

**S.-R. Pattyn \*, M.-Th. Boveroulle \*, F. Gatti \*\* et  
J. Vandepitte \*\*. — Etude des souches de  
*Mycobacterium Ulcerans*  
isolées au Congo (Léopoldville)**

(Note présentée par M. J. Jadin)

De nombreux cas d'ulcères à bacilles acido-résistants (BAR) ont été observés au Congo (Léopoldville): Uele et Maniema (JANSSENS e.a. 1958-1959), Kwango (VAN OYE, 1950), Katanga (PATTYN, 1961), Léopoldville (HENNEBERT e.a., 1962) Uele (VAN DEN ABEELE, 1962) et Bas-Congo (F.O. ANDERSEN, communication personnelle).

La plupart des essais de culture de ces mycobactéries sont restés négatifs: JANSSENS (1958), VAN OYE (1950), PATTYN (1961), VAN DEN ABEELE (1962).

Le groupe de travail au Maniema (JANSSENS, 1959) avait réussi à cultiver 5 souches, qui ont été étudiées également par VAN DEN ABEELE (1962), mais ces cultures ne sont plus en notre possession.

Une étude systématique de ces mycobactéries n'a donc jamais été publiée. Durant les dernières années, nous avons pu étudier dans nos laboratoires 11 souches de mycobactéries isolées à partir d'ulcères congolais. Nous les avons comparées à 3 souches australiennes de *M. ulcerans* et à la seule souche de *M. ulcerans* isolée sur le continent américain.

Les résultats font l'objet de ce travail.

I. *Origine des souches*

A. *Souches de référence de M. ulcerans*

N° 60: Souche Edwards, reçue de l'Institut Pasteur de Lille, originaire de Fenner, Canberra, Australie.

---

\* Institut de Médecine tropicale Prince Leopold, Anvers, Laboratoire de bactériologie.

\*\* Département de bactériologie, Université Lovanium, Léopoldville.

N° 205: Souche RT de F. Fenner, Australian National University, Canberra.

N° 206: Souche RS de F. Fenner, Australian National University, Canberra.

N° 245: Souche mexicaine décrite par Pedro Lavallo AGUILAR (1953) et qui nous fut envoyée par W.B. SCHAEFFER, Denver, Co. U.S.A.

### B. *Souches isolées d'ulcérations observées au Congo.*

N° 151: Il s'agit de la souche antérieurement dénommée *Kakerifu* (JANSSENS e.a., 1959). Elle fut isolée par VAN DEN ABBELE (1962) sur testicule de rat, à partir d'une ulcération située au niveau du genou d'une jeune femme à Bunia. Le raclage de la plaie avait été décontaminé au phosphate trisodique pendant 24 heures avant l'inoculation animale. Toutes les cultures *in vitro* restèrent stériles. Cinq mois plus tard, le testicule infecté fut expédié en liquide de Hanks à l'Institut de Médecine tropicale à Anvers, où la souche fut entretenue pendant deux ans sur rats par passages intrapéritonéaux (I.P.) et sous-cutanés (S.C.) En 6-8 mois il se développa une ascite, pauvre en BAR. En 1960, nous inoculons une plus grande série d'animaux: hamsters et rats par voie I.P., I.T. (intra-testiculaire) et intra-plantaire. En 4 mois, les animaux inoculés dans la plante des pieds développèrent un gonflement local, évoluant vers l'ulcération et plus tard même une amputation .

Les lésions étaient riches en BAR. Les rats inoculés par la voie I.T. développèrent une orchite hypertrophique. Les testicules, prélevés aseptiquement, et extrêmement riches en BAR, furent mis en suspension et servirent à de nouveaux passages et à des cultures *in vitro* sur milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN (L.J.). Après une incubation de 6-8 semaines à 33° C et 10-12 semaines à 37° C, de nombreuses colonies apparurent. Des passages alternés *in vitro* (LOEWENSTEIN-JENSEN) à partir de fragments de biopsies

N° 152: Cette souche fut isolée à plusieurs reprises *in vivo* (rat I.T. et intraplantaire, souris et hamster en intraplantaire) et *in vitro* (LOEWENSTEIN-JENSEN) à partir de fragments de biopsies (après décontamination à la soude à 4 %) provenant d'un ulcère

à BAR décrit antérieurement (JANSSENS e.a., 1963) et situé au niveau du pied d'une femme européenne. La souche fut même isolée *in vitro* à partir de lésions métastatiques au niveau du bras et du genou, apparues au cours de l'évolution ultérieure de l'affection.

Les souches suivantes furent toutes isolées à Léopoldville (F.G. et J.V.).

Les prélèvements provenant tous de lésions ouvertes, furent traités au phosphate trisodique ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) à 23 % pendant 17 à 24 heures, suivi d'une centrifugation et d'une inoculation sur LOEWENSTEIN-JENSEN sans lavage préalable.

Les cultures furent incubées à la température du laboratoire (25° C) ainsi qu'à 30° C et 37° C. Le *tableau I* donne les résultats de ces cultures.

Les cas cliniques dont proviennent les cultures N° 273 et 286 ont été décrits antérieurement (HENNEBERT e.a., 1962).

En outre, les cultures d'un autre cas sont restées négatives après 1 an d'observation.

Tous les ensemencements furent vérifiés au Ziehl et contenaient des dizaines et parfois des centaines de mycobactéries par champ microscopique. La plupart de ces bacilles présentaient toutefois un aspect fortement granuleux.

Vu la discordance existant dans la plupart des cas entre le nombre de germes ensemencés et le nombre de colonies obtenues, lors de l'isolement, nous devons admettre que de très nombreux germes observés sont des formes dégénérées incapables de se multiplier. Nous reviendrons sur ce problème dans la discussion.

