

Note technique

LA DÉMONSTRATION DU BACILLE DE HANSEN DANS LES COUPES HISTOLOGIQUES

PAR

A. DUBOIS

Décrire actuellement la coloration des bacilles acido-résistants peut apparaître comme un essai de découverte de l'Amérique. Cependant, ici-même, Van Breuseghem et Mme Moules [1] ont fait justement remarquer qu'il ne suffit pas d'avoir de bonnes méthodes, mais qu'il faut avoir la meilleure possible, spécialement en cas de lèpre où le bacille est souvent rare et n'est ni cultivable ni inoculable. Du reste, la littérature léprologique récente discute encore ces questions [2-3] et cela me fait croire que les essais techniques suivants, faits dans un but d'édification personnelle, pourront être utilisés par des chercheurs en Afrique.

Van Breuseghem et Mme Moules, à la suite des expériences citées plus haut, avaient conclu que, pour des frottis de lèpre humaine, il vaut mieux colorer 2 h. à froid que 3×2 min. à chaud et que l'alcool pur était supérieur à l'alcool à brûler, l'acide sulfurique à l'acide nitrique, comme mélange décolorant.

Je n'ai pu reprendre, faute de matériel, les essais de Van Breuseghem et Mme Moules sur des frottis frais de lèpre humaine, mais j'ai fait quelques essais sur des bacilles acido-

résistants en culture (bac. Kedrowski), en exsudat (bac. de Koch, bac. Stephansky) et sur des bacilles de Hansen et Stephansky tués et conservés.

La méthode a consisté à faire des frottis comparables, à fixer à la chaleur et à colorer, soit :

2 h. à froid (plus ou moins 19°);

8-10 min. à 56°;

10-15 min. à froid (plus ou moins 19°).

La décoloration a été faite, soit à l'alcool dénaturé (*), additionné de 1/10 vol. ac. sulfurique (20-30 sec.), soit par le Bleu de Gabbet (**) (2 × 20-30 sec.), soit par l'acide nitrique (1 vol. + 3 vol. eau) (2 × 1 min.), suivi de lavage rapide à l'alcool. Dans les 1^{re} et 3^e méthodes, on a recoloré 30 sec. au Bleu de Méthylène.

Les différences, selon les temps et les décolorants, ont souvent été faibles et il n'est pas apparu qu'il y ait avantage à prolonger le temps de coloration au delà de 10-15 min. ni qu'il y ait avantage net à chauffer. Dans un cas seulement, une série (Hansen) a montré un gros avantage pour les préparations colorées 2 h., mais un examen plus minutieux a montré qu'il s'agissait d'une solution de Ziehl mal faite et à rejeter.

Avec du Ziehl normal, je ne crois pas qu'il y ait avantage à colorer plus de 20 min. à froid. Avec des bacilles moins résistants (Kedrowski par exemple), les procédés utilisant de l'alcool tendent à faire apparaître les bacilles d'une teinte plus pâle que les procédés utilisant des solutions acides aqueuses et pas d'alcool.

Mais le but de mes essais était surtout de rechercher la méthode histobactériologique la plus sûre. C'est là aussi un problème journalier de la pratique de la lèpre, et un problème important, tant pratiquement que théoriquement. Ici encore, dès coupes des mêmes biopsies lépreuses, les unes riches, les autres

(*) L'alcool éthylique, dénaturé pour raison fiscale, contient 5 % d'alcool méthylique ordinaire contenant lui-même 5% d'acétone.

(**) Eau pour faire 100 cc.

Acide sulfurique 25 cc.

Bleu méthylène 1 gr.

pauvres en bacilles, ont été traitées de façon diverses. Quelques coupes d'organes tuberculeux de cobayes ont aussi été utilisées.

Les méthodes qui ont été comparées, choisies parce que utilisant des décolorants différents ou aussi parce que conseillées par des autorités diverses, sont les suivantes (fixation formol ou Bouin, puis formol) :

I. — Méthode utilisée fréquemment à notre Institut :

Inclure et déparaffiner comme de coutume (xylol-alcools) (*).

