

CONSIDERATIONS ET NOUVELLES EXPERIENCES SUR LE PHENOMENE DE FERMENTATION GAZEUSE SYMBIOTIQUE

QUELQUES REMARQUES
SUR DES SYMBIOSES MICROBIENNES PRODUISANT MALADIES

ALDO CASTELLANI

SUMMARIVM — Novis peractis experimentis Auctor comperit quasdam Bacteriorum et Mycetorum species, quae solae non gignunt gasicam fermentationem in nonnullis saccharis aliisque materiis, eam fermentationem efficere si in symbiosi vivant aut si commisceantur.

Le phénomène de fermentation gazeuse symbiotique connu dans les pays Anglo-Saxon sous le nom « Castellani's Symbiotic ou Synergetic Gas-Fermentation Phenomenon », a été décrit par moi il y a de nombreuses années, et peut être définie de la manière suivante: avec certaines espèces de bactéries et de mycètes, deux micro-organismes dont chacun, isolé, ne produit pas de fermentation gazeuse dans certaines sucres et d'autres substances, la produient lorsqu'ils vivent en symbiose ou quand ils sont artificiellement mélangés.

Historique — Dans les années avant la première guerre mondial en Orient et en Angleterre, je me suis intéressé à l'étude de la constitution du « baker's yeast », c'est a dire des morceaux de « levure de boulangerie » comme on trouve chez les boulangers.

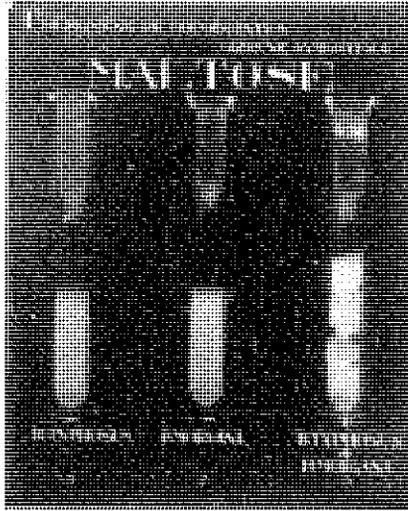
(*) Nota presentata nella Riunione del 20 maggio 1957.

J'ai trouvé que ce qu'on appelle « levure de boulangerie » n'est pas constitué d'un seul *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) mais d'un ou deux saccharomyces + une ou deux ou plusieurs espèces bactériennes. J'ai trouvé que l'échantillon de levure *in toto* produisait fermentation gazeuse dans un nombre plus grand de carbohydrates que chacun des organismes le composant, mais que si on faisait un mélange de tout les micro-organismes isolés, ce mélange produisait les mêmes fermentations gazeuses que l'échantillon *in toto*.

En 1924, en étudiant quelques maladies de l'Amérique Centrale, j'ai trouvé et décrit une rare stomatite causée par l'association d'un petit cryptococque (*C. graciloides*) et d'un bacille (*B. vermiculoides*) et je l'ai noté dans le tableau des fermentations que le cryptococque seul et le bacille seul ne produisait de fermentation gazeuse dans le glucose, le lévulose, et le maltose mais ensemble ils la produisaient. (Voir le tableau des fermentations des deux micro-organismes séparés et rassemblés dans le *Journal of Tropical Med. et Hyg.*, Année 1925, Juin, pag. 253).

En 1922, dans un cas suspect de fièvre typhoïde à l'Hôpital Italien de Londres, j'ai fait l'examen bactériologique des selles, comme routine, en employant le terrain de MacConkey, sur lequel toutes les bactéries qui ne fermentent pas la lactose donnent des colonies blanches. Dans ce cas un très grand nombre de colonies blanches se sont développées. J'en ai étudié quinze. Trois fermentaient avec gaz le glucose, mais pas la maltose, treize fermentaient avec gaz, le glucose et aussi la maltose. Comme le bacille typhique ne donne du gaz dans aucun sucre on a pensé d'abord qu'il n'y avait pas de bacille typhique, mais j'ai continué l'investigation des 15 colonies en faisant des plaques etc. et j'ai trouvé que les trois colonies qui ne fermentaient pas la maltose consistaient d'un seul microorganisme, le bacille de Morgan (*sensu stricto*, ne ferment pas la maltose), tandis que les autres douze consistaient de deux micro-organismes associés: le bacille typhique et le bacille de Morgan.