En ce qui concerne les résultats en fonction de la température, on constate que, parfois, les primocultures sont positives aux 3 températures (N° 340), parfois à 30° C et 37° C (N° 341, 454, 456, 475), d'autres à 25° C et 30° C (N° 455). Une seule fois la seule culture obtenue le fut à 25° C (N° 286), deux fois à 37° C (N° 273, 498). On peut donc affirmer que c'est la température de 30-32° C qui est la plus favorable pour le premier isolement, mais, étant donné le très grand pourcentage de bacilles acido-résistants non viables contenus dans le produit ensemencé, des résultats discordants sont parfois observés si celui-ci est réparti

TABLEAU I. — Mycobactéries isolées à diverses températures d'incubation à partir d'ulcères à Léopoldville

	Primocultures			Repiquage		
	T° labo.	30° C	37° C	T° labo.	30° C	37° C
N° 273 N.G.	0 6 mo.	0 6 mo.	+ 72 j. 20 colon.	0 6 mo.	+ 15 j.	+ 15 j.
N° 286 E.G.	+ 4 mo.	0 6 mo.	0 6 mo.	+ 13 j. confluent	+ 13 j. confluent	+ 1 colonie
N° 340 M.F.	+ 5,5 mo. 2 col.	+ 2 mo. 50 colon.	+ 5 mo. 1 colon.	+ 10 j. confluent	+ 10 j. confluent	+ 10 j. confluent
N° 341 M.E.	0 12 mo.	54 j. confluent	+ 54 j. confluent	+ 6 sem. rares	+ 10 j. confluent	+ 10 j. confluent
N° 454 K.S.	0 5 mo.	+ 3 mo.	+ 3 mo.	P.F.	+ 12 j. confluent	P.F.
N° 455 K.M.	+ 49 j. 1 colon.	+ 60 j. 1 colon.	0 3 mo.	P.F.	+ 16 j. confluent	P.F.
N° 456 O.A.	0 2 mo.	+ 6 sem. confluent	+ 7 sem. rares	P.F.	+ 14 j. confluent	P.F.
N° 475 B.J.	0 2 mo.	+ 2 mo. confluent	+ 2 mo. confluent			
N° 498 M.A.	0	0	+ 2 mo. rares			

mo. = mois d'observation des cultures.

j. = jours d'observation des cultures.

P.F. = Pas fait.

entre plusieurs températures d'incubation. Les repiquages effectués massivement à l'anse de platine, par contre furent positifs aux trois températures lorsque celles-ci furent essayées.

Un dernier point qui mérite considération est la grande variabilité du temps d'incubation nécessaire pour la primoculture. Si,

en général, on peut dire que la plus grande partie des souches se développent en l'espace de 6 semaines à 3 mois, certaines peuvent se développer plus tard encore (N° 286,4 mois). Personnellement, nous gardons les cultures pendant un an avant de les éliminer.

## II. Morphologie

*In vitro*, toutes ces bactéries se présentent comme des bâtonnets de 3-4 u de long et 0,5 u de large. Ils sont le plus souvent droits à extrémités arrondies, parfois légèrement incurvés. On trouve parfois dans les jeunes cultures faites à partir des lésions cliniques un grain métachromatique plus large que le germe et situé à n'importe quel endroit de sa longueur. Ces grains font le plus souvent défaut dans les subcultures. Des ramifications ne furent jamais observées. Les germes sont acido-résistants et ne sont pas décolorés par l'acide chlorhydrique à 3 % et l'acide sulfurique à 25 %. Dans les lésions cliniques ou expérimentales, les germes sont en général plus longs, jusque 7 à 8 u et les grains métachromatiques sont plus fréquents, jusque dans 30 % des germes.

## III. Caractères cultureux et physiologiques

- Gélose nutritive: pas de développement.
- Gélose glycinée: pas de développement.
- Bouillon de viande: pas de développement.

— LOEWENSTEIN-JENSEN: bon développement. Les colonies sont eugoniques, rough, et ressemblent à celles des bacilles tuberculeux humains. Elles ont un diamètre de 2 à 5 mm à bords irréguliers, la surface est plissée et il s'y développe souvent un bouton central surélevé de 1 mm au-dessus de la colonie. La couleur est gris-blanc au départ, mais il se développe une teinte jaunâtre à jaune en vieillissant.

Quand les cultures sont conservées pendant plusieurs mois à la température de laboratoire, le centre des colonies isolées

devient gris. Il est possible que ce phénomène dépende dans une certaine mesure de la dessiccation du milieu.

Une souche, n° 475, qui fut isolée parallèlement à 30° C et 37° C donna des colonies blanches à 30° C et jaunes à 37° C. Les observations des repiquages croisés à ces diverses températures ont montré que le développement du pigment dépend de la température d'incubation: des cultures qui s'étaient développées à 30° C en donnant des colonies blanches se pigmentent en jaune en 8 jours lorsqu'elles sont mises à 37° C. Les incubations à 33° C fournissent également des colonies jaunes. Ni la lumière, ni l'aération n'influencent le développement du pigment.

— Milieu de DUBOS solide: peu ou pas de développement.

— Milieu de DUBOS liquide: pas de développement.

— Milieu de SULA: développement dans le fond des tubes.

— Milieu de PROSKAUER-BECK à 0,25 % de gélose, ensemencement en piqure: pas de développement.

— Dépendance vis-à-vis de l'oxygène: comme tant d'espèces de mycobactéries ces cultures sont aérophiles. Les cultures sur milieux solides sont favorisées si les bouchons sont ouverts de temps à autre. On n'obtient pas de développement à partir des ensemencements en piqure des milieux semi-solides (KNOX, 1955).

— Développement sur milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN en présence de 10 % de CO<sub>2</sub> à 33° C: aussi bien qu'en présence d'air.

— Formation de cordes: positive, c'est dans le milieu de SULA que nous avons observé les plus belles images de cordes.

— Temps de génération: il est généralement admis que *M. ulcerans* ne se développe pas ou très peu à 37° C. Or, beaucoup de souches congolaises furent isolées à 37° C, et tous les repiquages se développèrent à cette température. Afin d'obtenir des données précises à ce sujet, nous avons déterminé pour 3 souches congolaises et 2 souches de référence, le temps de génération à 33° C et 37° C. En outre pour la souche 245, nous avons déterminé le temps de génération après passage continu à 37° C pendant un an (15 repiquages au total).

