j'étudiais : le résultat toujours le même, à savoir que nulle dose de chacun des antigènes n'est capable d'absorber le complément. Il va donc de soi que j'emploierai dans l'expérience définitive la dose plus grande d'antigène : à savoir 1 cm.c., car elle renferme la plus grande quantité de substance spécifique capable de nous donner un résultat positif de la fixation du complément.

La troisième expérience préliminaire a pour but de voir si les sérums fixateurs des cobayes, à eux seuls, ne fixent pas le complé-



ment à la suite des combinaisons chimiques dans une position anormale.

En voici le tableau :

TUBES	SÉRUM FIXATEUR	COMPLÉMENT	SYSTÈME HÉMOLYTIQUE	RÉSULTAT de L'HÉMOLYSE		
N° 1	Sér. Prusse 0.005 cm.c.	0.1 cm.c.	1 mc.c.	+	+	+
» 2	» » 0.01 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 3	» » 0.05 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 4	» » 0.10 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 5	» Camaran 0.005 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 6	» » 0.01 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 7	» » 0.05 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 8	» » 0.10 »	0.1 »	1 »	—	—	
» 9	» Tor 0.005 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 10	» » 0.01 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 11	» » 0.05 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 12	» » 0.10 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 13	» Danubicus 0.005 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 14	» » 0.01 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 15	» » 0.05 »	0.1 »	1 »	+	+	+
» 16	» » 0.10 »	0.1 »	1 »	+	+	+

On ramène le contenu de chaque tube au même volume. En me basant sur les données de ce tableau j'emploierai dans l'expérience définitive pour les sérums Prusse, Tor, Danubicus, les quatre doses ci-dessus ; pour le sérum Camaran je n'emploierai pas la dernière (0.1), qui est une quantité de sérum fixateur capable d'entraver la fixation de complément.

Enfin une quatrième épreuve préalable nous permet de nous assurer si dans les sérums fixateurs des cobayes l'alexine a été détruite par le chauffage à 56°c. pendant une demi-heure.

TUBES	SÉRUM FIXATEUR	EAU physiologique	SYSTÈME hémolytique	RÉSULTAT de l'hémolyse	
N° 1	Sér. Prusse 0.10 cm.c.	0.9 cm.c.	1 cm.c.	—	—
» 2	» Camar. 0.10 »	0.9 »	1 »	—	—
» 3	» Tor 0.10 »	0.9 »	1 »	—	—
» 4	» Danub. 0.10 »	0.9 »	1 »	—	—



Ayant ainsi déterminé tous les éléments constitutifs de l'expérience principale, et écarté tout doute sur la signification à donner au phénomène, je passe à l'épreuve définitive, en employant premièrement comme antigène l'eau de lavage des corps broyés des vibrions de Prusse.

En voici le tableau :

### Épreuve de Wassermann

TUBES	ANTIGÈNE		SÉRUM FIXATEUR		COMPLÉMENT	Système hémolytiq.	Résultat de l'hémolyse	
N <sup>o</sup> 1	1	cm.c.	Sérum Prusse	0.005 cm.c.	0.1 cm.c.	1 cm.c.	+	+
" 2	1	"	" "	0.01 "	0.1 "	1 "	+	+
" 3	1	"	" "	0.05 "	0.1 "	1 "	+	+
" 4	1	"	" "	0.10 "	0.1 "	1 "	+	+
" 5	1	"	" Camaran	0.005 "	0.1 "	1 "	+	+
" 6	1	"	" "	0.01 "	0.1 "	1 "	+	+
" 7	1	"	" "	0.05 "	0.1 "	1 "	+	+
" 8	1	"	" Tor	0.005 "	0.1 "	1 "	+	+
" 9	1	"	" "	0.01 "	0.1 "	1 "	+	+
" 10	1	"	" "	0.05 "	0.1 "	1 "	+	+
" 11	1	"	" "	0.10 "	0.1 "	1 "	+	+
" 12	1	"	" Danubicus	0.005 "	0.1 "	1 "	+	+
" 13	1	"	" "	0.01 "	0.1 "	1 "	+	+
" 14	1	"	" "	0.05 "	0.1 "	1 "	+	+
" 15	1	"	" "	0.10 "	0.1 "	1 "	+	+
" 16	1	"	S. Cobaye neuf chauffé	0.005 "	0.1 "	1 "	+	+
" 17	1	"	" "	0.01 "	0.1 "	1 "	+	+
" 18	1	"	" "	0.05 "	0.1 "	1 "	+	+
" 19	1	"	" "	0.10 "	0.1 "	1 "	+	+

Après y avoir ajouté le sérum fixateur, les tubes sont soigneusement agités; le contenu est ramené au même volume dans tous à l'aide de l'eau physiologique; on agite; on ajoute le complément; on agite encore, et on place dans l'étuve à 37<sup>o</sup>c. pendant une heure. On ajoute le système hémolytique, on agite de nouveau, on place pendant deux heures dans l'étuve à 37<sup>o</sup>c., et pendant douze heures dans la glacière. On observe les résultats.



