

L'INFECTION « OCCULTE » DANS LES SPIROCHÉTOSES

Par M. BALTAZARD, M. CHAMSA et B. SEYDIAN (*)

Dans une note préliminaire, BURGDORFER et l'un de nous (4) ont montré que l'infection dite « inapparente » ou « invisible » qui se produit chez certains animaux et même chez l'homme avec certaines souches ou espèces de spirochètes récurrents, infection dans laquelle tous nos prédécesseurs avaient reconnu la virulence du sang malgré l'absence de parasites circulants, est en réalité une infection « occulte » à spirochètes d'aspect normal, mais extrêmement rares et décelables seulement par l'examen de gouttes épaisses en série.

BURGDORFER (3) a donné ses propres documents expérimentaux, qui avec ceux que nous apportons ici, doivent, pensons-nous, faire la preuve de l'inexistence de formes invisibles dans ce type d'infection. C'est cette conviction qui nous a fait choisir le terme « occulte » pour remplacer le terme « invisible », qui implique l'infravisibilité ou « inapparente » dont le sens, devenu trop précis, s'attache lui aussi à la circulation d'un virus invisible (**). Le terme « occulte » n'est d'ailleurs pas neuf et a été déjà employé pour ce type d'infection, en particulier par BAUMPT (2).

Nous avons utilisé pour ces expériences celles de nos souches donnant habituellement l'infection occulte chez certaines espèces animales : soit six souches de *B. crocidurae* chez le cobaye adulte et l'homme, une souche de *B. latychevii* chez le rat blanc et l'homme et une souche de *B. persica* chez le mouton ; nous avons également recherché l'infection occulte avec une souche de *B. duttonii* chez l'homme.

La technique employée a consisté, ainsi que nous l'avons dit, à préparer lors de chaque passage de sang d'animaux ou d'hommes ne montrant pas de spirochètes à l'examen au fond noir, des

(*) Séance du 8 décembre 1954.

(**) CH. NICOLLE (7) définissait lui-même en 1928 l'infection inapparente dans les spirochètoses : « ... infections... dans lesquelles la présence de spirochètes visibles n'est accompagnée d'aucun signe clinique, en particulier de fièvre... cas, nombreux également, où, en l'absence à la fois de symptômes et de spirochètes, seule la virulence du sang prouve le passage du virus dans le sang... ». Cependant dans la suite, tous les auteurs et lui-même n'utilisaient plus ce terme que pour les cas sans spirochètes visibles.

gouttes épaisses avant, pendant et après le prélèvement de sang, gouttes qui sont ensuite, dans le cas où le passage se montre positif, examinées méticuleusement. La recherche des spirochètes dans ces gouttes demande en effet une attention et une patience très grandes : chaque goutte doit être examinée non seulement très lentement pour ne pas manquer les formes pelotonnées ou masquées par les noyaux surcolorés des leucocytes, mais encore sur la totalité de sa surface. Cet examen, pour chaque goutte épaisse, ne demandera pas moins d'une demi-heure pour l'observateur le plus entraîné ; il nous est fréquemment arrivé, après avoir prolongé pendant plus d'une heure et même près de deux heures l'examen d'une même goutte en nous relayant au microscope, de la reprendre le lendemain par exemple et d'y découvrir l'unique spirochète qui avait échappé la veille aux parcours répétés de l'objectif.

L'examen d'une seule goutte épaisse, tel qu'il est couramment pratiqué dans les laboratoires, c'est-à-dire en quelques minutes, n'apporte donc guère plus de certitude que l'examen au fond noir, bien qu'il permette d'examiner plus de sang, et c'est pour avoir méconnu l'absolue nécessité de cette longue recherche que nous avions antérieurement conclu à la possibilité de l'existence de formes invisibles. Dans la suite, prévenus par BURGOURNEN, nous avons pu mettre en évidence des spirochètes très rares dans les gouttes épaisses d'expériences semblables à celle que l'un de nous avait rapportée avec HASIBI (1), et que nous présentions comme la meilleure preuve de l'existence possible de formes invisibles.