La technique suivie fut celle de YOUMANS (1949), mais en utilisant le milieu selon SULA contenant 5 % de sérum de veau. Deux tubes par dilution furent ensemencés. Les résultats figurent au tableau II. A 33° C des résultats nets furent observés. A 37° C par contre, aucune souche ne se développa dans les dilutions au-delà de 10<sup>-1</sup> mg/ml, ni dans le milieu selon SULA, ni sur milieu selon LOEWENSTEIN-JENSEN.

Il est assez intéressant de constater que les souches ayant été passées pendant un an à 37° exclusivement n'ont pas changé de comportement à diverses températures.

TABLEAU II. — Temps de génération de diverses souches de *M. ulcerans*.

	33° C	37° C
Souches de référence: n° 205:	48 h	0
n° 245:	29 h	0
Souches congolaises n° 152:	29 h	0
n° 341:	36 h	0
N° 245 après 15 passages à 37° C:	40 h	0
N° 152 après 15 passages à 37° C:	P.F.	0

Détermination en milieu de SULA à 5 % de serum de veau.

P.F. = pas fait.

0 = pas de résultat, voir texte.

Lorsque les ensemencements sont faits de façon massive, ce qui est le cas en utilisant l'anse de platine, on ne peut donc juger du comportement des germes à diverses températures. Pour déterminer les caractéristiques précises, il est indispensable d'ensemencer des suspensions diluées.

— Production de niacine: négative (recherches faites au cyanogènebromure après extraction à l'eau).

— Réduction du nitrate de soude: négative.

— Résistance à 1 mcg d'INH: résistant.

— Production de catalase: positive.

— Acylamidases: les acylamidases furent recherchées selon la technique décrite par BÖNICKÉ (1960, 1962) avec un seul change-

ment: étant donné la difficulté d'obtenir pour ces souches 100 mg de germes, nous avons réduit tous les volumes des réactifs utilisés au dixième et effectué la réaction dans des tubes de 10 × 65 mm.

Des études comparatives avec d'autres mycobactéries ont montré que ce changement de technique n'influence pas les résultats. Outre les amidases pour les dix amides proposés par BÖNICKE (1960, 1962), nous avons également recherché l'activité vis-à-vis de la formamide. Le temps de contact fut de 24 heures.

Aucune souche étudiée, ni congolaise ni de référence ne montra une activité amidasique.

— Sensibilité aux tuberculostatiques: elle fut recherchée sur milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN, ce dernier étant imprégné des tuberculostatiques après coagulation.

Le tableau III donne les résultats.

TABLEAU III. — Sensibilité aux tuberculostatiques de diverses souches congolaises et de référence de *M. ulcerans*.

Souches	60	205	206	245	151	152	273	286	340	341	454	455	456
INH 1 γ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SM 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAS 10	0	0	0	0	+	+	+	+	0		+	+	+
50	0	0	0	0	+	+	+	+	0		+	+	+
Cyclo 5	0	0		0	+	0	0	0	0		+	+	+
20	0	0		0	0	0	0	0	0		+	0	0
Vio 5	+	+		+	0	0	+	0	0		+	+	+
20	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
50	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
Etion 4					+	+			0		+	+	+
10	+				+	+			0		+	+	+
20					+	+			0		+	+	+

Les souches sont sensibles à la streptomycine, la cyclosérine et la viomycine; par contre, elles sont résistantes à l'INH et à l'éthionamide. Le PAS donne des résultats variables.

— Conservation. Toutes les souches conservées à la température du laboratoire dans des tubes fermés à bouchons de caoutchouc et à l'abri de la lumière, restèrent viables pendant au moins 6 mois. Nous avons également recherché leur conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$  (germes ayant poussé sur milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN et récoltés dans du milieu de DUBOS liquide). Après un an dans ces circonstances, toutes les souches, sauf une, purent être récupérées.

Nous avons recherché pour la souche 152 la survie dans une solution de tampon phosphate pH 7.2 comparativement à  $-25^{\circ}\text{C}$  et  $37^{\circ}\text{C}$ . Une suspension de germes fut répartie en petits flacons qui furent conservés aux 3 températures. Tous les 15 jours pendant 6 semaines, le nombre de germes vivants fut déterminé par ensemencement de dilutions sur milieu de LOEWENSTEIN-JENSEN, incubés à  $33^{\circ}\text{C}$ .

Le tableau IV donne les résultats.

TABLEAU IV. — Survie d'une souche de *M. ulcerans* en tampon phosphate pH 7.2 à diverses températures (souche 152).

Au départ 4.10 <sup>5</sup> germes/ml	Nombre de germes après conservation à		
	4° C	37° C	- 25° C
2 semaines	1.6 10 <sup>5</sup>	8.10 <sup>3</sup>	4.10 <sup>5</sup>
4 semaines	8.10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
6 semaines	2.10 <sup>3</sup>	0	4.10 <sup>4</sup>

Nous constatons donc que la conservation en tampon phosphate à  $-25^{\circ}\text{C}$  est la meilleure du point de vue de la durée de survie. A  $37^{\circ}\text{C}$ , tous les germes meurent endéans les 6 semaines.

— Action de la soude à 4 %. Celle-ci fut étudiée dans le but de chercher une explication éventuelle aux nombreux échecs anté-

rieurs d'essais de culture de ces germes à partir des lésions humaines. En effet, il se pourrait que la soude soit trop toxique pour ces mycobactéries. Rappelons que dans l'étude présente la plupart des désinfections d'échantillons furent faits à l'aide du phosphate, alors qu'antérieurement la plupart des chercheurs avaient utilisé la soude.

Une suspension de germes provenant d'un testicule de rat inoculé par voie intra-testiculaire fut donc divisée en deux parties. Une servit de contrôle, l'autre fut soumise au traitement classique de décontamination à la soude à 4 %. Des dilutions logarithmiques des deux suspensions servirent à ensemercer des tubes de LOEWENSTEIN-JENSEN et incubés à 33° C. La même expérience fut faite avec une suspension de germes provenant d'une culture *in vitro*, afin de vérifier l'influence éventuelle de la présence de tissu vivant. Le *tableau V* donne les résultats obtenus.