Dans une deuxième épreuve l'antigène est l'extrait autolytique du vibron de Prusse, dans une troisième le liquide agressinique aspiré du péritoine des cobayes injectés avec les vibrions de Prusse vivants et virulents. Dans deux autres expériences successives l'antigène est respectivement l'extrait autolytique et le liquide agressinique du vibron de Camaran. Le résultat a été toujours le même : hémolyse positive c'est-à-dire fixation du complément négative. Dans une dernière expérience le résultat de l'hémolyse a été négatif c'est-à-dire la fixation du complément positive ; dans cette expérience, l'antigène était l'extrait autolytique du vibron de Prusse, préparé suivant la méthode de Brieger et concentré dans le vide. Il s'agissait d'une bouillie blanchâtre, qui, en y ajoutant de l'eau physiologique, devenait un liquide trouble ; en employant comme antigène 1 cm.c. de ce liquide trouble, comme sérum fixateur, le même sérum du cobaye préparé avec le vibron de Prusse que dans les expériences précédentes et aux mêmes doses, complément et système hémolytique identiques, l'épreuve de Wassermann a été positive. Mais cela ne prouve rien. Je rappelle en effet que quelques savants ont mis en évidence la possibilité que dans un mélange du sérum fixateur et d'antigène troublé, on a la formation de précipités, qui, à eux seuls, sont capables, comme déjà Erhlich et Morgenroth l'avaient remarqué, de fixer le complément. Tel pourrait être notre cas, tel est le cas que l'on observe dans les expériences où l'antigène est représenté par des bouillies d'organes ; d'où la nécessité d'avoir toujours des extraits parfaitement limpides.

Le résultat négatif de l'oculo et de la cutiréaction chez les cobayes injectés avec des dépôts vibrioniens chauffés à 60°c., et avec des vibrions vivants, ainsi que celui aussi négatif de la fixation du complément, d'après la méthode de Wassermann, nous amènent à la conclusion logique qu'il faut incriminer la préparation du liquide antigène, c'est-à-dire que les procédés que j'ai employés sont insuffisants, ou incomplets, pour obtenir un liquide capable d'une réaction spécifique. J'en vais donner la démonstration en procédant à l'épreuve de la fixation du complément, suivant la technique originale que Bordet et Gengou appliquèrent dans leurs recherches sur l'agent pathogène de la Coqueluche. Dans cette épreuve de Bordet et Gengou tous les éléments sont les mêmes, que dans l'épreuve de Wassermann, j'ai remplacé seulement l'extrait antigène par une émulsion de vibron. Le sérum fixateur est, à tour de rôle, le sérum



Prusse et Camaran, déjà employés dans les expériences précédentes; identique est le système hémolytique. L'antigène ici est représenté par le dépôt frais de 18 heures du vibrion de Prusse, ou de Tor, émulsionné dans l'eau physiologique.

Voici résumées dans un tableau les données relatives à cette dernière expérience :

### Épreuve de Bordet et Gengou

TUBES	ANTIGÈNE EMULSION DU VIBRION	SÉRUM FIXATEUR	Complém.	Système hémolytiq.	Résultat de l'hémolyse
N° 1	V. Prusse 0.2 cm.c.	S. Prusse 0.1 cm.c.	0.05 cm.c.	1 cm.c.	—
» 2	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	—
» 3	» 0.2 »	S. Camar. 0.1 »	0.05 »	1 »	—
» 4	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	—
» 5	Vibr. Tor 0.2 »	S. Prusse 0.1 »	0.05 »	1 »	—
» 6	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	—
» 7	» 0.2 »	S. Camar. 0.1 »	0.05 »	1 »	—
» 8	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	—
» 9	V. Prusse 0.2 cm.c.	Sérum Cobaye neuf chauffé 0.1 »	0.05 »	1 »	+ +
» 10	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	+ +
» 11	Vibr. Tor 0.2 »	» 0.1 »	0.05 »	1 »	+ +
» 12	» 0.2 »	» 0.3 »	0.05 »	1 »	+ +

Tous les tubes, après y avoir ajouté le complément, furent agités et placés dans l'étuve à 37° pendant 5 heures; on y ajoute le système hémolytique, et on les remet dans l'étuve pendant 2 heures et après dans la glacière.