Technique pour mettre en évidence le Phénomène de Fermentation Gazeuse Symbiotique — On peut mettre en évidence ce phénomène en employant, soit des milieux liquides, soit des milieux solides contenant de la maltose, de la mannite, du glucose, du saccharose, etc. (1% ou 2%). Dans la préparation des milieux liquides, il ne faut pas employer le bouillon parce que celui-ci contient toujours une trace de glucose; il faut s'adresser à l'eau



1. Gélose maltosée inoculée avec *B.typhosus* (*Salmonella typhosa*).
Pas de fermentation gazeuse.
2. Gélose maltosée inoculée avec *B.morgani* (*Proteus morgani*)
Pas de fermentation gazeuse.
3. Gélose maltosée inoculée avec *B.typhosus* (*Salmonella typhosa*)
+ *B.morgani* (*Proteus morgani*). Abundante fermentation gazeuse.

peptonnée. En ce qui concerne les milieux solides, agar maltosé, mannité, etc., il faut préparer la gélose avec de l'eau peptonée faites avec une peptone ne contenant pas de sucre, et non avec bouillon; puis on ajoutera la maltose, la galactose, la saccharose, etc. 1-2%. On ne stérilisera pas à l'autoclave, sous pression, mais seulement dans la vapeur fluente, à 100 centigrades. Avec les milieux liquides en employera, pour mettre en évidence la formation de gaz, les petites tubes à fermentation de Durham, ou bien on peut se servir de simple tubes à fermentation en U. Les tubes, après avoir été ensemencés, seront maintenus à l'étuve à 35-37 C. pendant trois jours.

Action de la Symbiose Salmonella typhosa + Proteus morgani sur la maltose, le Mannitol et le Sorbitol — Le bacille typhique seul ne produit pas de fermentation gazeuse dans ces trois substances, le bacille de Morgan (*sensu stricto*) ne produit pas de fermentation gazeuse dans ces trois substances. Leurs association produit une forte fermentation gazeuse dans ces trois substances.

Symbiose Salmonella typhosa + Proteus race P. — Le terme Proteus ouvre des micro-organismes assez diffèrents. J'ai choisi pour mes expériences une race (P) qui n'a pas d'action sur la maltose, la mannite et le sorbitol.

Action de la symbiose Salmonella typhosa + Proteus proteus (race P) sur la maltose, mannite, sorbite — Le bacille typhique seul ne produit pas de gaz dans ces trois substances, le bacille proteus P. seul ne produit pas de gaz, l'association des deux bactéries produit fermentation gazeuse.

Symbiose Escherichia colicomunior + Proteus kandiensis. Action sur l'adonitol. — Le B. comunior ne produit ni acide ni gaz. Le B. kandiensis produit de l'acide seulement, jamais de gaz. Leur mélange produit de l'acide et du gaz, quoique lentement: les tubes doivent être conservés à 37 C. pendant au moins une semaine.

Staphylococcus aureus + Proteus morgani. Action sur la maltose. — Le Staphylococcus aureus (race de l'Institut R. Ross), produit de l'acide, mais pas de gas avec la maltose. Le B. morgani seul ne produit ni acide, ni gaz. Le mélange Staphylococcus aureus + B. morgani produit de l'acide et du gaz.

Staphylococcus aureus + *Proteus proteus* (race P). Action sur la maltose. — Le *Staphylococcus aureus* (race de l'Institut R. Ross) produit de l'acide, mais pas de gaz avec la maltose. Le *B. proteus* seul de l'acide mais pas de gaz avec la maltose. Le *B. proteus* seul ne produit ni acide ni gaz. Leur mélange produit de l'acide et du gaz.

J'ai eu récemment les mêmes résultats en employant un *staphylococcus aureus* et un *proteus P.* isolés a Lisbonne.

Streptococcus pyogenes + *Proteus morgani*. Action sur la maltose. — Le *Streptococcus pyogenes* (race du Laboratoire de l'Institut d'Hygiène Publique de Londres) produit de l'acide, mais pas de gaz. Le *B. morgani* ne produit ni acide ni gaz. Le mélange des deux germes produit acide et gaz; mais il faut huit jours à 37° C. pour constater l'apparition du gaz.

Streptococcus pyogenes + *Proteus morgani*. Action sur la maltose. — Le *Streptococcus* (race du laboratoire de l'Institut d'Hygiène Publique de Londres) produit de l'acide mais pas de gaz. Le *B. proteus* ne produit ni acide ni gaz. Le mélange des deux germes produit acide et gaz: mais il faut huit à dix.