L'expérience montre le fait bien connu que ces germes sont sensibles à l'action de la soude, mais pas au point de rendre toutes les cultures négatives. En fait, le résultat dépendra du nombre de germes présents dans l'échantillon traité.

TABLEAU V. — Titration parallèle d'une suspension de la souche 151 provenant d'un testicule de rat et d'une culture *in vitro* avec et sans traitement à la soude à 4 %.

Suspension de testicule de rat	pas de traitement	traité NaOH 4 %
pure	14/14*	14/14
10 <sup>1</sup>	23/30	30/43
10 <sup>2</sup>	30/43	43/—
10 <sup>3</sup>	43/43	—/—
<i>Culture in vitro</i>		
pure	30/30	43/43
10 <sup>1</sup>	43/43	—/—
10 <sup>2</sup>	43/50	—/—
10 <sup>3</sup>	—/—	—/—

\* Les chiffres donnent les temps d'incubation des cultures en jours. Chaque détermination fut faite en double.

#### IV. Expériences sur animaux

Nous avons inoculé des souris, des rats, des hamsters, des poules et des cobayes.

##### A. Souris

Toutes les inoculations furent faites avec des suspensions de 1 mg/ml dont on inoculait:

- Voie plantaire: 0,03 ml
- Queue: 0,03 ml
- intraveineux (I.V.) 0,20 ml
- intrapéritonéal (I.P.): 0,20 ml

##### *Inoculation plantaire*

Toutes les souches sans exception, produisent par cette voie, en trois à six semaines: de la rougeur et du gonflement, suivis d'ulcération et éventuellement d'amputation. Parfois il s'y ajoute un œdème sous-cutané s'étendant dans la région inguinale et jusqu'au niveau de l'abdomen. Souvent on trouve des métastases de l'infection dans l'autre patte et plus fréquemment encore dans les testicules. Les lésions sont très riches en bacilles longs et minces et souvent munis de leur grain non acido-résistant.

L'évolution de l'infection fut suivie d'une façon quantitative chez la souche n° 152. La numération des germes fut effectuée comme dans l'étude de l'infection expérimentale avec *m. leprae*, décrite par SHEPARD (1960). Deux séries de souris furent injectées par voie plantaire avec respectivement  $1.2 \cdot 10^5$  et  $1.2 \cdot 10^4$  germes.

Le *tableau VI* fournit les résultats quantitatifs obtenus dans cette expérience.

Pendant les premières semaines après l'infection, le nombre de bacilles diminue dans la plante des pieds pour descendre en dessous du niveau de sensibilité de la technique de numération ( $10^3$  germes par ml). Cette phase « négative » dure environ 40 jours et est suivie d'une période de croissance des germes. A partir du 60<sup>e</sup>-75<sup>e</sup> jour des signes pathologiques apparaissent. On con-

Tableau VI. — Evolution de l'infection dans la patte de souris avec la souche 152.

Temps	Nombre de germes injectés	
	1.2 10 <sub>3</sub>	1.2 10 <sub>4</sub>
	Nombre de germes comptés	
14 j.	6.10 <sup>4</sup>	0
26 j.	+	0
40 j.	1.4 10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>4</sup>
46 j.	1.3 10 <sup>5</sup>	1.4 10 <sup>4</sup>
53 j.	1.6 10 <sup>5</sup>	+
59 j.	8.10 <sup>4</sup> *	
67 j.	6.4 10 <sup>5</sup> *	
75 j.		4.10 <sup>5</sup> *
97 j.		1.2 10 <sup>6</sup> *

\* Symptômes cliniques.

state qu'à certains moments de l'évolution le nombre de bacilles diminue parfois. On peut se demander si chez certains animaux les bacilles ne sont pas, de temps à autre, évacués partiellement des lésions, avec ensuite une nouvelle multiplication, à l'endroit de l'inoculation.

A l'examen histopathologique, on trouve des paquets de BAR dans les macrophages situés dans une zone d'œdème et de nécrose du derme s'étendant depuis l'épiderme jusqu'au quellette.

### Queue

L'inoculation sous-cutanée dans la queue donne les mêmes symptômes que dans la patte. Souvent des lésions métastatiques se développent dans les pattes et les testicules.

### I.V.

En 8-12 semaines après l'inoculation I.V. on peut observer soit des lésions au niveau des pattes, de la queue, des testicules, du museau même, soit de l'ascite soit de l'œdème sous-cutané.

Les lésions périphériques sont identiques à celles apparaissant après inoculation directe dans la patte. L'œdème sous-cutané

éventuel donne aux souris leur aspect gonflé caractéristique, en boule, décrit par les auteurs australiens (McCALLUM e.a., 1948).

Les coupes histologiques des pattes montrent au début de l'évolution une nécrose du tissu conjonctif du derme sans aucune réaction inflammatoire. Cette nécrose se trouve parfois au contact ou peut entourer des filets nerveux et des vaisseaux sanguins. Ceux-ci sont toujours morphologiquement indemnes. Nous avons vu deux cas où les trois quarts environ de la circonférence d'une patte était le siège d'une telle nécrose.

Dans les coupes faites au même niveau et colorées selon ZIEHL (technique de Fite-Faracco) on trouve exactement dans les zones de nécrose des masses considérables de bacilles acido-résistants.

Dès que l'ulcération apparaît, l'image se complique d'infiltrats leuco-lymphocytaires, en rapport avec l'infection secondaire qui ne tarde pas à s'installer.

Dans les frottis de foie et de rate, on peut trouver parfois quelques rares BAR. Les rétrocultures *in vitro* à partir de suspensions de ces organes ainsi que des reins fournissent quelques rares colonies de mycobactéries. Mais on ne trouve pas de lésions histopathologiques dans ces organes. Seules les poumons montrent des lésions. Déjà macroscopiquement on y observe des zones de consolidation ou de ramollissement. A ces dernières correspondent histologiquement des nécroses de coagulation bien délimitées du tissu pulmonaire au centre desquels il y a une masse considérable de BAR parfois très allongés et disposés en palissades ou en tourbillons le tout en l'absence totale de réaction inflammatoire. Les zones de consolidation correspondent à des follicules de cellules épithéloïdes sans cellules géantes et sans nécrose, contenant des quantités variables de BAR mais de taille plus réduite. Ces lésions sont entourées d'un infiltrat lymphoplasmocytaire, tandis que les alvéoles environnantes contiennent souvent des macrophages.