L'examen d'une seule goutte épaisse, à la condition qu'il soit méticuleux et prolongé permettait donc de détecter des infections extrêmement pauvres : 1 ou 2 spirochètes par goutte épaisse. L'examen de gouttes épaisses en série devait nous aider, au prix d'une perte de temps considérable, à mettre en évidence des infections plus pauvres encore, d'une richesse inférieure par exemple à 1 spirochète pour cinq gouttes. Dans un cas c'est seulement dans la huitième goutte épaisse qu'un seul spirochète pouvait être retrouvé.

Nous pouvions alors établir la preuve de l'inexistence de formes invisibles en recourant à la méthode que nous avons déjà utilisée et qui porte dans nos cahiers d'expériences le nom de « gouttes alternées » (gouttes alternativement inoculées à un animal ou étalées sur lame) mais en poussant cette fois à fond l'examen des gouttes colorées. Nous constatons que pratiquement, chaque fois

que les animaux ayant reçu une goutte s'infectaient tous, toutes les gouttes épaisses contenaient au moins un spirochète.

Voici le détail d'une des six expériences faites :

Cobaye adulte 61/37 inoculé avec 1 cm³ de sang de souris blanche riche en spirochètes (souche *B. crocidura microti* MOXXIII). A montré quelques rares spirochètes à l'examen au fond noir le lendemain de l'inoculation. Au 10^e jour on prélève à ce cobaye 3 cm³ de sang, dont 9 gouttes sont « alternées » comme suit : goutte I : 1 seul spirochète ; goutte II : inoculée à une souris blanche infectée ; goutte III : 2 spirochètes ; goutte IV : souris blanche infectée ; goutte V : 2 spirochètes ; goutte VI : souris infectée ; goutte VII : pas de spirochètes décelables ; goutte VIII : souris infectée ; goutte IX : 1 spirochète.

Par contre chaque fois que le nombre de spirochètes était très bas et que la majorité des gouttes épaisses était négative, parallèlement la majorité des animaux inoculés ne s'infectait pas. Lorsqu'aucun spirochète ne pouvait être retrouvé dans la série des 5 gouttes épaisses, un seul au plus des animaux inoculés avec les gouttes alternées s'infectait.

Voici le détail de deux des six expériences faites :

— Rat 13, inoculé avec 1 cm³ de sang de lapin nouveau-né riche en spirochètes (souche *B. latychevii* KOI). N'a jamais montré de spirochètes au fond noir. Au 10^e jour, on prélève à ce rat 30 gouttes de sang dont 7 gouttes sont « alternées » comme suit : goutte I : pas de spirochètes décelables ; goutte II : inoculée à un lapin nouveau-né, infecté ; goutte III : 1 spirochète ; goutte IV : inoculée à lapin nouveau-né, non infecté ; goutte V : pas de spirochètes décelables ; goutte VI : inoculée à un lapin nouveau-né, infecté ; goutte VII : 1 spirochète.

— Rat 12, inoculé avec 1 cm³ de sang de lapin nouveau-né riche en spirochètes (souche *B. latychevii* KOI). N'a jamais montré de spirochètes au fond noir. Au 10^e jour, on prélève à ce rat 30 gouttes de sang dont 9 gouttes sont « alternées » ; aucun spirochète ne peut être retrouvé dans les 5 gouttes colorées ; des quatre lapins nouveau-nés inoculés avec chacune des 4 autres gouttes, un seul s'infecte.

Ces expériences démontraient clairement l'absence de formes invisibles. Elles prouvaient également, après celles de SCHUMAKER et WILKINSON (8) qu'un seul spirochète suffit à donner l'infection et enfin mettaient en évidence l'extrême rareté des germes dans l'infection occulte.

Cependant, dans six expériences (2 cobayes *B. crocidura microti* au 20^e et 50^e jour de leur infection occulte; 1 cobaye *B. crocidura* au 40^e puis au 45^e jour; 1 mouton *B. persica* au 20^e jour et 1 homme *B. duttonii* au 41^e jour) nous constatons que les examens, même poussés jusqu'à 10 gouttes épaisses (représentant plusieurs journées de travail au microscope) restaient négatifs alors que trois animaux, inoculés en même temps avec chacun 0 cm³ 3 du même sang, s'infectaient tous les trois. D'autre part, dans nos expériences en gouttes épaisses alternées, onze expériences étaient restées négatives (3 à 4 animaux inoculés chacun avec une goutte) alors que l'animal donneur était authentiquement en état d'infection occulte.