B. vermiculoides + *Cryptococcus graciloides*. — Ces deux organismes isolés d'une forme de stomatite en Amérique Centrale (voir ma publication dans le « Journ. Trop. Med. & Hyg. », 1^{er} Janv. et 15 Juin 1925; Observation on some Diseases of Central America) vivent en symbiose et il m'a fallu plus d'un an pour les séparer. Le mélange symbiotique produit quoique très lentement du gaz avec le glucose, le levulose et la maltose. Le *cryptococcus* seul ne produit ni gaz ni acide. Le bacille seul produit de l'acide, jamais de gaz. (Vois le tableau dans « Journ. of Trop. Med. & Hyg. », 15 June 1925 à page 253).

Aspergillus + *Proteus morgani*. — La variété d'*Aspergillus* employée comme du reste toutes les espèces d'*Aspergillus* de ma collection, ne produit pas de gaz dans la maltosa (et aucun autre sucre); elle produit un peu d'acide. Le *B. morgani* ne produit pas de gaz ni d'acide; leur mélange produit de gaz, quoique lentement.

Explication du phénomène de Fermentation gazeuse Symbiotique. —

Probablement un des micro-organismes produit des substances qui sont fermentées avec gaz par l'autre. Mais quelles sont ces substances? Dans le cas de la symbiose *Salmonella typhosa* + *Proteus morgani*, SCHULTZ et HARDE ont cru d'avoir démontré que le bacille typhique produit dans la maltose de l'acido formique qui serait fermenté avec gaz par le bacille de Morgan mais leurs recherches n'ont pas été confirmées. Selon G. GIBSON GRAHAM, bacille typhiques produit une substance intermédiaire stable qui est fermentée par le bacille de Morgan.

EMPLOI DU PHENOMENE DE FERMENTATION GAZEUSE SYMBIOTIQUE
POUR LA DIFFERENTIATION DE QUELQUES ESPECES MICROBIENNES

Ce phénomène a été employé par moi et mes élèves, MENON, DE MURO, FIALLOS, CATTANEO, TRIPODI, pour la différentiation de plusieurs bactéries, par exemple pour différencier les principales espèces et variétés du genre *Shigella*: *S. dysenteriae* Shiga-Kruse; *B. paradysenteriae* var. *Flexneri*; *S. paradysenteriae* var. *Hiss-Ruselli*; *S. metadysenteriae* var. *Ceylonensis* -A (*bacillus* Kruse-Castellani Duval-Sonne); *S. metadysenteriae* var. *Ceylonensis* -B (*B. castellanii*). Pour cette différentiation en emploi comme symbiont le bacille de Morgan (*sensu stricto*, ne touche pas la maltose).

La symbiose Shiga-Kruse + Morgan ne produit pas de gaz dans la lactose, maltose, mannite. La symbiose Flexner + Morgan ne produit pas de gaz dans la lactose, elle produit du gaz dans la mannite et la maltose. La symbiose Hiss-Russell + Morgan ne produit pas de gaz dans la lactose et la maltose, elle produit du gaz dans la mannite. La symbiose *S. ceylonensis* - A (Kruse-Castellani-Sonne) + *B. morgani* produit fermentation gazeuse dans la lactose, mais pas dans le dulcitol, et le xylose. La symbiose *S. madampensis* + *morgani* produit du gaz dans la lactose et xylose mais pas dans le dulcitol.

Pseudo-phénomène de fermentation gazeuse symbiotique. — De la surface de certains fruits j'ai isolé un bacille (Bacille N). Ce bacille inoculé dans des tubes ordinaires de gélose lactosée ne donne aucune fermentation gazeuse. Le bacille est presque anaérobie et il végète principalement au fond des tubes. Si on ajoute a ce bacille le *B. typhique* ou le bacille dysentérique

(Shiga-Kruse) qui seuls n'ont aucune action sur la lactose, on observera dans les tubes de gélose lactosé après deux jours à 37 C. une énorme quantité de gaz; mais ce n'est pas le vrai phénomène de fermentation symbiotique. J'ai cultivé le Bacille N seul en conditions strictement anaérobies en employant la boîte de Fields-Macintosh, alors il donne quoique seul, du gaz dans la lactose. Probablement dans les tubes ordinaires de gélose lactosé le B. typhique use l'oxygène, le milieu devient strictement anaérobie et le Bacille N trouve les conditions favorables pour fermenter, avec du gaz, la lactose.