1° Colorer 10 à 15 minutes dans le Ziehl, en chauffant légèrement

2° Bien laver.

3° Passer quelques secondes (10 à 15) dans le Chlorhydrate d'aniline à 2 % aq. ; laver. Alcool absolu ou à 95° jusqu'à teinte rose pâle.

4° Laver.

5° Colorer avec hématoxyline Delafield ou Hémalun quelques minutes (selon tissus).

6° Laver, faire bleuir par vapeurs d'ammoniaque.

7° Laver et monter comme de coutume (alcools, xylol).

II. — Méthode utilisée au laboratoire du Dr W. Gavrilov.

Inclusion paraffine. Déparaffiner comme usuellement.

1° Colorer 20 minutes à la fuchsine de Ziehl à 56°.

2° Laver.

3° Décolorer à l'acide sulfurique à 5 % jusqu'à teinte rose mauve pâle.

4° Laver puis traiter quelques secondes à :

5° Alcool fort (90-100°).

6° Laver quelques minutes à l'eau courante.

7° Colorer quelques minutes (selon tissus) par l'Hématoxyline de Weigert (**).

8° Laver.

9° Colorer le fond par une solution de Méthylorange à 1 % dans l'alcool à 70°.

10° Alcools, xylol. Baume.

(*) Nos inclusions sont toujours faites dans alcools divers (temps normal) benzoate de benzyle puis paraffine. J'ignore si le benzoate de benzyle est plus avantageux dans le cas présent que le Toluène.

(**) Mélange fait 10 minutes avant l'emploi de parties égales de :

A. — Hématoxyline 1 % dans alcool à 95° (laisser mûrir 1 mois)

B. — Perchlorure de fer officinal 4 gr.

Acide chlorydrique 1 gr.

Eau dist. 95 gr.

III. — Méthode de Lie (un peu modifiée) (2):

Inclusion paraffine. Déparaffiner comme de coutume.

- 1° Colorer dans la fuchsine de Ziehl 20 à 30 minutes à 37° ou à température du laboratoire.
- 2° Laver.
- 3° Décolorer par Bleu de Gabbet (formule ci-dessus) 2 × 20 à 30 secondes.
- 4° Laver. Enlever l'excès d'eau.
- 5° Passer rapidement dans alcool à 95° contenant un peu de Bleu de Méthylène (sans acide).
- 6° Alcool absolu et Xylol rapidement. Baume.

IV. — Méthode de Lowe [3]:

Fixation alcool à 70° (*) ou au formol ou au Zenker.

Déshydrater les pièces le plus rapidement possible.

Les coupes faites, enlever la paraffine en passant 3 fois quelques gouttes de Xylol.

Sécher au papier filtre et à l'air. Pas d'alcool.

Laver à l'eau (plus Lugol si Zenker).

Colorer 30 minutes, sous un petit morceau de papier filtre mis sur les coupes, par :

Fuchsine basique, 4 gr.

Phénol crist., 8 gr.

Alcool 95°, 20 cc.

Eau, 100 cc.

Laisser 5 à 20 secondes dans Acide sulfurique ou chlorhydrique à 5 %.

Laver quand la teinte est rose pâle.

Recolorer par un peu de Hématoxyline de Delafield puis d'Orange G à l'eau ou si l'on préfère par du Bleu de Méthylène au lieu de ces deux colorants.

Laver.

Sécher au *papier filtre et à l'air*.

Xylol. Baume.

Les méthodes I et II sont à la fois histologiques et bactériologiques, elles utilisent de l'alcool lors de la décoloration et éventuellement un colorant alcoolique (Weigert).

Les méthodes III et IV sont plus bactériologiques que histologiques, elles limitent le plus possible l'action de l'alcool. Notons que, en divers cas, la coloration a été prolongée 2 h. à titre de comparaison.

(*) Paraît peu recommandable.