L'hémolyse négative à savoir la réaction de Bordet et Gengou positive, confirment ma proposition de tout à l'heure que la réaction négative de Wassermann dans les expériences précédentes, et, par suite, celles négatives de la cuti et oculoréaction, sont la conséquence de la préparation insuffisante de l'extrait antigène, car ce seul élément ayant été changé dans l'épreuve de Bordet et Gengou, la réaction est devenue positive. En conséquence je puis dire raisonnablement que mes sérums fixateurs n'étaient pas dépourvus d'ambocepteurs ce qui peut se produire, comme les recherches de Haendel l'ont démontré



dans le cas où le vibron en examen est avirulent pour n'avoir été soumis, depuis longtemps, à aucun passage à travers l'organisme animal.

Mais une autre assez intéressante conclusion découle de la dernière épreuve de Bordet et Gengou. Le vibron Tor, que j'ai employé est l'un des 6 échantillons de vibron de Tor que Krause appelle paracholériques, en se basant sur la production d'une hémolyse et d'une exotoxine très virulente, que les vrais vibrions cholériques ne produiraient pas. La question de l'exotoxine est encore *subjudice*, mais pour l'hémolysine, il est désormais acquis qu'elle est un caractère variable des vrais vibrions cholériques : les recherches de Kolle, de Neufeld, et Haendel, les miennes, sur les vibrions cholériques de Camaran, et celles très récentes de Zabolotny, Iakovlew, Zlatogoroff et Koubecha, sur des vibrions isolés pendant l'épidémie de St-Petersbourg du 1907-1908, s'accordent sur ce point. La signification de l'épreuve positive de Bordet et Gengou c'est que le sérum fixateur de cobayes préparés avec de vrais vibrions cholériques (Prusse et Camaran) possède des sensibilisatrices spécifiques non seulement, à l'égard des vibrions de Prusse mais aussi des vibrions de Tor ; c'est-à-dire que les vibrions de Tor sont identiques aux vibrions de Prusse, et en conséquence, ne doivent plus être considérés comme paracholériques mais comme de vrais vibrions cholériques. Sur ce point mes recherches confirment celles de Besche et Kohn.

### III. Présence de sphérules dans les cultures en gelose du vibron cholérique de Prusse

---

Mes dernières observations concernent la présence de petites formes sphériques contenues dans les cultures sur gélose de 18 heures, du vibron de Prusse. Inutile de dire que toute présence de germe étranger à la culture doit être écartée. Une petite quantité de la culture de vibron est émulsionnée dans une goutte d'eau physiologique et examiné à l'état frais sans coloration. On y voit de petites sphères qui tantôt sont animées d'un vif mouvement de rotation et de translation, tantôt sont immobiles. Les deux phases de mobilité et d'immobilité se succèdent régulièrement ; n'importe dans quel moment ; la sphère a toujours un bord net, bien délimité par une ligne courbe, tandis



que son contenu varie suivant la phase et le moment de l'observation. Pendant la phase d'immobilité on peut y voir les figures suivantes : 1<sup>o</sup> une bande annulaire périphérique entoure une ou deux protubérances centrales, dans la bande annulaire on relève la présence de 1,2,3 points foncés, 2<sup>o</sup> une moitié de la sphère est formée par une matière plus dense, en croissant ; le bord du croissant a dans son milieu, une protubérance ronde, tandis que sa masse renferme deux espaces clairs et ronds ; dans l'autre moitié de la sphère, on ne voit aucune particularité morphologique. 3<sup>o</sup> trois protubérances denses, réunies l'une à l'autre par une bande mince, occupent tout l'intérieur de la sphère. 4<sup>o</sup> deux corps piriformes dont chacun a un espace clair au centre, et qui sont adhérents par un des leurs bords, sont posés sur une masse dense, mal définie, masse qui présente un tubercule au-dessous des bords arrondis des corps piriformes. 5<sup>o</sup> deux croissants sont disposés à la périphérie de la sphère et se regardent par leurs concavités ; leurs bouts sont joints ; à un moment donné les deux croissants se séparent et la sphère tourne sur elle-même à l'instar d'une toupie : les bouts des croissants se rejoignent et le mouvement s'arrête.