Phénomènes d'inhibition causés par quelques symbioses. — En 1926 j'ai décrit l'action inhibitrice de quelques symbioses sur la fermentation de quelques carbohydrates. Par exemple la *Candida tropicalis* produit fermentation gazeuse abondante du saccharose, le bacille typhique (*Salmonella typhosus*) ne produit aucune fermentation gazeuse. L'association bacille typhique + *Candida tropicalis* ne produit de gaz, ou seulement très en retard et en petite quantité.

Avec MENON et CERUTTI j'ai noté que le bacille de Morgan (*Proteus morgani*) seul produit de l'indol, le bacille *kandiensis* (souche de l'Institut Ross) ne produit pas de l'indol, ou seulement une trace. Nous avons observé que l'association *Bacillus morgani* + *Bacillus kandiensis* dans l'eau peptonée ne produit pas de l'indol, au moins en employant la méthode usuelle du nitrate de soude-acide hydrochlorique.

SYMBIOSES MICROBIENNES PRODUISANT DES MALADIES

Suivant l'usage de la littérature médicale j'emploie le terme *symbiosis sensu latissimo* pour indiquer simplement une association persistante de deux microorganisms.

Depuis le temps de PASTEUR et de KOCH on peut dire qu'on a pensé toujours à la monoétiologie des maladies microbiennes; une maladie, un germe spécifique. C'est rare qu'on pense à la possibilité qu'une maladie soit causée par l'association de deux micro-organismes dont chacun seul ne la produit pas. Mais ces maladies existent-elles vraiment? Une a été connue depuis la fin du siècle passé, l'angine de VINCENT, causée par la symbiose d'une Spirochète (*S. vincenti*) et du bacille fusiforme (*Fusiformis fusiformis*, *Fusobacterium plauti-vincenti*).

On a fait des objections, on a affirmé que dans quelques cas il ne se présente que la Spirochète. Quelques auteurs pensent que les deux organismes représentent simplement deux étages du même micro-organisme.

J'ai décrit trois affections qui peuvent, je pense, être considérées d'origine symbiotique: Stomatitis cryptococco-bacillaris, Trichomycosis nigra, T. rubra.

Stomatitis cryptococco-bacillaris. — Cette rare stomatite que j'ai décrit en Amérique Centrale en 1925 (« Journ. of Trop. Med. & Hyg. », Juin 1925, pag. 253) est caractérisées par la présence de plaques délicates, grisâtres, translucides, sur la muqueuse orale, plaques qui, a un examen superficiel, ressemblent à des plaques incipientes de leucoplasie. En faisant un grattage de ces plaques, on voit, au microscope, un nombre énorme de petits cryptococques et d'un gros bacille.

Si l'on fait des cultures, sur agar glucosé, les deux organismes se développent en symbiose, et il m'a fallu plus d'un an pour séparer les organismes et avoir des cultures pures, je les ai décrites il y a longtemps (« Journ. Trop. Med. & Hyg. » 1925), j'ai appelé le petit cryptococque: *Cryptococcus graciloides*, et le bacille *B. vermiculoides*.

Le cryptococque est en réalité un Pityrosporum (*P. graciloides*) et quelques auteurs pensent qu'il est identique au *P. ovale*.

Trichomycosis axillaris nigra. — Cette affection décrite par moi, est caractérisée par la présence sur les poils de l'axille de petits nodules noirs. Elle est causée par la symbiose d'un champignon (*Actinomyces tenuis* Cast.) et un micrococque produisant un pigment noir (*M. nigrescens* Cast.). Le champignon seul produit le nodule, le micrococque la pigmentation, ensemble le tableau complet de l'affection. Les deux organismes ont été décrits *in extenso* dans le « Manual of Tropical Medicine » (Castellani and Chalmers, Edition 1919).

Trichomycosis axillaris rubra. — Cette affection des poils de l'axille est caractérisée par la présence de petits nodules rouges. Cette affection est causée par la symbiose *Actinomyces tenuis* + *Micrococcus castellanii*, un micrococque qui produit un pigment rouge. Le champignon seul produit seulement des nodules apigmentés, le micrococque seul ne produit pas de vrai nodules, seulement une pigmentation. Leur symbiose donne l'affection caractéristique.