Ces follicules sont pratiquement toujours situés à côté d'un vaisseau sanguin.

Dans la peau œdémateuse, on trouve le tissu conjonctif du derme nécrosé, en présence de bacilles acido-résistants et l'absence de réaction inflammatoire notable. Cette nécrose peut s'étendre

entre le tissu musculaire sous-jacent aux dépens du tissu conjonctif interstitiel et quelques fibres musculaires superficielles peuvent également subir la nécrose.

*I.P.*

Après des temps d'incubation prolongés, on observe chez quelques animaux, une ascite, parfois il apparaît une lésion périphérique dans un pied ou dans les testicules.

*B. Le rat*

Toutes les inoculations furent également faites avec des suspensions de germes à 1 mg/ml dont furent inoculées:

- Voie plantaire: 0,03 ml            I.P.: 0,50 ml
- intra-veineuse: 0,25 ml        I.T.: 0,10 ml

*Voie plantaire*

Les résultats sont identiques à ceux décrits pour la souris.

*Voie intra-péritonéale*

Après 5-6 mois une ascite, fréquemment hémorragique, s'installe. Le liquide est en général pauvre en BAR. Ceux-ci se trouvent le plus souvent dans le cytoplasme de macrophages.

Nous avons à plusieurs reprises observé un escarre au niveau de l'endroit d'injection. A l'examen histopathologique, on y trouve essentiellement la même image que dans les ulcères humains: une nécrose étendue de l'hypoderme, riche en bacilles acido-résistants. Cette nécrose s'étend également à distance de l'ulcère sous la peau apparemment saine.

*Voie intra-veineuse*

Evolution comme chez la souris.

*Voie intra-testiculaire*

Le testicule de rat fournit un milieu de croissance extrêmement favorable pour ces germes. En effet, après 4 à 6 semaines tout l'organe est transformé en une masse de bacilles acido-résistants et ce procédé d'inoculation produit dès le primo-isolement une grande quantité de germes. En outre, l'organe peut être

prélevé aseptiquement et donc ensemencé sur milieux de culture sans désinfection préalable, ce qui augmente les chances de succès des cultures. Nous avons vu apparaître chez les rats une orchite soit hypertrophique, soit atrophique. Nous avons constaté que la différence d'évolution était en rapport avec l'âge de l'animal. En effet, l'inoculation intra-testiculaire chez des animaux adultes dont les testicules sont le plus souvent localisés dans le scrotum y provoque l'apparition d'une orchite hypertrophique au point qu'il devient impossible de réduire le testicule dans l'abdomen. L'inoculation d'animaux plus jeunes dont les testicules sont fréquemment situés en position intra-abdominale, donne lieu à une orchite atrophique.

Cette observation a été confirmée par l'expérience suivante: chacune des deux souches n<sup>os</sup> 151 et 152, fut inoculée par voie intra-testiculaire à une série d'animaux jeunes et d'animaux plus âgés.

Hebdomadairement, un animal de chaque série fut tué, une tranche de testicule fixée pour examen histopathologique et le reste de l'organe mis en suspension et inoculé en dilutions sur milieu de LOEWENSTEIN afin de déterminer le nombre de germes viables. Le *tableau VII* fournit les résultats de cette expérience.

On observe comme dans la patte de souris d'abord une diminution de germes. Les lésions histologiques apparaissent déjà après trois semaines, avant qu'il n'y ait une augmentation considérable du nombre de germes, et ce pratiquement en même temps chez les jeunes animaux et chez les plus âgés. Le maximum de la multiplication bactérienne est atteint vers la cinquième-sixième semaine. Mais tandis que chez les animaux âgés se développe l'orchite hypertrophique, on ne constate pas de signes cliniques chez les jeunes animaux. Cette différence dans l'évolution peut être très importante pour les primo-isolements de souches sur animaux. En effet, pour autant que l'on injecte des rats assez jeunes on pourrait attendre sans succès l'apparition d'une orchite cliniquement visible, et sacrifier les animaux à un moment où le nombre de germes viables va de nouveau en diminuant.

L'image histologique de l'orchite est extrêmement caractéristique, au début on observe dans le tissu interstitiel une inflammation granulomateuse assez discrète, localisée: quelques folli-

TABLEAU VII. — Evolution de l'infection après injection I.T.  
des souches 151 et 152 à de vieux et jeunes rats.

	Vieux rats				Jeunes rats.		
	nombre semaines après inoc.	Titration suspension testiculaire	Aspect clinique	Examen histopath.	Titration suspension testiculaire	Aspect clinique	Examen histopath.
Souche 152 <i>inoculum</i> > 10 <sup>3</sup>	1	10 <sup>2</sup>	—		10 <sup>2</sup>	—	
	2	10 <sup>2</sup>	—		10 <sup>1</sup>	—	
	3	10 <sup>1</sup>	—	lésions localisées	10 <sup>1</sup>	—	
	4	10 <sup>1</sup>	—	nécrose partielle	10 <sup>3</sup>	—	nécrose partielle
	5	10 <sup>5</sup>	—	nécrose totale	10 <sup>3</sup>	—	nécrose totale
	6	10 <sup>4</sup>	orchite hypertroph.	<i>idem</i>	10 <sup>3</sup>	—	<i>idem</i>
	7	10 <sup>4</sup>	<i>idem</i>	<i>idem</i>	—	—	—
Souche 151 <i>inoculum</i> = 10 <sup>3</sup>	1	10 <sup>3</sup>	—		10 <sup>2</sup>	—	
	2	10 <sup>3</sup>	—		10 <sup>3</sup>	—	
	3	—	—	lésions minimales	10 <sup>3</sup>	—	nécrose localisée
	4	10 <sup>2</sup>	—	lésions localisées	10 <sup>3</sup>	—	nécrose étendue
	5	10 <sup>3</sup>	—	nécrose sub-totale	10 <sup>3</sup>	—	nécrose totale
	6	—	—	rouge induré nécrose totale	10 <sup>3</sup>	—	<i>idem</i>
	7	10 <sup>3</sup>	Orchite hypertroph.	<i>idem</i>	10 <sup>3</sup>	—	<i>idem</i>
	8	> 10 <sup>4</sup>	<i>idem</i>	<i>idem</i>	10 <sup>1</sup>	—	<i>idem</i>