Ces constatations nous laissaient à penser que le nombre des spirochètes circulants pouvait être plus bas encore que nous ne le pensions, très au-dessous de nos possibilités-limites d'examen en gouttes épaisses. Une série de mesures nous montrait en effet que la quantité de sang contenue dans le type de gouttes épaisses que nous avons l'habitude de préparer (soit environ 1 cm. de diamètre) ne dépassait pas 0 cm³ 1 pour 15 gouttes.

Nous avons alors tenté de déterminer le nombre de spirochètes circulant dans ces infections occultes par l'inoculation de séries d'animaux détecteurs avec des quantités différentes de sang. CROUXE et CROUXE (7) avaient déjà tenté en 1942 cette détermination dans l'infection visible et dans les périodes dites « négatives » de cette infection. La richesse en spirochètes, relativement très grande, de ce type d'infection même en période négative obligeait ces auteurs à des centrifugations et dilutions, qu'ils signalaient eux-mêmes comme une cause d'erreur importante. Leur travail leur avait cependant permis de conclure dans le sens de l'inexistence de formes invisibles, au moins au moment de l'accès, et d'autre part à la pauvreté de l'infection en période « négative » : « de 10 à 100 éléments spirochètiens dans 1 cm³ ».

L'extrême pauvreté de l'infection « occulte d'emblée » que nous étudions, nous permettait au contraire d'inoculer directement le sang de l'animal donneur aux animaux détecteurs. Beaucoup de ces expériences sont sans signification, toute la série d'animaux détecteurs s'étant infectée, depuis ceux qui avaient reçu 1 cm³ de sang jusqu'à ceux qui n'avaient reçu qu'une seule goutte.

Voici par contre le détail de celles qui, utilisant celle de nos souches donnant l'infection occulte la plus faible, nous ont permis de dénombrer les spirochètes avec une précision suffisamment grande.

— Cobaye adulte 43/47. Inoculé avec 0 cm³ 5 de sang de rat riche en spirochètes (souche *B. crocidura microti* MOXIX). N'a jamais montré de spirochètes au fond noir ni en gouttes épaisses.

Au dixième jour on prélève à ce cobaye 1 cm³ 5 de sang dont on inocule 0,50; 0,25; 0,10; 0,10 et 0 cm³ 05 respectivement à cinq lapins nouveau-nés: le lapin ayant reçu 0,25 et un des lapins ayant reçu 0,10 ne s'infectent pas.

— Cobaye adulte 43/49. Inoculé avec 0 cm³ 5 de sang de rat riche en spirochètes (souche *B. crocidura microti* MOXIX). N'a jamais montré de spirochètes au fond noir ni en gouttes épaisses. Au trente-deuxième jour on prélève à ce cobaye 2 cm³ de sang dont on inocule 0 cm³ 50 à chacun des deux rats jeunes; 0 cm³ 10 à chacun de deux autres rats jeunes et 0 cm³ 05 à chacun de quatre rats jeunes: seul un des rats ayant reçu 0 cm³ 50 s'infecte.

— Le même cobaye est saigné à nouveau au soixante-septième jour: 0 cm³ 25 sont inoculés à une souris blanche; 0 cm³ 10 à chacune de deux souris et 0 cm³ 05 à deux autres souris: seule la souris inoculée avec 0 cm³ 25 s'infecte.

Ces expériences montraient que le nombre des spirochètes circulants pouvait s'abaisser au-dessous de 1 par 0 cm³ 50. Nous avons alors multiplié les expériences en introduisant simplement dans tous les passages que nous pratiquons par nos recherches sur la durée et le rôle possible dans la nature de ce type d'infection (*) des séries suffisantes d'animaux détecteurs, inoculés cette fois tous avec la même quantité de sang dans chaque série.