Des expériences faites il résulte :

1° Il n'est pas nécessaire de colorer plus de 15 à 20 min. à froid. Il est probable que dès 10 min. le gain est faible; par prudence, il est à conseiller de pousser jusque 20 à 30 min.;

2° Comme l'indiquent Lie et Lowe, il paraît y avoir un réel intérêt à limiter le plus possible l'action de l'alcool. Lowe estime que, à la suite du traitement des pièces, les bacilles sont moins résistants qu'en frottis, surtout à l'action de l'alcool.

La méthode de Lie m'a diverses fois donné des résultats supérieurs aux méthodes I et II (la méthode de Lowe a été moins utilisée) : les bacilles sont plus nombreux et plus nets, parfois (bacilles rares) présents par la méthode de Lie et absents par les deux premières.

Dans un essai, des coupes colorées de même façon furent toutes décolorées de même au Beu de Gabbet et l'une montée comme telle, une autre fut traitée au Weigert, et une autre au Weigert après action de l'alcool. Il en résulta une nette diminution du nombre et de la netteté des bacilles, surtout dans cette dernière préparation.

Le Bleu de Gabbet paraît, du reste, agir très modérément : des coupes de lèpre, colorées 10 à 20 min. à froid, ont supporté 4 à 6 min. le Bleu en question, les bacilles restant toujours bien rouges. Des organes de cobaye tuberculeux, colorés 20 min. à froid, ont montré des bacilles bien rouges après 4 et 8 min. de Bleu à l'acide sulfurique.

La méthode de Lowe, que j'ai moins utilisée, paraît fort efficace aussi.

Ces deux méthodes donnent de fort pauvres images histologiques. La méthode de Lowe me paraît abîmer fort les tissus, sans doute, par la brusque évaporation du Xylol. Quant à celle de Lie, il se fait que le Bleu en présence d'acide ne se fixe quasi pas sur le collagène (même en prolongeant) et assez faiblement sur l'infiltrat. On peut améliorer l'aspect en recolorant au Bleu alcalin les préparations faites selon Lie.

Il est en général simple de faire, d'une part, des coupes histologiques par une méthode à son choix et, d'autre part, des coupes faites pour montrer les microbes. Si, pour une raison

quelconque, on ne disposait que de peu de préparations, il est possible, après examen selon Lie, de démonter, d'enlever le Baume et de recolorer à l'Hématoxyline de Weigert-Eosine.

Pour les démonstrations d'enseignement, il vaut certainement mieux utiliser les deux premières méthodes qui, en cas de lèpre cutanée, donnent des résultats à la fois histologiques et bactériologiques.

CONCLUSIONS GENERALES.

1. — Je ne veux pas être trop affirmatif pour ce qui concerne les frottis, n'ayant pu répéter exactement les essais de Van Breuseghem et Mme Moules. En matière de lèpre et bacilles modérément acido-alcool-résistants, je crois qu'il faut être discret dans l'emploi de l'alcool. Je ne crois pas qu'il y ait intérêt à colorer plus de 15 à 20 min.

2. — Pour ce qui concerne les coupes, après fixation au formol, la méthode de Lie apparaît comme la plus sûre. Il est probable que son avantage vient de ce qu'elle limite l'action de l'alcool.

Son défaut est de donner des vues histologiques médiocres. La méthode de Lowe a ce défaut aussi, même plus accusé (dessèchement des tissus). Quelle que soit la méthode qu'on utilise, il est à conseiller d'utiliser des acides aqueux comme décolorants et de limiter les temps d'action de l'alcool au strict minimum.

*Institut de Médecine Tropicale
Prince Léopold, Anvers.*

BIBLIOGRAPHIE.

1. — Van Breuseghem et Mme Moules. — Pratique de la coloration du bacille de Hansen dans les frottis. *Ann. Soc. Belge de Méd. Trop.*, 1937, T. XVII, p. 137.
2. — Lie. — Demonstration of the Leprosy Bacillus in the Leprides. *Intern. Jl. of Leprosy*, 1935, p. 473.
3. — Lowe, John. — A note on the Staining of *Mycobacterium leprae* in Tissue Sections. *Ind. Journ. of Med. Res.*, 1934, vol. 22, p. 313.