cules se forment à nouveau composés uniquement de cellules épithéloïdes et de lymphocytes; pas de cellules géantes, pas de caséose: On y trouve des bacilles acido-résistants. Puis la nécrose de coagulation apparaît, atteignant d'abord le voisinage immédiat de la lésion initiale, elle s'étend très rapidement à tout l'organe, la structure générale de celui-ci peut encore être reconnu mais le tout se laisse difficilement colorer. A la coloration de ZIEHL, on trouve des bacilles acido-résistants presque exclusivement dans les espaces intertubulaires.

Il s'agit là d'une image histologique typique pour *M. ulcerans*. Nous avons inoculé toute une série d'espèces de mycobactéries dans des testicules de rats: celle-ci donne lieu soit à une inflammation granulomateuse localisée ou envahissant tout l'organe, soit à un abcès, d'autres encore n'y prolifèrent pas.

Les espèces ou variétés essayées furent: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.avium*, *M.kansasii*, *M.phlei*, *M.fortuitum (minetti)* *M.smegmatis* et une mycobactérie scotochromogène, ainsi qu'une non chromogène (groupes II et III selon RUNYON).

#### C. Hamster

Nous avons injecté des hamsters uniquement dans la patte. L'évolution est identique à celle constatée chez la souris et chez le rat.

#### D. Cobaye

L'infection chez cet animal avorte.

#### E. Poule

Les souches 151, 152, 205, 245, 340 et 456 furent inoculées par voie intra-veineuse à la dose de 1 mg dans 1 ml d'eau physiologique à la poule. Même après deux mois d'observation on ne constatait ni symptômes cliniques, ni lésions macroscopiques, ni microscopiques à l'autopsie des animaux.

## V. DISCUSSION

Les souches congolaises étudiées ici et isolées à partir d'ulcères à bacilles acido-résistants sont donc entièrement identiques aux souches de *M.ulcerans* décrites par les auteurs australiens, McCALLUM e.a. (1948), LEACH e.a. (1954) et FENNER (1956) et doivent être considérées comme telles.

Pour autant que nous puissions juger sur les documents antérieurs (JANSENS e.a. 1959; VANDEN ABBEELE 1962, et l'expérience personnelle de F.G. et S.P.) les souches isolées antérieurement au Maniema, à Kasongo, sont également identiques. Une seule souche congolaise montre la particularité de fournir des colonies pigmentées jaunes à 37° C.

Les résultats des réactions amidasiques avec nos souches de *M.ulcerans* sont donc différents de ceux décrits par BÖNICKÉ (1962) qui n'a toutefois examiné qu'une seule souche. Aussi ne pouvons-nous suivre cet auteur dans sa proposition d'inclure *M.ulcerans* dans le groupe de *M.avium* sous le nom de *M.avium var.cutis*. Nous croyons après cette étude que l'espèce *M.ulcerans* est suffisamment différenciée de toutes les autres mycobactéries pour qu'elle soit maintenue. Nous avons inoculé six souches de *M.avium* dans la patte et la queue de souris, il y apparaît parfois une rougeur et une tuméfaction passagères sans toutefois mener à l'ulcération. Dans le testicule de rat, ces germes donnent lieu à une inflammation granulomateuse sans nécrose, si typique pour *M.ulcerans*.

L'identification de *M.ulcerans* est facile. En effet, les caractères cultureux sont très typiques et l'identification sera facilement confirmée par l'inoculation intra-plantaire à la souris et/ou le rat et le hamster et par l'inoculation intra-testiculaire chez le rat.

Comme des coupes histologiques sont techniquement plus difficiles à réaliser à partir de pattes de souris qu'à partir de testicules de rats, c'est surtout cette dernière voie qui pourra illustrer le caractère unique de la lésion expérimentale.

Il ne faudra surtout pas commettre l'erreur de considérer comme *M.ulcerans* des mycobactéries isolées à partir de lésions de la peau sans les avoir soumis à un examen attentif et quelque peu

complet. On peut, en effet, isoler à partir de lésions de la peau, outre *m.ulcerans*: *m.scrofulaceum*, *m.balnei*, *m.avium*, des souches non chromogènes et *m.fortuitum*. Surtout les abcès dus à *m.fortuitum* sont devenus particulièrement fréquents ces derniers temps en Afrique centrale.

Si l'identification de *m.ulcerans* ne pose donc pas de problème majeur, il en va tout autrement pour son isolement.

En effet, de nombreux essais antérieurs de culture ont échoué (JANSSENS e.a. 1958, VAN OYE 1950, PATTYN 1960, VANDEN ABBELE 1962).

Dans la série actuelle aussi il y eut souvent des difficultés. La souche 151 fut obtenue *in vitro* après avoir été entretenue pendant deux ans sur rats. La culture fut positive lorsque des broyats de testicules infectés, extrêmement riches en bacilles acido-résistants furent ensemencés. L'examen du *tableau I* montre que la température d'incubation lors du primo-isolement n'est pas un facteur critique. En effet, lorsque la culture est confluyente à 33° C, elle l'est le plus souvent également à 37° C (souches n<sup>os</sup> 341, 456 et 475) et dans les mêmes délais d'incubation. Mais ce qui frappe dans le *tableau I* est que dans la majorité des cas, malgré la mise en culture de suspensions extrêmement riches en bacilles (des dizaines à des centaines de germes par champ microscopique) il apparaît sur les milieux de culture un nombre parfois fort limité de colonies et, ce, parfois après des temps d'incubation très prolongés, tandis que certains ensemencements ne donnent aucun développement.

Deux hypothèses sont possibles devant ces faits:

— Ou bien il y a dans les lésions deux espèces de mycobactéries: l'une cultivable, l'autre non cultivable;

— Ou bien dans la plupart des échantillons la majorité des germes observés sont des formes dégénérées non viables.