Avec cinq virus de *B. crocidura* (3 *microti*, 1 *crocidura*, 1 Egypte), un virus de *B. duttonii* et deux virus de *B. lutychevii*, chez le cobaye, l'homme, le rat blanc, le lapin et le mérion, dans 27 expériences différentes, nous avons pu voir dans les séries d'animaux détecteurs: 1 animal de passage sur 2, 3 ou 5, ou 2 sur 3, ou 3 sur 4, ne pas s'infecter avec des doses de sang variant selon les expériences de 0 cm³ 10 à 1 cm³ 5. Soit, avec 0 cm³ 10: quatre fois 1 sur 3; avec 0 cm³ 25: trois fois 1 sur 2; avec 0 cm³ 30: une fois 1 sur 5 et une fois 3 sur 4; avec 0 cm³ 35: deux fois 1 sur 2 et trois fois 1 sur 3; avec 0 cm³ 50: deux fois 1 sur 2, deux fois 1 sur 3 et une fois 2 sur 3; avec 0 cm³ 60: une fois 1 sur 3; avec 0 cm³ 75: une fois 1 sur 3 et une fois 2 sur 3; avec 1 cm³: trois fois 1 sur 2 et enfin avec 1 cm³ 5: une fois 1 sur 3.

Voici à titre d'exemple les quatre expériences faites avec les doses les plus fortes.

— Cobaye adulte 33/86. Inoculé avec 0 cm³ 5 de sang de lapin nouveau-né riche en spirochètes (souche *B. crocidura microti*

(*) Ces recherches feront l'objet de présentations ultérieures à la Société.

MOXIX). N'a jamais montré de spirochètes au fond noir ni en gouttes épaisses. Au quatre-vingt-douzième jour, on prélève à ce cobaye par ponction du cœur 2 cm³ de sang dont on inocule 1 cm³ à chacun de deux rats blancs adultes : un seul de ces rats s'infecte après une incubation de onze jours.

— Homme P. G. (M. M. R. D.). Inoculé avec 1 cm³ de sang de lapin nouveau-né riche en spirochètes (souche *B. latychevii* KOI). N'a jamais présenté d'élévation de température ni de spirochètes visibles dans le sang. Au dixième jour, on prélève à ce sujet 2 cm³ de sang, dont on inocule 1 cm³ à chacune de deux souris blanches : une seule de ces souris s'infecte après une incubation de sept jours.

— Au même P. G., on prélève au quatorzième jour 2 cm³ 5 de sang, dont on inocule 1 cm³ à chacune de deux souris blanches : une seule s'infecte après une incubation de neuf jours. Quatre autres souris, inoculées chacune avec une goutte du même sang, ne s'infectent pas.

— Cobaye adulte 43/49. Ce cobaye, déjà cité, était suivi depuis près de quatre mois et a donné des passages positifs jusqu'au quatre-vingt-deuxième jour; après quoi les passages, continués tous les cinq jours à des séries de trois souris, recevant chacune 0 cm³ 3 de sang, sont demeurés négatifs. Au cent douzième jour, on pratique une saignée totale qui donne 4 cm³ 5 de sang, réparti entre 3 rats blancs : deux seulement s'infectent après incubation de 11 et 13 jours.

Ces expériences montrent l'extrême rareté des germes circulant dans l'infection occulte, dont le nombre peut s'abaisser au-dessous de 1 spirochète pour 1 cm³ 5 de sang. Elles achèvent de nous convaincre de l'impossibilité de l'existence de formes invisibles, dont la présence augmenterait par définition et « régulariserait » la virulence du sang.

Il est possible que le nombre des spirochètes puisse être plus bas encore, ce que nous n'avons pu jusqu'à présent déterminer faute de pouvoir prélever aux animaux des quantités de sang suffisantes. Des expériences sont en cours actuellement chez l'homme et le mouton avec des prises de sang dépassant 10 cm³. La recherche de ces spirochètes exceptionnellement rares exige en effet l'inoculation de fortes quantités de sang à des séries suffisantes d'animaux détecteurs, si l'on veut annuler la part du hasard que montre par exemple l'expérience suivante.

Cobaye adulte 61/37 : cité plus haut dans les expériences de « gouttes alternées ». Ce cobaye qui montrait des spirochètes en gouttes épaisses au dixième jour et dont quatre gouttes de sang

infectaient quatre souris de passage, est saigné à nouveau au vingtième jour. On inocule 0 cm³ 50 de son sang à une souris blanche qui ne s'infecte pas ; cependant deux autres souris ont été inoculées en même temps avec une seule goutte : l'une s'infecte. Toutes les gouttes épaisses examinées sont bien entendues négatives.