Durant la phase de mobilité la sphère présente un double mouvement, de rotation autour d'elle-même et de translation plus ou moins rapide sur tout le champ du microscope. Pendant le mouvement de rotation la sphère tourne rapidement comme sur un pivot, deux croissants joints par leurs bouts ont l'apparence de pousser l'un contre l'autre un bloc rond, mobile, placé au milieu de leur concavité. Pendant le mouvement de translation la sphère roule comme une boule sur un plan ; à un examen attentif on remarque la présence de trois gousses qui sont adhérentes l'une à l'autre par un seul bout, tandis que pour leur restant ne sont pas contiguës : les trois gousses, à cause du mouvement roulant de la sphère, passent l'une après l'autre sous l'œil de l'observateur.

En étudiant ces formes à l'aide de l'éclairage à fond noir on n'y voit pas d'autres particularités : on remarque seulement que, tandis que le bord de la sphère n'est pas lumineux, sa partie centrale est fortement réfringente. Si on colore une préparation avec le Giemsa on y voit des sphères composées d'une partie centrale non colorée, et d'une bande périphérique colorée en lilas, qui renferme trois grains foncés placés à une distance presque égale l'un de l'autre.

En feuilletant la littérature relativement à ces faits je trouve que,



Gamaleja, Matzuschita, Maassen, Meren, Almquist, etc. ont décrit dans les cultures des vibrions. des sphères et des bulles, qui, d'après ces savants, se produisent en ajoutant à la culture des sels neutres, ou en la soumettant à température basse, ou si l'âge de la culture est avancé; sphères et bulles furent considérées comme des formes de dégénérescence, comme effet de phénomènes osmotiques, ou comme conidies. Aucun savant n'a jusqu'à présent observé les sphères dans des cultures de 18 heures, en gélose commune, et, pareillement, nul observateur n'a remarqué dans les sphères les particularités morphologiques que j'ai décrites. Quant à la signification biologique de ces formes sphériques je réserve mon opinion: en effet le manque de temps, vu l'expiration de mon congé, m'a obligé à couper court à mes recherches sur ce point, ainsi que sur la préparation de l'extrait antigène du vibron cholérique. Mais, puisque quelques savants ont déjà formulé l'hypothèse que les vibrions appartiennent à une classe de microorganismes plus haute que les bactériidies, il est permis de se demander si ces sphères ne représentent pas un stade plus avancé dans l'évolution du vibron cholérique. Naturellement des recherches successives peuvent seulement donner la réponse.

### Conclusions

Les principales conclusions à tirer de cette étude sont les suivantes :

1<sup>o</sup> L'éclairage à fond noir ne nous donne aucun secours pour un diagnostic différentiel entre les diverses espèces de vibrions.

2<sup>o</sup> Il ne permet pas de constater la présence de cils dans les germes qui en possèdent.

3<sup>o</sup> Le cil, dans le vibron monothrique, doit être considéré non comme organe de mouvement, mais, tout au plus, comme organe de direction du mouvement.

4<sup>o</sup> Les épreuves de la cuti et de l'oculoréaction sont négatives chez les cobayes préparés avec des vibrions cholériques et non cholériques.

5<sup>o</sup> L'épreuve de la fixation du complément d'après la méthode Wassermann est aussi négative.

6<sup>o</sup> Le résultat négatif de ces épreuves est la conséquence d'une insuffisante ou incomplète préparation de l'extrait antigène.



7<sup>o</sup> L'épreuve de la fixation du complément d'après la méthode de Bordet et Gengou est positive.

8<sup>o</sup> Les vibrions de Tor, que Krause appelle paracholériques, doivent être considérés comme de vrais vibrions cholériques.

9<sup>o</sup> Dans les jeunes cultures en gélose d'un échantillon de vibron cholérique de Prusse, on remarque la présence de petites sphères qui ont une structure spéciale, bien figurée, et dont pour le moment la signification biologique reste indéterminée.

Veuillez agréer, Messieurs, l'assurance de ma respectueuse considération.

**D<sup>r</sup> CÉSARE ZONCHELLO**

Abou-Saad, le 27 Août 1909.