Sans pouvoir exclure entièrement la première hypothèse, il nous semble que la seconde mérite toute notre attention.

En effet ces germes une fois obtenus *in vitro*, même s'ils ont un temps de génération très long peuvent être assez rapidement repiqués à condition de faire ces repiquages massivement. Nous avons également remarqué que dans la plupart des produits en-

semencés, les germes étaient dans une très grande proportion fortement granuleux et ce, en opposition avec les germes provenant des cultures.

Or, les observations et études récentes faites chez *m.leprae-murium* et *m.leprae* (REES e.a. 1960, SHEPARD 1962, VALENTINE 1962, WATERS e.a. 1962, PATTYN en préparation) ont montré que les formes granuleuses de ces mycobactéries sont des germes dégénérés incapables de se multiplier. Nos constatations en rapport avec *m.ulcerans* au Congo semblent donc s'aligner sur celles faites avec d'autres mycobactéries à temps de génération prolongé.

Dans le même ordre d'idées un deuxième facteur pourrait encore jouer. En effet, le *tableau 1* montre également que du point de vue bactériologique il y a nettement deux formes de la maladie. Une première dans laquelle les cultures sont assez facilement obtenues, en tout cas assez abondantes (n<sup>os</sup> 341, 456 et 475) où une grande partie des germes serait encore vivante. Dans la seconde forme (n<sup>os</sup> 273, 286, 340 et 455) le rendement des cultures à l'isolement fut très réduit. Nous pouvons admettre que la majorité des germes qui sont observés sont des formes incapables de se multiplier. Pour réussir la culture il faut donc non seulement ensemercer des suspensions très riches en bacilles, mais probablement est-il encore nécessaire de faire cette culture à un moment favorable de l'évolution clinique.

Nous avons songé, à un moment donné, que les procédés de décontamination pouvaient être la cause des échecs antérieurs de culture. Mais les observations faites avec la souche 151 — pour autant qu'elles soient valables pour les autres souches — montrent que ces germes ne sont pas plus sensibles à l'action de la soude à 4 % que les autres mycobactéries. Il est évident que si un prélèvement ne contient déjà qu'un nombre réduit de germes viables, la décontamination ne fera que réduire encore les chances de succès des cultures.

La présence dans les lésions de germes dont une grande partie est incapable de se multiplier peut également expliquer les échecs des traitements médicamenteux. Antérieurement (HENNEBERT e.a., 1962) nous avons admis pour expliquer cet échec qu'un facteur anatomique devait être invoqué: la lésion étant caracté-

risée par une nécrose étendue, nous supposons que les médicaments ne pouvaient y atteindre les germes. Sans vouloir enlever toute signification à cette idée il nous semble maintenant que c'est la présence de germes morts qui joue le rôle le plus important. En effet, comme l'ont montré les expériences de LEACH e.a. (1954), de FELDMAN e.a. (1957) et de PATTYN e.a. (1964), il y a parfaitement moyen de prévenir l'apparition de lésions cliniques expérimentales chez la souris à l'aide de médications actives *in vitro*. La différence entre les deux situations est que l'animal d'expérience est infecté avec des germes provenant de cultures jeunes, donc en grande partie vivants et sur lesquels les médicaments peuvent agir.

Il faudra donc introduire la notion de l'existence de lésions cliniques dues à la présence de germes morts. Par ailleurs, on peut se demander quels sont les mécanismes précis déterminant l'équilibre entre l'hôte et le parasite dans cette affection.

Il est certain qu'au début de l'affection les germes sont vivants. Ceci a été démontré dans le cas décrit antérieurement (JANSSENS e.a., 1963) où à partir des lésions métastatiques fraîches ou de récidives, les germes furent promptement isolés.

A d'autres moments de l'évolution de l'affection, la plus grande partie des germes meurt et leur isolement devient par contre difficile. JANSSENS e.a. (1959) ont déjà fait remarquer que la nécrose brutale qui survient au cours de l'infection à *m.ulcerans* peut être difficilement interprétée comme le résultat d'une action progressive des germes. Ils ont formulé deux hypothèses de mécanismes allergiques. Sans pouvoir nous prononcer sur celles-ci, il est néanmoins fort probable que dans la physiopathologie des ulcères nécrotiques les germes morts jouent un rôle important.

Nous voulons terminer en revenant sur le sujet de la relation de cause à effet entre *m.ulcerans* et les lésions cliniques, étant donné la flore bactérienne associée extrêmement riche parmi laquelle il y a des *staphylocoques* et *streptocoques* hémolytiques, des *Escherichia coli*, *Proteus*, bacilles pyocyaniques, corynebactéries, etc.

Trois arguments sont valables:

1. Ces ulcérations constituent une entité clinico-pathologique (PATTYN 1961, JANSSENS e.a. 1958, 1959, 1963) dans laquelle la seule constante est la présence de bacilles acido-résistants, qui sont tous pour autant qu'ils aient été étudiés *m.ulcerans*.

2. Le groupe de travail à Kasongo (JANSSENS e.a. 1958, 1959) a observé à plusieurs reprises des lésions fermées tels des phlegmons dans lesquels les seuls germes observés furent les bacilles acido-résistants, et qui en culture s'avérèrent également être *m.ulcerans*.

3. La malade dont la souche n° 152 fut isolée et dont l'histoire clinique fut publiée antérieurement (JANSSENS e.a., 1963) développa à un moment donné de l'évolution des métastases sous-cutanées qui purent être excisées avant toute ulcération. Leurs cultures furent positives pour *m.ulcerans*, les images histologiques furent d'autre part typiques des lésions dues à ces germes.

Nous pouvons donc conclure que *m.ulcerans* est l'agent étiologique de ces ulcères tropicaux nécrotiques à bacilles acido-résistants observés au Congo, quoique les mécanismes de leur physiopathologie nous échappent.

## RESUME

Le travail concerne l'étude bactériologique de 11 souches de mycobactéries isolées à partir d'ulcères nécrotiques observés au Congo (Léopoldville).