DISCUSSION

La technique des gouttes épaisses en série, que BURGDORFER au Rocky Mountain Laboratory et nous-mêmes avons utilisée, ne peut de toute évidence être proposée comme une technique usuelle de laboratoire, à cause de l'énorme perte de temps qu'elle impose. Elle nous a cependant permis de montrer que le sang ne contenant pas de formes spirochètiennes visibles, n'était pas virulent et de faire la preuve de l'inexistence de formes invisibles. L'extraordinaire rareté des spirochètes circulant dans ces formes occultes exclut d'ailleurs tout espoir de détection par une méthode optique et seul le passage du sang en quantité importante à l'animal sensible peut permettre d'affirmer l'infection occulte.

La connaissance de ce type d'infection, dont les formes les plus basses touchent sans coupure déterminable à la non-infection vraie, c'est-à-dire à l'état réfractaire (*), donne de la réceptivité des vertébrés une image nouvelle : la rareté des germes et non une virulence plus basse caractérisent ces infections indécélables par les méthodes usuelles.

La notion de gamme ininterrompue de réceptivité, de l'infection visible à la non-infection, présente un intérêt général chaque jour accru, en élargissant la connaissance des possibilités cachées des virus dans la nature. En matière de spirochètes en effet, de façon indiscutable, de telles infections occultes suffisent à elles seules à assurer la conservation et l'évolution de certaines espèces dans la nature, comme nous le montrerons dans un autre travail, et c'est là le grand intérêt de la reconnaissance de ces formes.

Pour ces recherches spéciales, il sera inutile de recourir à la méthode des examens de gouttes épaisses en série, qui ne recule que de très peu la limite de nos possibilités de détection : l'examen au fond noir suffira à reconnaître rapidement les infections fortes et en cas de négativité de ce mode d'examen le passage à l'animal sensible pourra seul détecter avec certitude l'infection occulte.

(*) Voir en particulier la note de G. E. DAVIS et BURGDORFER sur la réceptivité du cobaye à *B. duttoni* (8).

RÉSUMÉ

Chez certaines espèces animales et chez l'homme, certaines espèces de spirochètes donnent une infection où aucun germe ne peut être retrouvé par les méthodes optiques habituelles. Une recherche prolongée sur série de gouttes épaisses permet cependant de mettre en évidence des spirochètes d'aspect et de dimensions normales, dont l'extraordinaire rareté peut être démontrée par le passage à des séries d'animaux sensibles de quantités fractionnées de sang; cette méthode montre que la circulation des spirochètes dans ces formes occultes peut être inférieure à 1 spirochète par 1 cm³ 5. Les fractions de sang ne contenant pas de spirochètes ne sont jamais virulentes, ce qui exclut, pensons-nous, de façon définitive, l'hypothèse de l'existence de formes invisibles.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BALTAZARD (M.) et HAHNI (A.). — Sur l'infection « inapparente » dans les spirochètoses. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1954, 47, 48.
- (2) BRUNET (E.). — *Précis de parasitologie*. Masson, Paris, 1949.
- (3) BURGDORFER (W.). — On « occult » infection in relapsing fevers. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1954, 47.
- (4) BURGDORFER (W.) et BALTAZARD (M.). — Sur les spirochètoses dites « inapparentes ». *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1954, 47, 375.
- (5) CAORINE (V.) et CROUGUE (O.). — Virulence du sang du cobaye infecté avec le *Spirochæta hispanica*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, 68, 518.
- (6) DAVIS (G. E.) et BURGDORFER (W.). — On the susceptibility of the guinea-pig to the relapsing fever spirochete *Borrelia duttoni*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1954, 47.
- (7) NICOLLE (CH.). — Un nouvel exemple d'infections inapparentes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1928, 17, 356.
- (8) SCHUBARDT (V. T.) et WILKERSON (M.). — Relapse phenomena in rats infected with single spirochetes (*Borrelia recurrentis* var. *turicata*). *J. Bact.*, 1951, 62, 215.