Importance de la Symbiose dans la Production de certains symptômes. —

Je me permets de rappeler j'emploie le terme symbiose *sensu latissimo*. Dans quelques maladies dont l'agent étiologique spécifique est bien connu, il y a des symptômes importants, quelques fois presque pathognomoniques, qui ne sont pas causés par le germe spécifique directement, mais par des germes associés.

Un exemple banal, nous le voyons tous les jours, l'éruption pustulaire caractéristique de la gale qui n'est pas causée directement par l'acarus. Elle est causée par les pyococci qui envahissent l'épiderme traumatisée par l'acarus. Chez les personnes qui se lavent et se désinfectent les mains continuellement, comme les chirurgiens et les infirmières, la diagnostique de la gale peut être difficile parce que, généralement il n'y a pas d'éruption pustulaire à cause de l'absence des pyococci.

Un autre exemple. Dans tous les livres de Médecine Tropicale, on lit qu'un des symptômes plus caractéristiques du Pian (Framboesia, yaws) est la présence d'épaisses croûtes jaune-miel, « honey coloured crusts » des auteurs anglais, couvrant les nodules. Ces croûtes, en réalité, ne sont pas causés directement par l'agent spécifique du Pian (*Treponema pertenuis* Cast.) mais par les pyococci. J'ai fait la suivante expérience: dans un cas de Pian au commencement de l'éruption nodulaire généralisée un nodule incipient a été continuellement humecté avec de la lotion au Sublimé (1:2000), qui a une très faible action sur le *Treponema pertenuis*, mais très forte sur les Staphilococques. Ce nodule est devenu aussi grand, pratiquement, que les autres, mais la croûte caractéristique ne s'est jamais formée.

BIBLIOGRAPHIE

- AZZI A.: *Microbiologia ed Immunologia*. Vallardi, Milano, 1951.
- CASTELLANI A.: *Symbiotic Fermentation Phenomenon. Its uses in the differentiation of certain microorganisms*. « The Adolph Gehermann Lectures ». Chicago, February 1926. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 24, 1927, p. 511-516.
- *Observations on the Importance of Symbiose or Close Association of Different species of Organisms in the Production of Certain Biochemical Phenomena, and in the causation of Certain Diseases*. « Journ. Trop. Med. », Aug. 24th 1926, p. 217-226; « Journ. Amer. Med. Assoc. », 87, July 3rd 1926, p. 15-22; « Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. », March 23rd 1926, p. 481-488; « Brit. Med. Journ », 2, Oct. 24th 1925, p. 734; « Meetings Ceylon Branch G.M.A. » (1904); « Annales Inst. Pasteur », 42, April 1928.
- *Observations on Some Diseases of Central America*. « Journ. of Trop. Med. & Hyg. », Jan 1st. 1925 and June 15th, 1925, p. 253. (Symbiosis *B. vermiculoides* and *Cryptococcus graciloides*).
- *Notes on Three New Yeast-Like Organisms, and a New Bacillus, With Remarks on the Clinical Conditions from Which They Have Been Isolated: Furunculosis Blastomycetica, Macro-glossia Blastomycetica Stomatitis Cryptococco-Bacillaris* « Journal of Tropical Medicine and Hygiene », June 15th 1925 (Production of gas fermentation by the association *Cryptococcus graciloides* - *Bacillus vermiculoides*).
- *Le Malattie dell'Africa*. Roma, 1947.
- *Little. Known Tropical Diseases*. Lisbonne 1949 et 1953.
- CATTANEO G.: *Esperienza sulla fermentazione simbiotica di Castellani*. « Giorn. Batt. ed Immunologia », 1929, 4 II.
- FIALLOS J. M.: *Observations on Castellani's Fermentation Phenomenon*. « Journ. of Trop. Med. & Hyg. », Dec. 1st. 1925.
- GIROLAMI M.: *Personal Communications*.
- HARDE H.: *Communication by Letter*.
- PUNTONI V.: *Microbiologia*. Roma, 1949.
- PERUZZI M.: « Ann. Med. Nav. » Vol. I, n. 3-4, 1926.
- SCHULZE H.: *Communication by Letter*.
- TRIPODI P.: *Il metodo della fermentazione gasosa simbiotica di Castellani negli studi dei batteri disenterici*. « Ann. d'Igiene », 1940, p. 2.