Les souches ont été identifiées comme *m.ulcerans* (McCALLUM e.a., 1948).

Il fut constaté que dans la plupart des lésions humaines un très grand nombre de germes sont non viables et ne se développent pas en culture *in vitro*. Ce phénomène peut expliquer les nombreux échecs antérieurs de culture *in vitro* de bacilles acido-résistants observés dans des ulcères nécrotiques. En outre, il est possible que ces germes morts soient également responsables de certains phénomènes cliniques, et des difficultés du traitement médical de l'affection.

## SAMENVATTING

Bakteriologische studie van 11 stammen mycobacteriën gekweekt uit necrotische tropenzweren in Congo (Leopoldstad).

De stammen konden alle worden geïdentificeerd als *m.ulcerans* (McCALLUM e.a., 1948).

Vastgesteld werd dat een belangrijk gedeelte der kiemen in de klinische letsels afgestorven zijn. Dit kan dan de reden zijn waarom zoveel vroegere pogingen om deze kiemen *in vitro* te kweken mislukten. Deze dode kiemen zijn waarschijnlijk eveneens verantwoordelijk voor sommige klinische symptomen der aandoening.

## SUMMARY

Bacteriologic study of 11 mycobacterial strains isolated from necrotic tropical ulcers originating in the Congo (Leopoldville).

The strains were identified as *m.ulcerans* (McCALLUM e.a., 1948).

An important proportion of the bacilli observed in the clinical lesions are non viable. This is probably the reason why so often in the past culture of these bacilli were unsuccessful. The dead bacilli are probably responsible for part of the clinical symptoms, and also for the difficulties in the medical treatment of the disease.

## BIBLIOGRAPHIE

- BONICKE, R.: Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien, IV (Mitteilung Zbl. Bakter. I., 1960, Orig. 179, 209).
- : Der zeitiger Stand der Verfahren zur routinemässigen Differenzierung der verschiedenen Mycobacterien-Arten (Ann. Soc. belge Méd. trop., 1962, 42, 403-439).
- FELDMAN, W.H., KARLSON, A.G.: 1957 - *M. ulcerans* infections. Response to Chemotherapy in mice (Am. Rev. Tub. 75, 266-269).
- FENNER, F.: The pathogenic behaviour of *M. ulcerans* and *M. balnei* in the mouse and developing chick embryo (Am. Rev. Tuberc. Resp. Dis., 1956, 713, 650-673).
- HENNEBERT, P.-M., GATTI, F., VAN DE PITTE, J. et PATTYN, S.-R.: Deux cas d'ulcère nécrotique à B.A.R. observés à Léopoldville (Ann. Soc. belge Méd. trop., 1962, 42, 549-554).

- JANSSENS, P.-G., QUERTINMONT, M.-J., SIENAWSKI, J. et GATTI, F.:  
Necrotische tropenzweer en nieuwe mycobacteriële verwekkers  
(Verh. Kon. Vl. Akad. Geneesk. België, 1958, 20, 420-439).
- , —, —, —: Necrotic tropical ulcers and mycobacterial causative  
agents (Trop. Geogr. Med., 1959, 11, 293-312).
- JANSSENS, P.-G., PATTYN S.-R., BOVEROULLE, M.-T., QUERTINMONT, J.  
et DE MUYNCK, A.: Un ulcère nécrotique originaire du Bas-  
Katanga (Ann. Soc. belge Méd. trop., 1963, 33, 729-737).
- KNOX, R.: Semisolid agar media for rapid culture of tubercle bacilli  
(Lancet, 1955, II, 110-112).
- LAVALE ANGILAR, P., MARQUEZ STURRIBARRIA, F. et MIDDEBROOK, G.:  
Un caso de infección humana per *Mycobacterium ulcerans* en el  
hemisferio occidental (Int. J. Leprosy, 1953, 22, 469-476).
- LEACH, R.H. and FENNER, F.: Studies on *M. ulcerans* and *balnei* (Austr.  
J. exp. Biol. Med. Sci., 1954, 32, 832-852).
- MACCALLUM, P., TOLHURST, J.C., BUCKLE, G. and SISSIONS, H.A.:  
A new mycobacterial infection in man (J. Path. Bact., 1948,  
60, 93).
- PATTYN, S.-R.: Ulcères à bacilles acido-résistants. Revue de la question  
à propos d'un cas diagnostiqué à Elisabethville (Ann. Soc. belge  
Méd. trop., 1961, 41, 145-152).
- et JANSSENS, P.-G.: Observations on mouse foot-pad inoculations  
with leprosy bacilli originating from Congo (En préparation).
- et ROYACKERS, J.: Traitement de l'infection expérimentale de la  
souris par *M. ulcerans* et *M. balnei* (Ann. Soc. belge Méd. trop.  
[sous presse], 1964).
- REES, R.J.W., VALENTINE, R.C. and WONG, P.C.: Application of  
quantitative electron microscopy to the study of *Mycobacterium*  
*lepraemurium* and *leprae* (J. Gen. Microb., 1960, 22, 443-457).
- SHEPARD, C.C.: The experimental disease that follows the injection  
of human leprosy bacilli into the foot pads of mice (J. Exp.  
Med., 1960, 112, 445-454).
- VANDEN ABEELE, M.: Etude bactériologique de mycobactéries isolées  
au Congo et au Rwanda-Burundi (Ann. Soc. belge Méd. trop.,  
1962, 42, 541-548).
- VALENTINE, R.C.: Quantitative electron microscopy of leprosy bacilli  
(Brit. Med. Bull., 1962, 18, 242-244).
- VAN OYE, E. et BAILLON, M.: Faudra-t-il tenir compte d'une nouvelle  
affection à bacilles acido-résistants en Afrique? (Ann. Soc.  
belge Méd. trop., 1950, 30, 619-621).
- WATERS, M.F.R. and REES, R.J.W.: Changes in morphology of *M.*  
*leprae* in patients under treatment (Int. J. Leprosy, 1962, 30,  
266-277).
- YOUMANS, G.P. and YOUMANS, A.S.: A method for the determination  
of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small  
inocula (J. Bact., 1949, 58, 247).